

Aus der Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Der Einfluss des synthetischen Matrixmetalloproteinase-Inhibitors Batimastat auf die
Wundkontraktion der Haut**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr.med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Juliane Claes

aus Könnern

Magdeburg 2008

„Das schönste Denkmal,
das ein Mensch
bekommen kann,
steht in den Herzen
der Mitmenschen.“

Albert Schweizer

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Claes, Juliane

Der Einfluss des synthetischen Matrixmetalloproteinase-Inhibitors Batimastat auf die Wundkontraktion der Haut. 2008, 51 Blatt, 15 Abbildungen, 3 Tabellen, 1 Anlage

Kurzreferat

Pathologische Wundheilung äußert sich in Form von hypertrophen Narben, Narbensträngen und Narbenkontrakturen. Myofibroblasten werden als Haupteffektoren der kutanen Kontraktion gesehen. Matrixmetalloproteinasen (MMP) partizipieren in der Umwandlung von Gewebe und Migration von Keratinozyten während der Wundheilung. In unseren Studien wurde der Einfluss des lokal applizierten, synthetischen MMP-Inhibitors Batimastat auf die Wundheilung und Wundkontraktion von Vollhautexzisionswunden im Tiermodell untersucht.

Die Wirkung des Inhibitors wurde mittels Hämalaun-Eosin Histologie, alpha-smooth-muscle actin und BrdU-Immunhistochemie sowie Gelatine-Zymographie untersucht. Die topische Behandlung der Vollhautwunden mit Batimastat verzögerte signifikant die Reepithelialisierung und Wundkontraktion verglichen zur Kontrolle. Zudem zeigten Myofibroblasten eine veränderte Zellmorphologie und Ausrichtung im Gewebe. Batimastat führte zu einer signifikant erhöhten Proliferation im Wundrand und in dem sich neu bildenden Epithel. Während die Sekretion der Gelatinase MMP-2 durch den Inhibitor nicht beeinflusst wurde, erhöhte sich die MMP-9 Gesamtmenge in Wundrändern signifikant.

Schlüsselwörter

Hautwundkontraktion, Hautwundheilung, Matrixmetalloproteinasen, Gelatinasen, Matrixmetalloproteinasen-Inhibitor, Batimastat, Myofibroblasten, alpha-smooth-muscle actin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	1
1.1.	Physiologische Heilung von Hautwunden.....	1
1.2.	Myofibroblasten und Wundkontraktion.....	2
1.3.	Pathologische Wundheilung und Wundkontraktion.....	2
1.4.	Die Extrazelluläre Matrix.....	2
1.5.	Die Matrixmetalloproteinasen.....	3
1.6.	Die Rolle der Gelatinasen in der Wundheilung.....	4
1.7.	Synthetische Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen.....	5
1.7.1.	Batimastat.....	5
1.8.	Vorausgegangene Arbeiten und Zielstellung.....	5
2.	Material und Methoden	7
2.1.	Tierexperimenteller Versuch.....	7
2.1.1.	Versuchstiere.....	7
2.1.2.	Synthetischer Matrixmetalloproteinasen-Inhibitor Batimastat.....	7
2.1.3.	Versuchsgruppen.....	7
2.1.4.	Versuchsdurchführung.....	8
2.2.	Erfassung der Wundkontraktion durch Messung der Wundflächen.....	10
2.3.	Histologie und Immunhistochemie.....	11
2.3.1.	Einbettung der Proben.....	11
2.3.2.	Herstellen von Hautschnitten.....	11
2.3.3.	Histologie.....	11
2.3.3.1.	Übersichtsfärbung.....	11
2.3.3.2.	Auswertung der Hämalaun - Eosin Präparate.....	11
2.3.4.	Immunhistochemie.....	12
2.3.4.1.	Immunhistochemischer Nachweis des BrdU.....	12

2.3.4.2.	Auswertung der BrdU-Immunhistochemie.....	13
2.3.4.3.	Immunhistochemischer Nachweis von ASMA.....	13
2.3.4.4.	Auswertung der ASMA-Immunhistochemie.....	14
2.4.	Biochemische Analysen.....	14
2.4.1.	Proben-Extraktion.....	15
2.4.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	15
2.4.3.	Herstellung der Probenlösung	15
2.4.4.	Elektrophorese.....	15
2.4.5.	Enzymreaktion und -darstellung.....	16
2.4.6.	Auswertung.....	16
2.5.	Statistik.....	17
3.	Ergebnisse	18
3.1.	Makroskopisch sichtbare Veränderung der Wundgröße.....	18
3.2.	Histologie – Epithelialisierung und Größenveränderung der Vollhautwunden.....	19
3.3.	Untersuchung der Zellproliferation mit Hilfe der BrdU-Immunhistochemie.....	22
3.4.	ASMA-Immunhistochemie.....	25
3.5.	Vaskularisierung im Wundbereich.....	29
3.6.	Gelatine-Zymographie: Veränderungen der MMP-2 und MMP-9 Sekretion.....	30
3.6.1.	MMP-2.....	31
3.6.2.	MMP-9.....	33
4.	Diskussion	35
4.1.	Epithelialisierung.....	35
4.2.	Epitheliale und mesenchymale Proliferation.....	36
4.3.	Makroskopischer und mikroskopischer Wundverschluss und Wundkontraktion....	38
4.4.	Sekretion von Gewebegelatinasen.....	40
4.5.	Schlussfolgerungen.....	42

5.	Zusammenfassung	43
6.	Literaturverzeichnis	44
7.	Danksagungen	
8.	Erklärung	
9.	Curriculum vitae	
10.	Anlagen	
10.1.	Paraffineinbettung	
10.1.1.	Material	
10.1.2.	Durchführung	
10.2.	Hämalaun-Eosin Färbung	
10.2.1.	Material	
10.2.2.	Durchführung	
10.3.	BrdU- und ASMA-Immunhistochemie	
10.3.1.	Material	
10.3.2.	Durchführung	
10.4.	Zymographie	
10.4.1.	Material	
10.4.2.	Proben- Extraktion	
10.4.3.	Proteinanalyse	
10.4.4.	Gelpräparation, Vorbereitung der Elektrophorese	
10.4.5.	Bestückung der Gele und elektrophoretische Auftrennung	
10.4.6.	Enzymreaktion, Färbung und Konservierung	

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Alk	Alkohol
Aqua dest	demineralisiertes Wasser
ASMA	alpha-smooth-muscle actin
BrdU	5-bromo-2`-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
D	Dermis
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
EZ	Epithelzunge
EZM	extrazelluläre Matrix
F	Haarfollikel
FGF	Fibroblast growth factor
GG	Granulationsgewebe
h	Stunde
HE	Hämalaun-Eosin
IC 50	mittlere inhibitorische Konzentration
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinocyte growth factor
KNS	Kaninchennormalserum
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MMPI	Matrixmetalloproteinasen-Inhibitor

n	Anzahl
nE	neues Epithel
NH	Normalhaut
OP	Operation
PDGF	Platelet derived growth factor
RECK	Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs
S	Schorf
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	TRIS buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- α	Transforming growth factor alpha
TGF- β	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tris	Tri-(hydroxymethyl-)aminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VW	Verbandswechsel
WL	totale Wundlänge
WR	Wundrand
WRp	profunder Wundrand
WRs	superfizieller Wundrand
WZ	Wundzentrum

1. Einführung

1.1. Physiologische Heilung von Hautwunden

Die Heilung von Hautwunden verläuft in mehreren sich überlappenden Phasen. Bei der Verletzung von Gewebe tritt zunächst Blut aus beschädigten Gefäßen aus. In der ersten Wundheilungsphase wird der Wundspalt mit Bestandteilen geronnenen Blutes verschlossen. Der gebildete Blutpfropf trocknet zur Oberfläche hin ein und bildet den Wundschorf [1]. Im geronnenen Blut sind Thrombozyten zusammen mit Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin in ein Netzwerk aus Fibrinfibrillen eingebettet. Dieser Fibrinpfropf stellt eine vorübergehende extrazelluläre Matrix (EZM) mit einem Reservoir aus Wachstumsfaktoren und Zytokinen dar, welche die Phase der Inflammation einleiten [2]. Im Blutgerinnsel setzen zunächst Thrombozyten Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β , TGF- α , IGF-1) frei [3]. Monozytenmakrophagen und neutrophile Granulozyten wandern durch Chemotaxis in das verletzte Areal ein. Dadurch erfolgt die Eliminierung von Bakterien, Fremdkörpern und nekrotischen Zellen über Phagozytose [4, 5]. Außerdem werden von aktivierten Makrophagen, die sich in der Wunde aus Monozyten gebildet haben, Wachstumsfaktoren sezerniert, welche die Bildung von Granulationsgewebe initiieren [6]. Diese aktivierten Wundmakrophagen leiten ein bis zwei Tage nach Verletzung die Fibroblastenproliferation und Angiogenese ein [7]. Zahlreiche Zellen wandern in die provisorische EZM ein und beginnen mit dem Remodelling des Granulationsgewebes [3]. Die in das Wundgewebe migrierten Fibroblasten synthetisieren eine neue EZM [8, 9]. Somit wird die provisorische Matrix durch eine Kollagenmatrix ersetzt [8]. Wenige Stunden nach Verletzung setzt die Phase der Reepithelialisierung des Gewebedefektes ein. Die über Hemidesmosomen bestehende Verbindung zwischen basalen Keratinozyten und Basalmembran wird unter dem Einfluss von Matrixmetalloproteinasen (MMP) [2] aufgelöst und eine laterale Migration der Keratinozyten initiiert. Auf der Zelloberfläche der Epidermiszellen entstehen neue Integrinrezeptoren, die mit der extrazellulären Matrix der Wunde interagieren [6]. Des Weiteren ermöglicht die MMP Expression am Wundrand den Keratinozyten sich einen Weg durch die Matrix des Fibrinpfropfes zu bahnen. In der zweiten Woche nach Verletzung wird das Granulationsgewebe narbig umgebaut. Aus Fibroblasten entstehen Myofibroblasten, deren kontraktile Aktinfilamente eine Kontraktion der Wunde bewirken. Mit zunehmender Faserdicke und steigendem Vernetzungsgrad des Kollagens erreicht die Narbe Stabilität und Zugfestigkeit [6].

1.2. Myofibroblasten und Wundkontraktion

Eine hohe mechanische Beanspruchung, wie sie im Wundrand und in Bereichen des Granulationsgewebes von dermalen Wunden auftritt, und das Vorhandensein von Fibronectin löst eine Differenzierung von Fibroblasten in Proto-Myofibroblasten aus [10]. Bei Spannungssteigerung und dem Einfluss von TGF- β 1 (Transforming growth factor beta), welches in der extrazellulären Matrix gespeichert wird, wandeln sich diese in alpha-smooth-muscle-actin (ASMA) haltige Myofibroblasten um [11-14]. Myofibroblasten sind spezialisierte kontraktile Zellen, die sich sowohl morphologisch als auch funktionell von Fibroblasten unterscheiden [13]. Sie besitzen einen kontraktilen Apparat, dessen Aktinfilamente an der Myofibroblastenoberfläche in Fibronexus enden, die über transmembrane Integrine das intrazelluläre Aktin mit extrazellulärem Fibronectin verbinden [15, 16]. Dadurch kann eine lokale Kontraktion der extrazellulären Matrix erfolgen. Außerdem sind Myofibroblasten über funktionelle Gap Junctions untereinander verbunden und bilden somit eine multizelluläre kontraktile Einheit [13, 17]. Nach Abschluss der normalen Wundheilung mit narbigem Umbau des Gewebes gehen die Myofibroblasten in Apoptose über und es entsteht eine zellarme Narbe [13].

1.3. Pathologische Wundheilung und Wundkontraktion

Die meisten Hautwunden heilen innerhalb von zwei Wochen problemlos ab. Jedoch ist die sich bildende Narbe als Endprodukt der Wundheilung oftmals weder ästhetisch noch funktionell perfekt [2]. Immer wieder entstehen hypertrophe Narben und Narbenkontrakturen, die mit einer Einschränkung der Beweglichkeit von Gliedmaßen, mit Schmerzen und reduzierter Lebensqualität verbunden sind [18-20]. Sie sind Folge einer Dysregulation im Umbauprozess der extrazellulären Matrix während der letzten Wundheilungsphase. Eine unangemessen hohe Produktion von extrazellulärer Matrix führt zur Fibrose, die eine Deformierung des umliegenden Gewebes zur Folge hat [13]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass in hypertrophen Narben Myofibroblasten nach erfolgter Reepithelialisierung der Hautwunde nicht in Apoptose übergehen, sondern weiter kontrahierend auf die extrazelluläre Matrix wirken [13, 21]. Hierfür könnte aktives TGF- β 1 verantwortlich sein, das einerseits die Expression des ASMA in Myofibroblasten stimuliert [13, 22] und andererseits die Apoptose verhindert [11, 23].

1.4. Die Extrazelluläre Matrix

Fibroblasten, Chondroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen und Mastzellen bilden als Abkömmlinge von mesenchymalen Stammzellen die zellulären Komponenten des Binde- und

Stützgewebes. Diese Zellen sezernieren die Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM). Je nach Gewebetyp bildet die EZM ein Gerüst aus unterschiedlichen Anteilen von Makromolekülen wie Kollagenen, Elastin, Proteoglykanen, Fibronectin und Laminin, in dem die Parenchymzellen eingebettet sind [24]. Das von Fibroblasten, Myofibroblasten und Stromazellen produzierte Kollagen stabilisiert die einzelnen Zellen im Gewebeverband. Außerdem stellt die EZM ein Reservoir für Zytokine und Wachstumsfaktoren dar. Über Rezeptoren an der Zelloberfläche, den so genannten Integrinen, stehen Zellen mit ihrer extrazellulären Umgebung im Signalaustausch [25-29]. Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, an denen die Bindungen von Komponenten der EZM erfolgt. Nach Bindung wird eine intrazelluläre Signalkette ausgelöst, die zur Aktivierung des Zytoskelettes und zur Regulation der Genexpression über Proteinkaskaden führt [24].

Die EZM unterliegt durch den Einfluss von Proteasen, zum Beispiel MMP, dynamischen Veränderungen durch proteolytischen Abbau und Neusynthese von Molekülen wie zum Beispiel bei Entzündungen, Wundheilungsprozessen und Tumorinvasion [30].

1.5. Die Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen gehören zur Gruppe der Zink-abhängigen Endopeptidasen, die maßgeblich am proteolytischen Umbau der EZM beteiligt sind. Aufgrund ihrer Spezifität für alle Bestandteile der EZM stellen die MMP eine Schlüsselrolle in der Regulation der extrazellulären Homöostase dar [25]. Neben physiologischen Umbauprozessen, beispielsweise bei Wundheilung, Angiogenese und Knochenumbau, partizipieren MMP auch in zahlreichen pathologischen Prozessen wie Tumorinvasion, Fibrose und kardiovaskulären Erkrankungen [31].

Die MMP werden verschiedenen Untergruppen zugeordnet. Entsprechend ihrer Substratspezifität und Struktur erfolgt eine Einteilung in: Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Stromolysine (MMP-3, MMP-10), Matrilysine (MMP-7, MMP-26, MMP-11), Membran-Typ MMP (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25), Makrophagen Elastase (MMP-12), Enamelysin (MMP-20), Epilysin (MMP-28), Cystein array MMP (MMP-23) und andere MMP (MMP-19, MMP-21, MMP-27) [32].

MMP werden als inaktive, latente Proenzyme von verschiedenen Zellen gebildet und in die EZM sezerniert. Ihre Regulation erfolgt auf der Ebene der Transkription, durch die proteolytische Aktivierung der Proenzyme und über die Inhibierung durch eine Reihe natürlicher Inhibitoren. Die latente Enzymform besitzt eine Prodomäne, die über eine kovalente Bindung zwischen Cystein und dem Zinkatom des katalytischen Zentrums der

MMP im Protein verankert ist. Bei der Enzymaktivierung wird die Cysteinbindung unterbrochen, die Prodomäne abgespalten und das katalytische Zentrum freigelegt [30, 33-35]. Endogene Inhibitoren kontrollieren dabei die Aktivität der Proteinasen. Neben TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), den spezifischen Inhibitoren der MMP, sind alpha-2-Makroglobulin, Thrombospondin und der Zelloberflächenrezeptor RECK (Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs) als Inhibitoren der MMP bekannt [30].

Im Rahmen der Hautwundheilung kann die Aktivierung von Proenzymen über das in der provisorischen Matrix des Fibrinpfropfes enthaltene Plasmin geschehen [31]. Aktivierte MMP können wiederum andere MMP in die aktive Form umwandeln [35]. Die Gelatinase MMP-2 kann unter anderem durch MMP-1 und MMP-7 aktiviert werden und aktiviert selbst MMP-9 und MMP-13 [31]. Der Hauptaktivierungsweg von MMP-2 geschieht jedoch über MMP-14. Es ist nachgewiesen, dass die autokatalytische Aktivierung von Membran gebundener MMP-14 durch TIMP-2, TIMP-4 und synthetischen Inhibitoren der MMP (MMPI) gehemmt wird [36, 37]. MMP-2 wird über einen trimolekulären Komplex bestehend aus MMP-14, TIMP-2 und einem weiteren MMP-14 Molekül aktiviert [35, 37, 38].

1.6. Die Rolle von Gelatinasen in der Wundheilung

Im Zusammenhang mit Wundheilungsprozessen interessiert sich unsere Arbeitsgruppe besonders für die Wirkungsweise der Gelatinasen.

Gelatinase A (MMP-2) wird in Zellkulturen unter anderem von Keratinozyten, Endothelzellen, monozytären Leukozyten und dermalen Fibroblasten exprimiert [31, 39]. Gelatinase B (MMP-9) wird in Zellkulturen von Keratinozyten, polymorphkernigen Leukozyten, nicht aber von Fibroblasten produziert [31, 40-42]. In Organkulturen allerdings exprimieren Fibroblasten ebenfalls MMP-9 [43]. Außerdem wird MMP-9 von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten invasiver Hautkarzinome gebildet [31]. Substrate der MMP-2 und MMP-9 sind neben Gelatine die Kollagene vom Typ I, IV, V, VII, IX, X und XIV sowie alpha-2-Makroglobulin, Fibronectin, Elastin, Vitronectin und Laminin [31]. Laminin und Kollagen Typ IV und VII sind Bestandteile der Basalmembran. Im Rahmen der Hautwundheilung werden diese in der Phase der Reepithelialisierung von Gelatinasen am Wundrand lysiert. Somit verlieren epidermale Keratinozyten die Verbindung zur Basalmembran und können zur Wunde hin migrieren [2, 44].

1.7. Synthetische Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen

Eine Veränderung der Aktivität von MMP durch ein gestörtes Wechselspiel zwischen MMP und ihren endogenen Aktivatoren und Inhibitoren spielt eine zentrale Rolle bei zahlreichen Erkrankungen wie z.B. Peridontitis [45], Arteriosklerose bei koronarer Herzkrankheit [46], rheumatoider Arthritis [47-49], Lungenemphysem sowie im Wachstum und in der Metastasierung von malignen Tumoren [47]. Um hierbei therapeutisch Einfluss nehmen zu können, wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl synthetischer Inhibitoren der MMP (MMPI) mit verschiedenster Wirkungsweise entwickelt. Eine Möglichkeit MMP zu inaktivieren besteht in deren Dislokation von Rezeptoren an der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix z.B. durch Heparin [50]. Goldsalze, die in der Arthritistherapie eingesetzt werden, hemmen die MMP-Aktivität durch Bindung an die Schwermetallseite der MMPs [51]. Chelatoren wie Hydroxamate, Phosphonate und Tetracycline inhibieren durch Binden am katalytischen Zinkion der MMP. Diese Chelatoren sind eher unspezifische Hemmstoffe, da sie alle Enzyme inhibieren, die katalytisch wichtige Zinkionen enthalten [50]. Um die Selektivität der Zink-Chelatoren für MMP zu erhöhen, wurden deshalb höher potente und selektivere Zink bindende Gruppen der MMPI entwickelt, wie z.B. Pyrone mit einer nachgewiesenen Selektivität für MMP-3 [52, 53]. Ein anderer Weg, die Spezifität der MMPI zu erhöhen, ist der Versuch, über allosterische Hemmung außerhalb des bei vielen MMP strukturell sehr ähnlichen katalytischen Zentrums Einfluss zu nehmen [54, 55].

1.7.1. Batimastat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein synthetischer, unspezifischer Hydroxamat-Breitbandinhibitor der MMP, das Batimastat (Batimastat; British Biotech Pharmaceuticals Ltd., Oxford, UK) verwendet. Das Molekulargewicht von Batimastat beträgt 477 kDa. Dieser MMPI ahmt die von den MMPs erkannten Proteinbindungsstellen am Substrat nach. Dadurch wird Batimastat von diesen Enzymen als Substrat erkannt, und führt zu einer reversiblen, kompetitiven Hemmung am aktiven Zentrum [56]. Batimastat inhibiert mit IC 50 Werten (Inhibierende Konzentration, bei der 50 % der Enzymaktivität gehemmt wird) von 3 nM für MMP-1, 4 nM für MMP-2, 20 nM für MMP-3, 10 nM für MMP-8 und 10 nM für MMP-9 [57].

1.8. Vorausgegangene Arbeiten und Zielstellung

In zahlreichen experimentellen Studien verzögerten selektive synthetische MMPI sowohl die Migration von Keratinozyten in Wunden als auch die Wundkontraktion [58-61]. In einer vorangegangenen in vivo Studie von Mirastschijski et al. [62] wurde der Einfluss des

synthetischen Hydroxamat-Breitbandinhibitors Ilomastat auf die Wundheilung der Haut untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die systemische Anwendung von Ilomastat eine verzögerte Migration von Keratinozyten und eine reduzierte Wundkontraktion in Vollhautwunden induziert. Die Kenntnis des Wirkungsspektrums der MMP in der Wundheilung hatte sich zuvor nur auf die Beteiligung am Gewebeumbau und der Zellmigration beschränkt. Unbekannt ist bisher, ob eine lokale Behandlung ebenfalls die Wundkontraktion beeinflusst. Die Belastung des Organismus ist bei einer systemischen Applikation eines MMP-Breitband-Inhibitors vergleichsweise hoch, sodass die lokale Therapie eine erstrebenswerte, alternative Applikationsweise darstellt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der Wirkung des Hydroxamat-Inhibitors Batimastat auf die Wundheilung und Wundkontraktion der Haut bei einer lokalen Anwendung. In Anlehnung an die Studie von Mirastschijski et al. [62], wurde das gleiche Modell, die Wundheilung bei Vollhautwunden der Ratte, gewählt. Es sollte in dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob die Wundkontraktion auch über die lokale Applikation eines Hydroxamat-MMPI gehemmt werden kann. Die Erfassung der Inhibitorwirkung auf den Verlauf der Wundheilung erfolgte makroskopisch, mikroskopisch und biochemisch. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden die Epithelialisierung und Beschaffenheit des Granulationsgewebes der Wunden im histologischen Präparat, die Größe der Wunden zusätzlich makroskopisch gemessen. Der Beurteilung der Wundkontraktion diente zudem die immunhistochemische Darstellung des hierbei agierenden Zelltyps, der Myofibroblasten. Der hemmende Einfluss von Batimastat auf die lokalen MMP wurde durch die zymographische Analyse der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 erfasst.

Das langfristige Ziel dieser Studie besteht in der Entwicklung eines Lokaltherapeutikums zur Prävention von übermäßiger Wundkontraktion.

2. Material und Methoden

2.1. Tierexperimenteller Versuch

2.1.1. Versuchstiere

Die tierexperimentellen Untersuchungen waren von der Tierschutzkommission des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalt genehmigt und wurden entsprechend dem vorgelegten Tierversuchsprotokoll durchgeführt (Aktenzeichen: 42502-2-794).

Für alle Versuchsanordnungen wurden weibliche Sprague Dawley Ratten (Harlan-Winkelmann GmbH Deutschland, Borchern) mit einem Gewicht von 180-200 g verwendet. Die Versuchstiere wurden in Einzelkäfigen bei einer konstanten Temperatur von 20-22 °C unter einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Wasser und pelletierte Standardkost erhielten alle Tiere ad libitum. Zwischen Ankunft der Tiere und erster Behandlung lag eine Phase der Akklimatisation von 12 Tagen.

2.1.2. Synthetischer Matrixmetalloproteinasen-Inhibitor Batimastat

Der Breitbandinhibitor Batimastat wurde aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit als Suspension (10 mg/ml) in einem bei 37 °C gelierenden Hydrogel (Dr. August Wolff GmbH, Bielefeld, Deutschland) verwendet. Die Inhibitorkonzentration von Batimastat wurde in Anlehnung an eine vorausgegangene Studie mit einem ähnlichen, synthetischen MMPI (Ilomastat) gewählt, in der der Inhibitor die Keratinozytenmigration und Wundkontraktion in menschlichen Wunden beeinflusste [58]. Da es in Pilotversuchen zu bakteriell bedingten Wundinfektionen kam, musste dem Hydrogel sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe das Antibiotikum Gentamycin (100 µg/ml; PAA, Cölbe, Germany) beigemischt werden.

2.1.3. Versuchsgruppen

Zum Nachweis der lokalen Wirkung des MMPI Batimastat auf die Wundheilung der Haut wurden die Versuchstiere in 2 Behandlungsgruppen, einer Inhibitor- und einer Kontrollgruppe, zugeordnet. Dabei erhielt die Inhibitorgruppe eine Therapie mit dem Inhibitor in Hydrogel, die Kontrollgruppe wurde nur mit Hydrogel behandelt.

Um den Einfluss des MMPI auf die verschiedenen Stadien der Wundheilung beurteilen zu können, erfolgte eine Analyse an den postoperativen Tagen 4, 8 und 14. In beiden Behandlungsgruppen wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils 12 Tiere untersucht (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht zum Zeitverlauf der tierexperimentellen Versuchsanordnung
(VW: Verbandswechsel, OP: Operation, n: Anzahl, d: Tag)

Gruppen		Tag								
		0	2	4	6	8	10	12	14	
Kontrolle (Hydrogel)	Gruppe 14 d n = 12	OP	VW	VW	VW	VW	VW	VW	VW	Ende
	Gruppe 8 d n = 12	OP	VW	VW	VW	Ende				
	Gruppe 4 d n = 12	OP	VW	Ende						
Inhibitor (Bati- mastat in Hydrogel)	Gruppe 14 d n = 12	OP	VW	VW	VW	VW	VW	VW	VW	Ende
	Gruppe 8 d n = 12	OP	VW	VW	VW	Ende				
	Gruppe 4 d n = 12	OP	VW	Ende						

2.1.4. Versuchsdurchführung

Der Versuch begann am Tag 0 mit einem operativen Eingriff zum Setzen der Wunden. Die Tiere erhielten dazu eine Narkose durch intramuskuläre Applikation eines Gemisches aus Ketaminhydrochlorid (100 mg/ kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (5 mg/kg Körpergewicht). Danach wurde ein etwa 20 cm² großes Operationsareal auf dem Rücken unterhalb der Scapulae rasiert und anschließend mit Alkohol desinfiziert. Mit sterilen 8 mm Hautstanzen (Biopsy Punch, Stiefel Laboratorium, Offenbach am Main, Deutschland) wurden etwa 1,5 cm unterhalb der Scapulae auf einer Fläche von ca. 8 cm² vier Vollhautexzisionswunden gesetzt, jeweils 2 auf jeder Seite der Wirbelsäule. Die Wunden hatten einen Abstand von ca. 1 cm. Nach Blutstillung wurden pro Vollhautwunde 100 µl Batimastat-Suspension bzw. 100 µl Hydrogel aufgetragen und nach Gelierung des Gels mit einem zugeschnittenen Pflaster (Gothaplast®, Gotha, Deutschland) abgedeckt (Abb. 1). Ein Verband, bestehend aus einer aufliegenden Mullkompressen und einem locker gewickelten Stretchverband (Peha Haft®, Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland), der um den Rumpf des Tieres angebracht wurde, gewährleistete den Verbleib und eine lang anhaltende Einwirkung des Behandlungsagens auf den Wunden. Um ein Abstreifen des Verbandes durch

das Tier zu verhindern, wurde dieser zusätzlich an einer Tierweste (Lomir®, Lomir Biomedical Inc., Ontario, Kanada) fixiert (Abb. 2).

Alle zwei Tage fand unter einer Narkose mit Ketaminhydrochlorid (intramuskulär, 100 mg/kg Körpergewicht) ein Verbandswechsel statt. Dabei erfolgte nach schonender Reinigung der Wunden mit physiologischer Kochsalzlösung eine makroskopische Beurteilung der Wundverhältnisse. Als Kriterien dienten die Sekretion von Eiter oder Flüssigkeit, Umgebungsrötung, die Kontraktion des Wundrandes und die Bildung von Schorf. Anschließend wurden pro Wunde 50 µl Batimastat-Suspension bzw. 50 µl Hydrogel appliziert und wie oben beschrieben erneut ein Verband angelegt. Die zunehmende Reduktion der Wundgröße während des Heilungsprozesses bedingte, dass nur noch eine reduzierte Menge des Hydrogels und der Batimastat-Suspension appliziert werden konnte. Am jeweils letzten Untersuchungstag einer Versuchsgruppe (postoperativer Tag 4, 8 oder 14) erhielten alle Tiere 1 Stunde vor Versuchsbeginn eine intramuskuläre Injektion des Thymidin Analogons 5-bromo-2'-desoxyuridin (BrdU, 50 mg/kg Körpergewicht, B9285, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Am narkotisierten Tier (intramuskulär, Ketaminhydrochlorid/Xylacinhydrochlorid, siehe oben) fand eine abschließende Wundbeurteilung statt. Im Anschluss wurden die Wundareale inklusive ca. 1,5 cm des angrenzenden Normalhautgewebes exzidiert und die Tiere durch Dekapitation getötet. Jeweils 2 exzidierte Wunden eines Versuchstieres wurden in gepuffertem Formaldehyd (4 %) für die histologische Analyse fixiert. Für biochemische Untersuchungen wurden die anderen 2 Wunden und das Normalhautgewebe bei -70 °C eingefroren.

Nach der Operation, bei jedem Verbandswechsel und am Versuchsende erfolgte neben der Gewichtsbestimmung der Tiere eine Fotodokumentation der Wunden mit Hilfe einer Digitalkamera. Dazu wurden jeweils die 2 untereinander, in einer Ebene liegenden Wunden zusammen mit einer auf dem Rücken des Tieres befestigten Millimeterskala fotografiert.

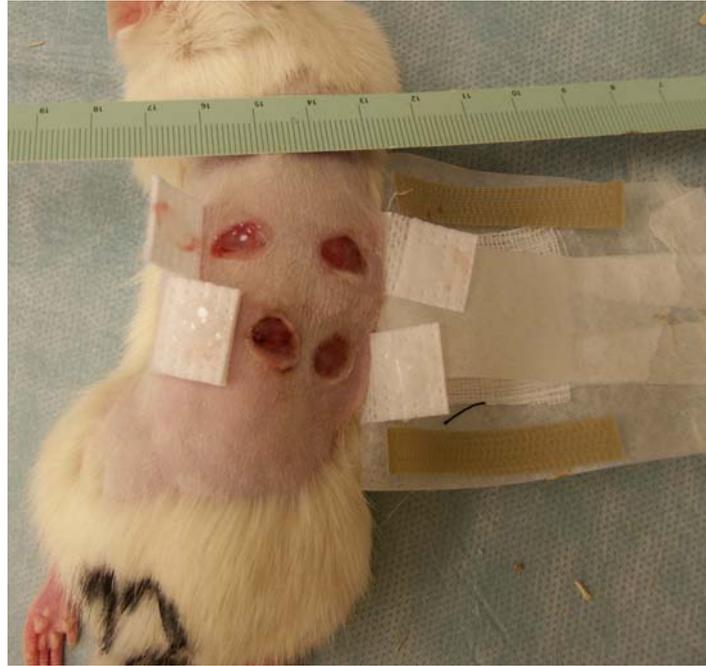


Abb. 1: Versuchstier beim Verbandswechsel



Abb. 2: Versuchstier mit Verband und Tierweste

2.2. Erfassung der Wundkontraktion durch Messung der Wundflächen

Die Analyse der digitalisierten Bilder erfolgte mit der Software AxioVision Release 4.5 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland). Die Wundflächen wurden durch Nachzeichnen des Wundrandes (definiert als Grenze zum inneren, sich feucht zeigenden Wundbereich) gemessen, wobei die jeweilige Millimeterskala als Kalibrierhilfe diente. Aus den 4 pro Tier gemessenen Wundflächen wurde ein Mittelwert gebildet, welcher die mittlere Wundgröße eines Versuchstiers darstellte. Trotz gleichmäßiger Verwendung einer 8 mm Hautstanze bei allen Tieren, war am Tag der Operation eine relativ große Variation der Wundgrößen feststellbar. Deshalb wurde die Wundgröße am Tag 0 auf 100 % normiert.

2.3. Histologie und Immunhistochemie

2.3.1. Einbettung der Proben

Die Proben wurden nach der Fixierung gespült, entwässert und in Paraffin eingebettet (Details siehe Anhang Punkt 10.1.). Zur leichteren Orientierung wurde die Mitte der Wunde (größter Durchmesser in kranio-kaudaler Ausrichtung) mit Hilfe von chirurgischem Nahtmaterial markiert.

2.3.2. Herstellen von Hautschnitten

Von den eingebetteten Hautproben wurden in der Wundmitte (siehe Punkt 2.3.1.) mit dem Rotationsmikrotom (RM 2135, Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland) 5 µm dicke Gewebeschnitte vertikal zur Oberfläche hergestellt. Die Schnitte wurden in ein Wasserbad überführt, auf mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) behandelten Superfrost®Plus Objektträgern (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und nachfolgend auf einer 50 °C warmen Streckplatte (HI1220, Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland) gestreckt. Nach Abziehen des überschüssigen Aqua dest und kurzem Antrocknen trockneten die Schnittpräparate bei 60 °C über 18 bis 24 Stunden.

Die Präparate wurden so auf mehrere Objektträger verteilt, dass für die nachfolgend geplanten Färbungen (Übersichtsfärbung, Immunhistochemischer Nachweis von BrdU und ASMA) alle Schnitte innerhalb einer Spanne von 200 µm eines Objekts lagen.

2.3.3. Histologie

2.3.3.1. Übersichtsfärbung

Als Übersichtsfärbung diente die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE). Nach Entparaffinieren der Hautschnitte wurden diese in einer absteigenden Alkoholreihe entwässert und gefärbt (Details siehe Anhang Punkt 10.2.). Zur Konservierung wurden abschließend alle Präparate mit Roti®HistoKitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingeschlossen.

2.3.3.2. Auswertung der Hämalaun-Eosin Präparate

Von den mittels HE gefärbten Hautschnitten wurden mit Hilfe einer Digitalkamera (AxioCam MRc; Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) am Lichtmikroskop bei 10 facher Objektivvergrößerung Bilder (1300 x 1030 Pixel) gewonnen und unter Verwendung der Bildanalysesoftware AxioVision Release 4,5 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) ausgewertet. Gemessen wurden die Länge des neu gebildeten Epithels (nE) / Epithelzunge (EZ, Benennung bei noch nicht geschlossener Wunde) über dem Granulationsgewebe (GG),

sowie die maximale Länge zwischen den subepithelialen Wundrändern = totale Wundlänge (gut sichtbar anhand des abrupten Übergangs zwischen der Extrazellulären Matrix des Normalgewebes und dem Granulationsgewebe der Wunde) (Abb. 3). Aus diesen Messwerten wurde der Anteil der bedeckten Wundzone berechnet. Untersucht wurden 2 Wunden pro Tier in Mehrfachanalysen von 3-6 Schnitten pro Wunde. Die daraus errechneten Mittelwerte ergaben den Messwert pro Tier, der in die weitere statistische Auswertung zur Ermittlung der Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen einging.

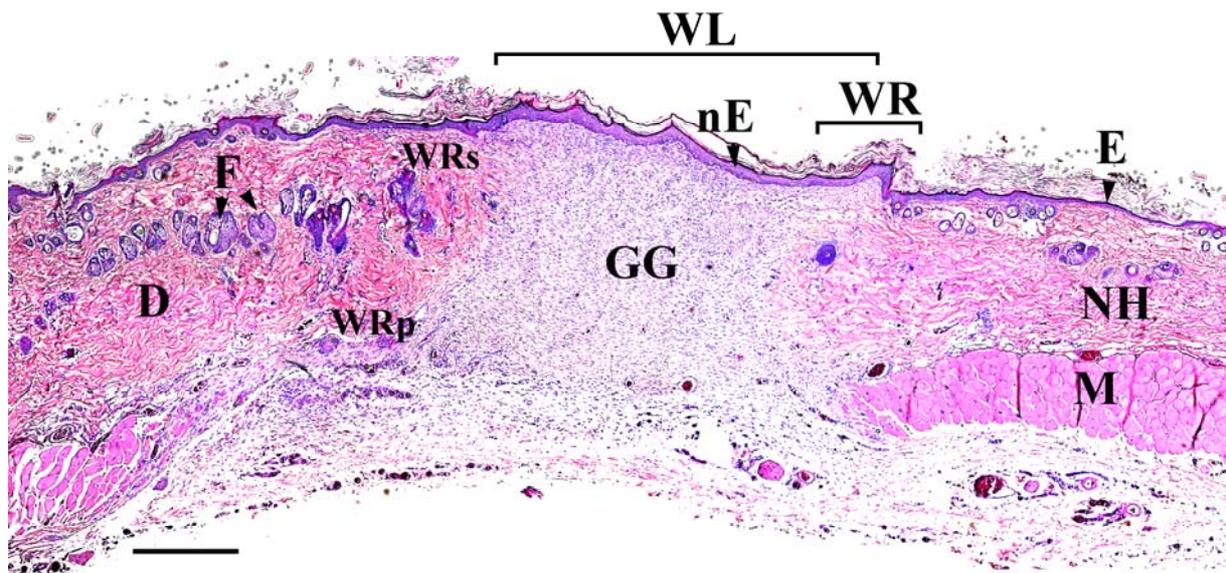


Abb. 3: Hämalaun-Eosin Färbung einer reepithelialisierten Wunde am 14. Tag postoperativ. D: Dermis, WRs: superfizieller Wundrand, WRp: profunder Wundrand, GG: Granulationsgewebe, WR: Wundrand, E: Epithel, nE: neues Epithel, NH: Normalhaut, M: Musculus carnosus, F: Haarfollikel, WL: totale Wundlänge
Maßstabsbalken: 500µm

2.3.4. Immunhistochemie

2.3.4.1. Immunhistochemischer Nachweis des BrdU

Um die Inkorporation von BrdU in der DNA und damit die Zellproliferation sichtbar zu machen, wurden die entparaffinierten und gespülten Hautschnitte zur Freilegung der Antigene zunächst in Zitrat-Puffer gekocht. Nach Hemmung der endogenen Peroxidase und Blockierung von unspezifischen Bindungen mittels Rinderserumalbumin und Kaninchennormalserum erfolgte die Inkubation mit dem primären monoklonalen Mausantikörper gegen BrdU (M744; DAKO, Glostrup, Dänemark) über Nacht bei 4 °C. Nach Bindung des primären Antikörpers wurden die Präparate mit dem sekundären Antikörper,

einem biotinylierten Kaninchen-Anti-Maus Immunglobulin G (E354; DAKO, Glostrup, Dänemark) behandelt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten Streptavidin und 3,3'-diaminobenzidine-HCl als Substrat. Ein Teil der Schnitte wurde mit dem Kernfarbstoff Hämalaun nach Mayer gegengefärbt (Details siehe Anhang Punkt 10.3.).

2.3.4.2. Auswertung der BrdU-Immunhistochemie

Die bei einer Objektivvergrößerung von 20 im Mikroskop sichtbare Immunreaktion der Wunden wurde mit Hilfe einer Digitalkamera aufgenommen und bildanalytisch ausgewertet (siehe Punkt 2.3.3.2.). Dabei wurde die Anzahl der BrdU-positiven Zellen in folgenden Hautabschnitten (Abb. 3) ermittelt:

- im Epithel der Normalhaut (NH) auf einer Länge von 900 μm in 2 mm Entfernung zur Wunde
- im gesamten, die Wunde überdeckenden neuen Epithel (nE, EZ),
- in der Epidermis des Wundrandes zu beiden Seiten der Wunde auf einer Länge von je 500 μm (WR)
- im zentralen Granulationsgewebe in einer Fläche von 0,16 mm^2 (GG).

Von jedem Versuchstier wurden 2 Wunden und die angrenzende Normalhaut in jeweils 3-6 Schnitten analysiert. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert pro Tier gebildet, der als Anzahl BrdU-positiver Zellen pro 1 mm bzw. 1 mm^2 umgerechnet wurde. Diese Werte waren Grundlage für die Ermittlung der Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen.

2.3.4.3. Immunhistochemischer Nachweis von ASMA

Nach Entparaffinierung und Spülen wurde in den Hautschnitten die endogene Peroxidase gehemmt und unspezifische Bindungen mittels Rinderserumalbumin und Kaninchennormalserum blockiert. Als primärer Antikörper wurde nachfolgend ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen menschliches ASMA (CBL 171; Chemicon, Temecula, Californien, USA) verwendet. Nach Bindung des primären Antikörpers erfolgte die Inkubation mit einem biotinylierten Kaninchen-Anti-Maus Antikörper. Zur Visualisierung wurde Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin mit DAB als Substrat eingesetzt (Details siehe Anhang Punkt 10.3.).

2.3.4.4. Auswertung der ASMA-Immunhistochemie

Die mikroskopische Auswertung der ASMA-Immunreaktion erfolgte semiquantitativ, indem die Intensität und die Flächenausdehnung ASMA-positiver Zellen jeweils auf einer Skala von 0 bis 3 bewertet wurden:

- eine fehlende positive Immunreaktion erhielt den Wert 0
- eine schwache Reaktion erhielt den Wert 1
- eine mittlere Reaktion erhielt den Wert 2
- eine starke Immunreaktion erhielt den Wert 3.

Folgende Regionen (Abb. 3) wurden ausgewertet:

- das Granulationsgewebe des Wundzentrums (GG),
- der superfizielle Wundrand (WRs), Dermis direkt unter dem Epithel
- der Wundrand in der tiefen Dermis (WRp)

Zusätzlich wurden die Anzahl der Gefäße im Wundrand und in der Wundmitte ermittelt, wobei im Wundrand eine Fläche von 0,25 mm² und in der Wundmitte 0,49 mm² pro Wunde ausgewertet wurden.

Von jedem Versuchstier wurde die ASMA-Reaktion in 2 Wunden analysiert. Aus den semiquantitativ von 0-3 eingeschätzten Ergebnissen wurde ein Mittelwert pro Tier gebildet. Das Ergebnis der Gefäßzählung wurde ebenfalls pro Tier gemittelt und auf eine Fläche von 1 mm² normiert. Diese Werte waren Grundlage für die Ermittlung der Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen.

2.4. Biochemische Analysen

Zur Bestimmung der aktiven und latenten Form der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 wurde die Methode der Gelatine-Zymographie gewählt. Hierfür wurden die Enzyme aus dem eingefrorenen Hautmaterial extrahiert, in Gelatine-haltigen Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und nachfolgend im Gel dargestellt. Die Zymographie beruht auf dem Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Das Zymographiegel enthält zusätzlich Gelatine, ein Substrat der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9. Die Gelatinasen verdauen die im Gel enthaltene Gelatine. Nach Inkubation werden die Gele entfärbt, wobei die Gelatine den Farbstoff bindet. An Stellen der Substratdegradation durch MMP färbt sich somit das Gel nicht an, weshalb die Enzyme als helle Banden auf dunklem Hintergrund dargestellt werden können.

2.4.1. Proben-Extraktion

Nach Auftauen der Hautgewebeproben von jeweils einer Wunde pro Tier wurden mittels Hautstanzen (Biopsy Punch, Stiefel Laboratorium, Offenbach am Main, Deutschland) Proben aus dem Wundzentrum (1 x 4 mm), dem Wundrand (4 x 2 mm) und der Normalhaut (3 x 3 mm) gewonnen. Die Proben wurden pro Region gepoolt, gewogen und mit Protease-Inhibitoren enthaltendem Extraktionspuffer (4 ml pro 100 mg Feuchtwicht), versetzt. Anschließend wurden die Proben unter kontinuierlichem Schütteln (Schüttler, Stuart®, Barloworld scientific, Staffordshire, Großbritannien) 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernen des Hautstücks wurden die gewonnenen Lösungen zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und der Überstand direkt im Anschluss zur weiteren Analyse abpipettiert (Details siehe Anhang Punkte 10.4.1., 10.4.2.).

2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den extrahierten Proben erfolgte mit dem DC Protein Assay von Bio-Rad (München, Deutschland) unter spektrophotometrischer Messung (SpectraMax 2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet (Details siehe Anhang Punkte 10.4.1., 10.4.3.).

2.4.3. Herstellung der Probenlösung

Jeweils 5 µg Protein pro Probe wurden in die Brunnen des Elektrophoresegels gegeben. Um ein konstantes Volumen der Proben zu erreichen, wurde das jeweilige 5 µg Probenvolumen mit Extraktionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt und mit 5 µl Probenpuffer versetzt (Details siehe Anhang Punkte 10.4.1., 10.4.4., 10.4.5.).

2.4.4. Elektrophorese

Zunächst erfolgte die Herstellung eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid Trenngels mit 0,5 mg/ml Gelatine (Details siehe Anhang Punkte 10.4.1., 10.4.4.). Die Gele bestehend aus Trenngel und Sammelgel, wurden frisch gegossen und direkt nach Auspolymerisation verwendet. Um die Proben auftragen zu können, wurde ein Kamm zur Bildung von 10 Gelbrunnen (Aufnahmevolumen je 30 µl) in das Sammelgel eingebracht. Nach Einsetzen der Gele in die Elektrophoresekammer (XCell SureLock™ Mini-Cell, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) wurde die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Gele mit dem gleichen Puffer überschichtet. Mittels einer Hämiltonspritze wurden dann je 25 µl der Probenlösung in die Gelbrunnen injiziert.

Parallel zu den Testproben wurde 20 µl eines humanen MMP-2 (50 ng/µl, Molekulargewicht 72 kDa)/ MMP-9 (50 ng/µl, Molekulargewicht 92 kDa) Standards (CC073, Chemicon, Temecula, CA, USA) pro Gel als Marker aufgetragen. Bei einer Stromstärke von 50 mA und maximaler Spannung durchwanderten die Proben in circa 2 Stunden das Sammelgel und Trenngel, bis diese durch den Farbstoff sichtbar auf Höhe der unteren Kammerelektrode angekommen waren. Danach wurde die Elektrophorese beendet und die Gele aus den Kammern gelöst (Details siehe Anhang Punkt 10.4.1., 10.4.4., 10.4.5.).

2.4.5. Enzymreaktion und -darstellung

Die Gele wurden nach Abtrennung des Sammelgels in Waschpuffer überführt und bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Stuart®, Barloworld scientific, Staffordshire, Großbritannien) zur Entfernung des SDS (hemmt die Enzymaktivität) gewaschen. Daran schloss sich die Inkubation der Gele in Zymo-Inkubationslösung über 16 Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler (Stuart®, Barloworld scientific, Staffordshire, Großbritannien) an.

Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau R-250 (Merck, Darmstadt, Deutschland). Zur Darstellung der hellen, „Gelatine-leeren“ Banden wurden die Gele im Anschluss schrittweise mit mehreren Lösungen entfärbt. Abschließend wurden die Gele für mindestens 3 Stunden in 3 %igem Glycerin eingelegt. Zur endgültigen Konservierung wurden die Gele beidseitig mit Cellofanfolie bedeckt, in einen Rahmen eingespannt und über mindestens 2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet (Dry Ease® Mini-Gel Drying, Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA) (Details siehe Anhang Punkte 10.4.1., 10.4.6).

2.4.6 Auswertung

Die gefärbten und getrockneten Gele wurden mit einem UMAX PowerLook 2100 XL (UMAX, Willich, Deutschland) gescannt (normiert auf 256 Graustufen) und die digitalisierten Bilder mit dem Mess-Tool für Gele der Software Image J 1.37v (public domain, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) analysiert. In den der Auftrennungssäulen angepassten Profil-Plots wurde nach Background-Korrektur für jede Enzymbande die integrierte optische Dichte (IOD, Fläche unter der Kurve) gemessen und auf den MMP-2 Standard normiert. Die Zuordnung der Gelatinasen mit ihrer latenten und aktiven Form erfolgte anhand des Bandenmusters des humanen MMP-2/ MMP-9 Standards. Die latente und aktive Form wurden in ihrer Summe als totale MMP-2 bzw. MMP-9 zusammengefasst. Die für die einzelnen Tiere erhaltenen Messwerte aus den verschiedenen Wundregionen wurden zur Reduzierung des Effekts interindividueller Unterschiede auf die Ergebnisse der jeweiligen Normalhaut bezogen, wobei die latente, aktive bzw. totale MMP-2 der Normalhaut mit 100

%, die in der Normalhaut nicht messbare MMP-9 mit dem Wert 1 festgelegt wurde. Zur Abschätzung des Verhältnisses zwischen der latenten und der aktiven Form wurden zusätzlich Berechnungen vorgenommen, in denen die totale MMP-2 bzw. 9 mit 100 % als Bezugswert eingingen. Die in dieser Weise für jedes Tier erhaltenen Werte wurden für die Behandlungs- und Zeitgruppen als Mittelwert \pm Standardabweichung zusammengefasst.

2.5. Statistik

Statistisch wurden alle Daten mit der Software SPSS 13.0 (SPSS Inc.; Chicago, Illinois, USA) ausgewertet. Für die Überprüfung der Unterschiede zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wurde an eine Varianzanalyse (ANOVA) der post hoc Test LSD angeschlossen. Die Differenzen zwischen den Behandlungsgruppen wurden mit dem U-Test nach Mann-Whitney geprüft. Als signifikant gelten $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

Der Vitalstatus der Tiere zeigte sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt durch die Lokaltherapie mit Batimastat beeinträchtigt. Postoperativ war eine Gewichtsabnahme um etwa 10 % des Ausgangsgewichtes in beiden Gruppen zu verzeichnen (Abb. 4). Bis zum 8. postoperativen Tag wurde in beiden Gruppen das verlorene Gewicht wieder kompensiert. Die Wundverhältnisse aller Versuchstiere waren klinisch über den gesamten Untersuchungszeitraum unauffällig.

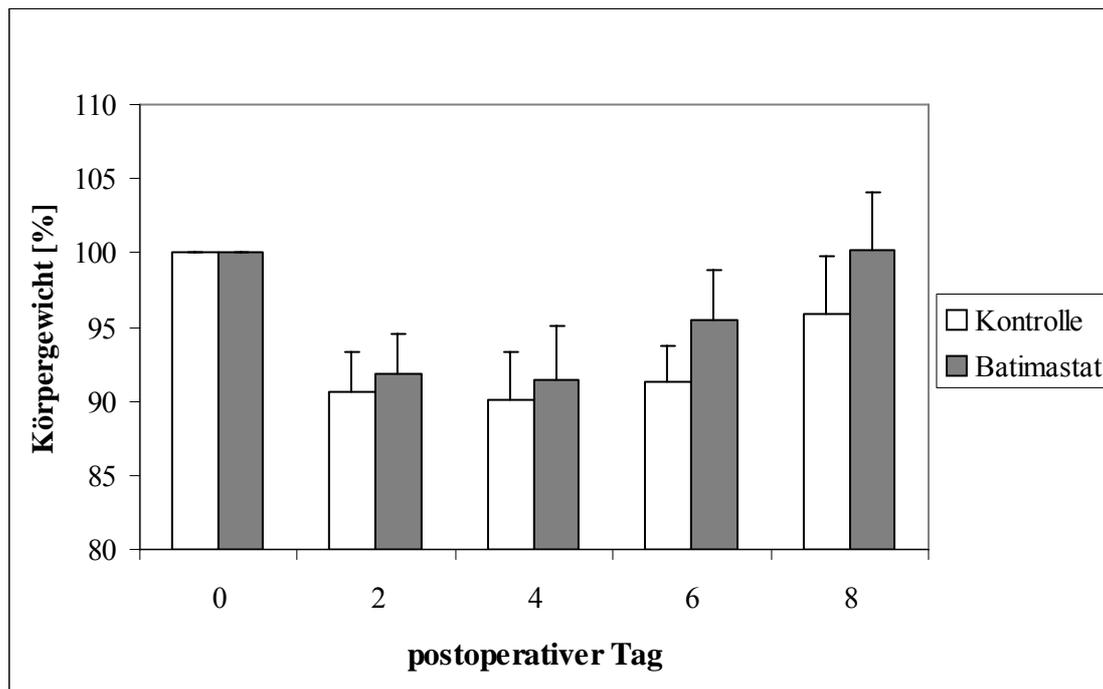


Abb. 4: Die Entwicklung des Körpergewichtes von Kontrollgruppe und Batimastat behandelte Gruppe bis zum 8. postoperativen Tag. Das Ausgangsgewicht wurde als 100 % angenommen. Es waren keine signifikanten Gruppenunterschiede vorhanden.

n = 24 (pro Gruppe), Mittelwert \pm Standardabweichung

3.1. Makroskopisch sichtbare Veränderung der Wundgröße

In der Kontrollgruppe konnte eine kontinuierliche Reduktion der Wundgröße im Zeitverlauf nachgewiesen werden (Abb. 5). Schon am 2. Tag nach der Operation verkleinerten sich die Wundflächen um 5 % auf 95 % der Ausgangsfläche, am 8. Tag waren es 21 %. Am 12. Tag waren die Wunden weitgehend, am 14. Tag komplett verschlossen. Auch in der Inhibitorgruppe nahm die Wundfläche bis zum 14. Tag ab, doch nicht in gleicher Kontinuität: am 2. postoperativen Tag nahm die Wundfläche auf 105 % der Ausgangsfläche zu. In den darauf folgenden Tagen verkleinerten sich die Wundflächen kontinuierlich, aber nicht so stark wie in der Kontrollgruppe: am 8. Tag hatte erst eine Reduktion auf 46 % stattgefunden, am

Tag 14 waren bei 9 der 10 Tiere noch nicht alle Wunden vollständig verschlossen. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren an den postoperativen Tagen 2, 8, 10, 12 und 14 statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Abb. 5).

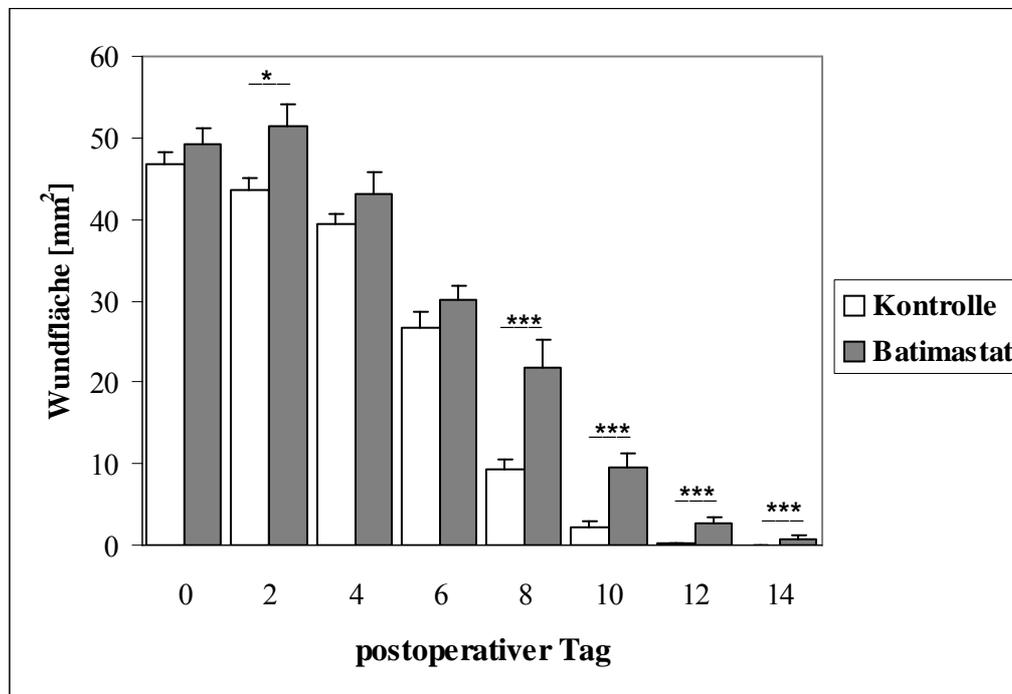


Abb. 5: Makroskopisch sichtbare Veränderungen der Wundflächen in Kontrollgruppe und mit Batimastat behandelte Gruppe an den postoperativen Tagen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14. Die Gruppenunterschiede an den postoperativen Tagen 2, 8, 10, 12 und 14 waren signifikant. $n = 12$ (pro Gruppe), Mittelwert \pm Standardabweichung, * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$

3.2. Histologie - Epithelialisierung und Größenveränderung der Vollhautwunden

Zur Darstellung der Migration von Keratinozyten wurden in den mit Hämalaun-Eosin gefärbten Hautschnitten die Länge des neu gebildeten Epithels und die totale Wundlänge als maximale Distanz zwischen den subepithelialen Wundrändern gemessen (Abb. 3). Die totale Wundlänge wurde unabhängig von der Reepithelialisierung und als maximale Distanz zwischen den subepithelialen Wundrändern definiert, die gut sichtbar anhand des abrupten Übergangs zwischen der Extrazellulären Matrix des Normalgewebes und dem Granulationsgewebe der Wunde war.

Die gemessene totale Wundlänge zeigte zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied zwischen den Gruppen. Jedoch hatte sich verglichen mit dem postoperativen Tag 8 die totale Wundlänge in beiden Gruppen am Tag 14 signifikant ($p < 0,05$) reduziert. In den Kontrollen fand eine Reduktion von $4229 \mu\text{m}$ auf $2905 \mu\text{m}$ ($p = 0,014$) und in der mit Batimastat behandelten Gruppe von $4396 \mu\text{m}$ auf $3352 \mu\text{m}$ ($p = 0,084$) statt (Abb. 6 a).

Die Vollhautwunden in Kontrolltieren epithelialisierten deutlich schneller verglichen mit Batimastat behandelten Tieren. Statistisch signifikant waren die Unterschiede am Tag 4 mit einer Epithellänge von 1236 μm in der Kontrolle zu 493 μm in der Inhibitorgruppe ($p = 0,007$) und am Tag 8 mit 4047 μm zu 2144 μm ($p = 0,014$) (Abb. 6 b).

Am 4. postoperativen Tag waren damit 28 % der Kontroll-Wunden im Gegensatz zu 11 % der mit Batimastat behandelten Wunden von neuem Epithel bedeckt ($p = 0,007$) (Abb. 6 b). Am 8. postoperativen Tag waren 96 % Kontrollwunden und 52 % der mit Batimastat behandelten Wunden epithelialisiert ($p = 0,013$) (Abb. 6 c). Am 14. Tag nach der Operation waren alle Wunden beider Gruppen vollständig mit Epithel bedeckt.

Die Länge des neuen Epithels reduzierte sich in der Kontrollgruppe signifikant zwischen 8. und 14. postoperativen Tag ($p = 0,014$). Hingegen konnte bei den mit Batimastat behandelten Wunden in dieser Zeit eine weitere, signifikante Zunahme des neu gebildeten Epithels nachgewiesen werden ($p = 0,027$) (Abb. 6 b).

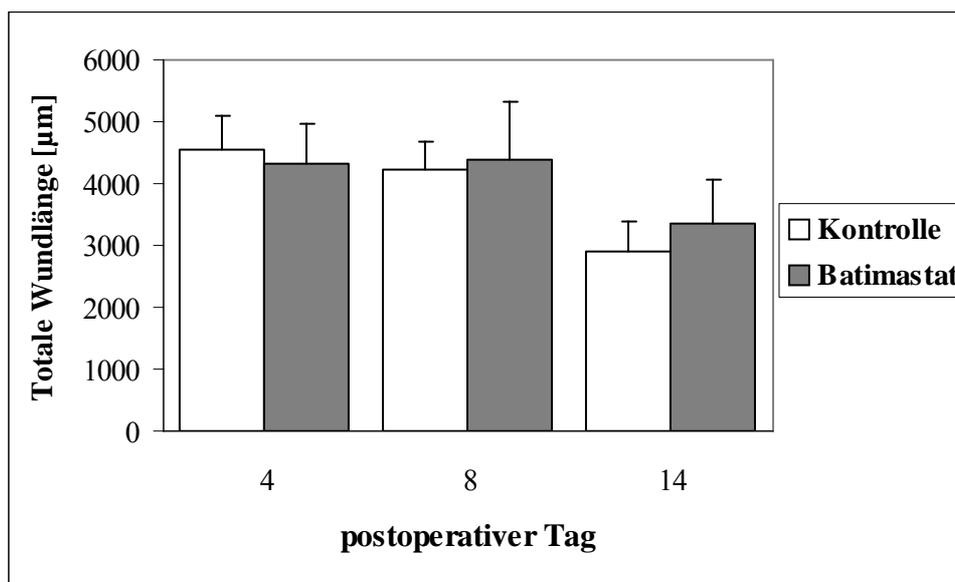


Abb. 6 a: Histologische Veränderung der totalen Wundlänge in der Kontroll- und mit Batimastat behandelten Gruppe zwischen dem 4. und 14. postoperativen Tag.

Batimastat zeigte keinen Einfluss auf die Veränderung der totalen Wundlänge.

$n = 12$ (pro Gruppe und Tag), Mittelwert \pm Standardabweichung

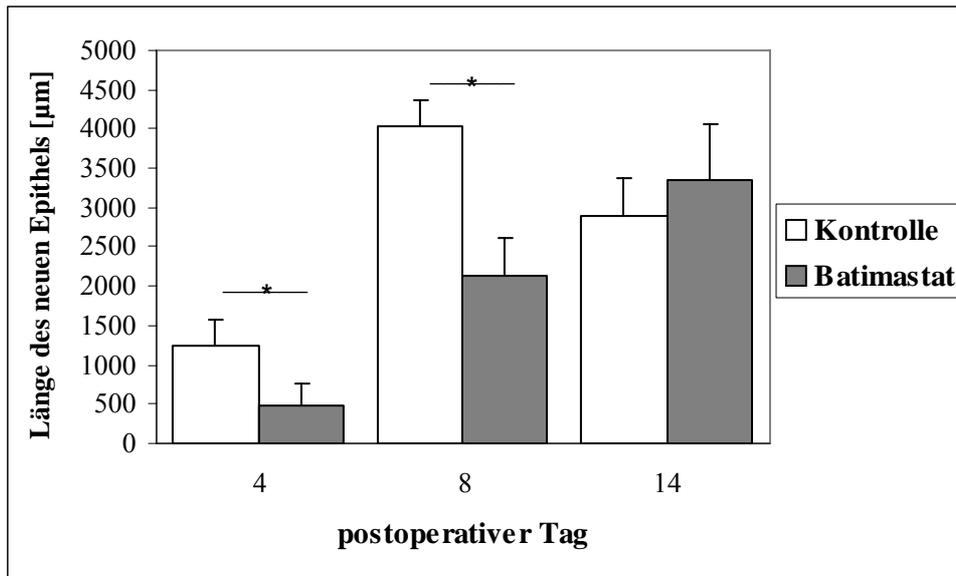


Abb. 6 b: Histologisch gemessene Länge des neu gebildeten Epithels über den Wunden von Kontroll- und mit Batimastat behandelter Gruppe zwischen dem 4. und 14. postoperativen Tag.

Am 4. und 8. postoperativen Tag wurde unter Batimastat-Behandlung signifikant weniger neues Epithel gebildet.

n = 12 (pro Gruppe und Tag), Mittelwert ± Standardabweichung, * p < 0,05

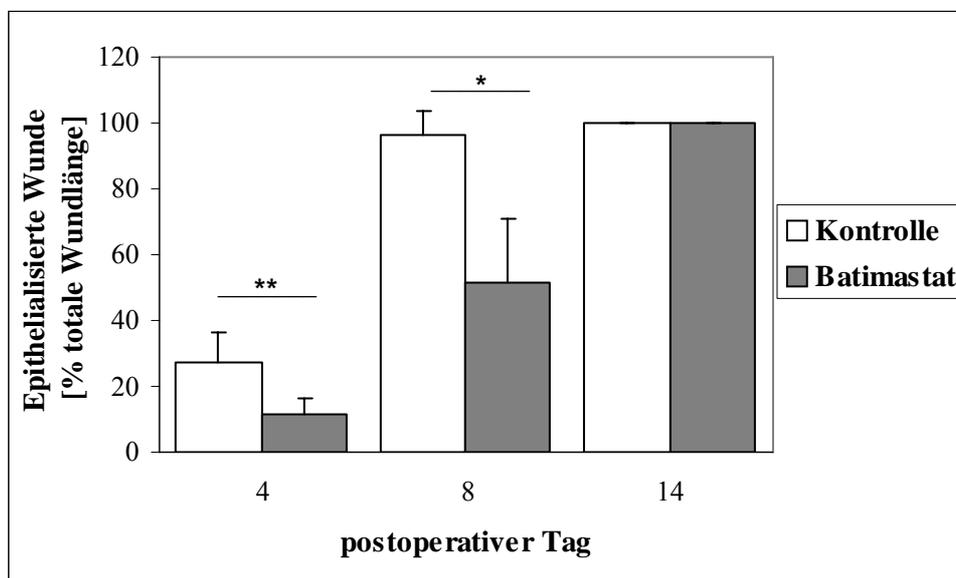


Abb. 6 c: Anteil des von Epithel bedeckten Wundbereiches an der totalen Wundlänge.

Vergleich der Kontroll- und mit Batimastat behandelten Gruppe zwischen dem 4. und 14. postoperativen Tag. Die mit Batimastat behandelten Wunden reepithelialisierten verzögert.

n = 12 (pro Gruppe), Mittelwert ± Standardabweichung, * p < 0,05, ** p < 0,01

3.3. Untersuchung der Zellproliferation mit Hilfe der BrdU-Immunhistochemie

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurde 1 Stunde vor Tötung der Versuchstiere das Thymidin Analogon BrdU intramuskulär injiziert. In immunhistochemischen Präparaten erfolgte an den postoperativen Tagen 4, 8 und 14 die Zählung von BrdU-positiven Zellen im Wundrand, in der Epithelzunge, im Granulationsgewebe der Wundmitte und in der die Wunde umgebenden Normalhaut (Abb. 7).

Die Anzahl an BrdU positiven Epithelzellen war in der Normalhaut über den gesamten Untersuchungszeitraum sehr gering und lag im Mittel zwischen 2,5 und 5 Zellen pro mm. In dieser Kontrollregion zeichnete sich weder über die Zeit noch zwischen den Behandlungsgruppen eine signifikante Veränderung ab (Abb. 8 a). Im Vergleich zur Normalhaut konnten im Wundgewebe generell eine deutlich höhere Proliferationsrate beobachtet werden. Im Epithel des Wundrandes wurde die höchste Anzahl BrdU markierter Zellen (Kontrolle: 22/mm, Inhibitor: 28/mm) am Tag 4 gemessen. Die Anzahl nahm in beiden Gruppen zum 8. Tag hin signifikant ($p < 0,05$) ab und blieb dann bis zum 14. Tag auf diesem Niveau. Über den gesamten Zeitraum waren immer signifikant mehr BrdU-positive Zellen pro Längeneinheit in der Inhibitorgruppe ($p < 0,05$) nachweisbar. (Abb. 8 a).

In der neu gebildeten Epithelzunge zeigte sich in beiden Gruppen am 8. Tag ein statistisch signifikanter Anstieg der Anzahl proliferierender Zellen, der aber in der Inhibitorgruppe wesentlich stärker ausfiel ($p < 0,05$). An den postoperativen Tagen 4 und 14 hingegen konnte in der Epithelzunge kein Gruppenunterschied festgestellt werden. Die beobachtete Erhöhung der Proliferationsrate am 8. Tag war zeitlich begrenzt, am 14. Tag entsprach die Anzahl markierter Zellen etwa wieder den Werten vom 4. Tag (Abb. 8 a).

Abb. 7: siehe folgende Seite

BrdU-Immunhistochemie in den Regionen Normalhaut (a), Wundrand (b) und Wundmitte mit Epithelzunge (c) eines mit Batimastat behandelten Tieres am 8. postoperativen Tag. Im Epithel der Wunde sind signifikant mehr BrdU-positive Zellen als in der Normalhaut nachweisbar. Zahlreiche markierte Zellen kennzeichnen zudem das Granulationsgewebe.

Die Pfeilköpfe markieren BrdU-positve Zellen, der Pfeil die Spitze der Epithelzunge.

E: Epithel, nE: neues Epithel, EZ: Epithelzunge, GG: Granulationsgewebe, D: Dermis, S: Schorf

Maßstabsbalken = 50 μ m

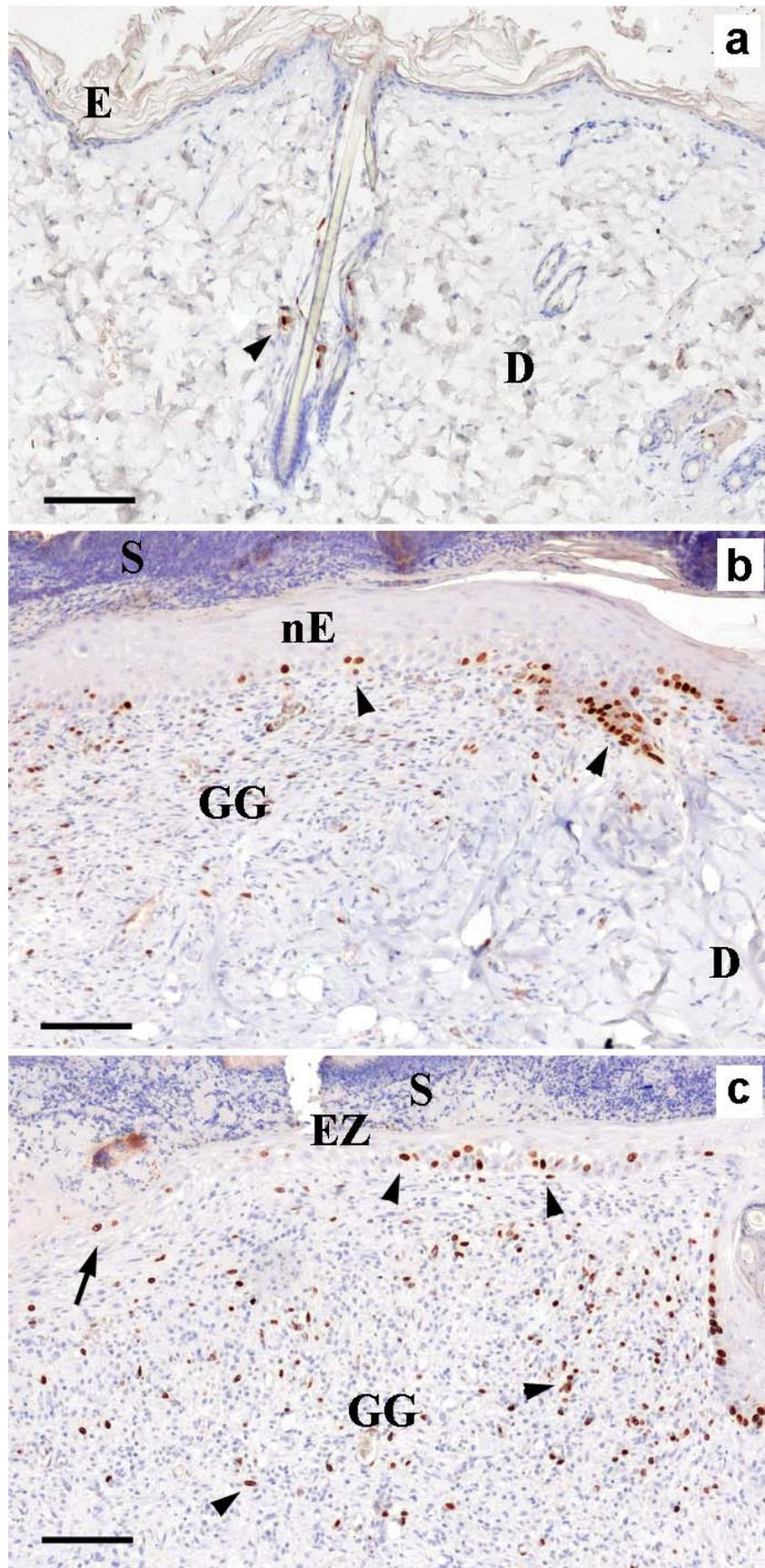


Abb. 7: Legende siehe Vorseite

Im Granulationsgewebe zeigte die Zellproliferation in den Behandlungsgruppen eine unterschiedliche Entwicklung. Während sich in der Kontrollgruppe vom 4. zum 8. Tag und erneut vom 8. zum 14. Tag die Anzahl BrdU-positiver Zellen drastisch verringerte ($p < 0,05$), war in der Inhibitorgruppe zwischen 4. und 8. Tag ein leichter Anstieg und erst dann eine deutliche Abnahme ($p < 0,005$) zu verzeichnen. Am 4. Tag konnten im Granulationsgewebe der Kontrollgruppe signifikant mehr proliferierende Zellen pro mm^2 als nach Inhibitoreinwirkung gefunden werden ($p = 0,022$), am 14. Tag waren es signifikant mehr Proliferationszellen in der mit Batimastat behandelten Gruppe ($p = 0,03$). Am Tag 8 war kein Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar (Abb. 8 b).

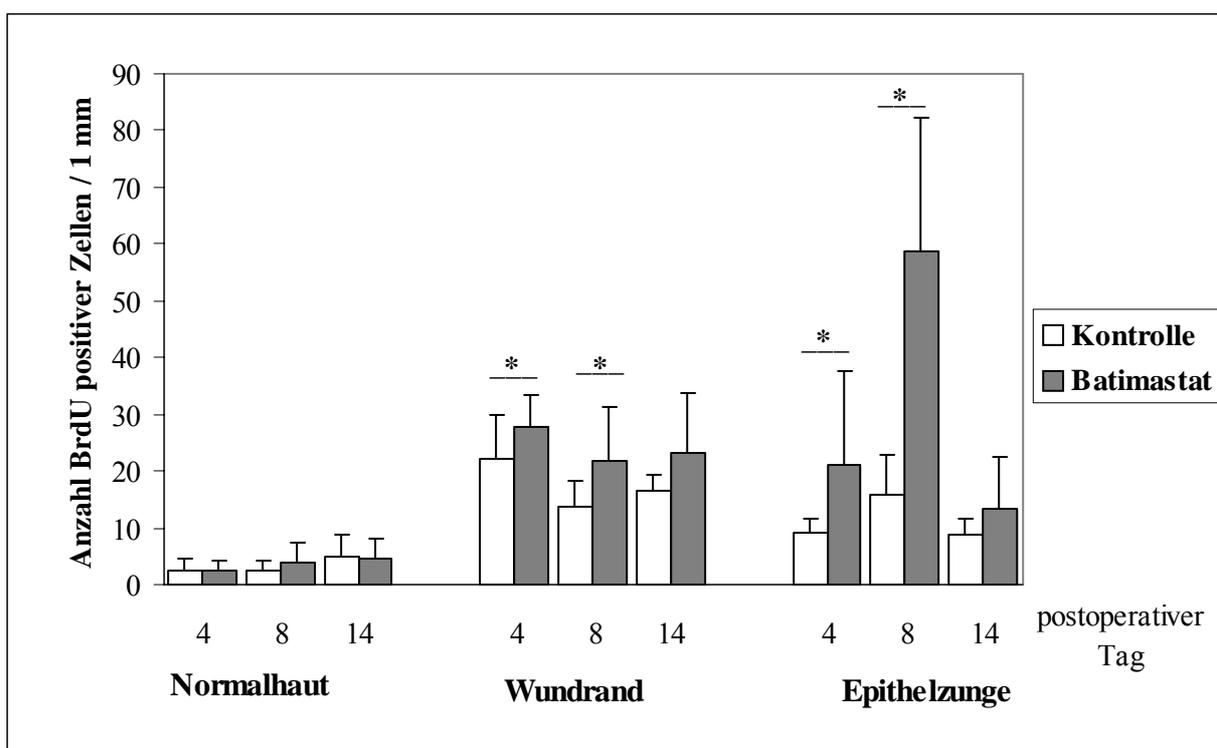


Abb. 8 a: Anzahl BrdU-positiver Epithelzellen pro 1 mm Epithel in normaler Haut, im Wundrand und in der sich neu bildenden Epithelzunge in Kontroll- und mit Batimastat behandelte Gruppe zwischen dem 4. und 14. postoperativen Tag.

Die Batimastat-Behandlung verursachte eine signifikante Steigerung der Anzahl proliferierender Zellen im Wundrand und in der sich neu bildenden Epithelzunge an den postoperativen Tagen 4 und 8.

$n = 12$ (Tag 4, Tag 14 pro Gruppe und Zeitpunkt), $n = 9$ (Tag 8 pro Gruppe und Zeitpunkt), Mittelwert \pm Standardabweichung, * $p < 0,05$

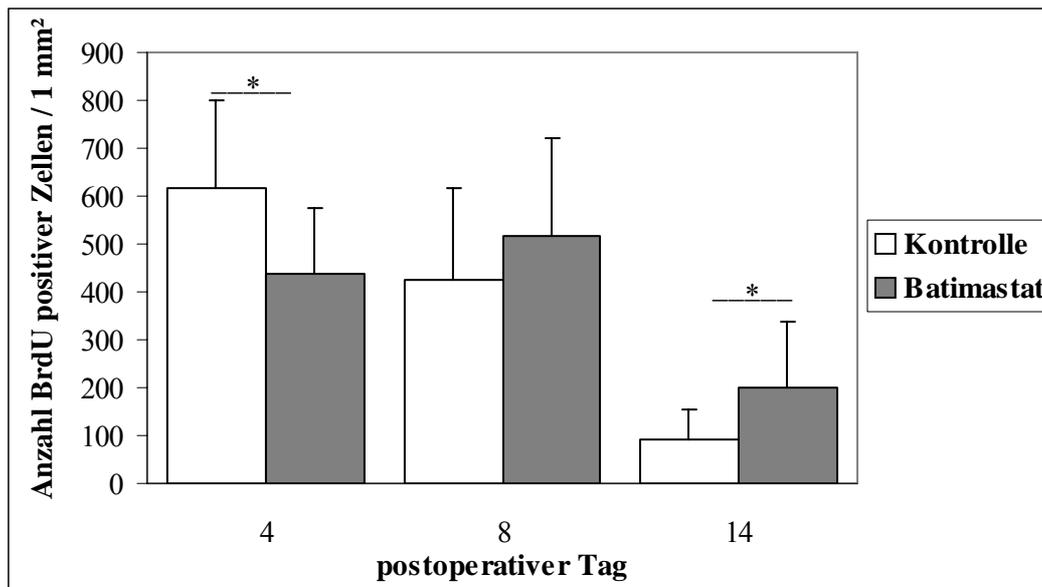


Abb. 8 b: Anzahl BrdU-positiver Stromazellen pro 1 mm² Granulationsgewebe in Kontroll- und mit Batimastat behandelte Gruppe zwischen dem 4. und 14. postoperativen Tag.

Batimastat behandelte Tiere wiesen am 4. Tag signifikant weniger und am 14. Tag signifikant mehr proliferierende Zellen im Granulationsgewebe auf.

n = 12 (Tag 4, Tag 14 pro Gruppe und Zeitpunkt), n = 9 (Tag 8 pro Gruppe und Zeitpunkt), Mittelwert ± Standardabweichung, * p < 0,05

3.4. ASMA-Immunhistochemie

Um den Verlauf der Wundkontraktion beurteilen zu können, wurden Myofibroblasten mithilfe des immunhistochemischen Nachweises von alpha-smooth-muscle-actin (ASMA) dargestellt. ASMA ist nicht nur in Myofibroblasten enthalten, sondern auch in glatten Muskelzellen. So wurden durch die Färbung ebenfalls die glatten Muskelzellen in Gefäßwänden und die Musculi erectores pili der Haarwurzeln im umgebenden Normalgewebe angefärbt. An den postoperativen Tagen 4, 8 und 14 erfolgten die semiquantitative Bewertung von Intensität und Flächenausdehnung der Immunreaktion in der tiefen und oberflächlichen Dermis des Wundrandes sowie im Granulationsgewebe der Wundmitte. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 9 a-b und 10 a-f zusammengefasst.

Am 4. postoperativen Tag konnten in der tiefen Dermis des Wundrandes, angrenzend zum Granulationsgewebe, Ansammlungen von ASMA enthaltenden Myofibroblasten in beiden Gruppen detektiert werden, wobei bei den Kontrolltieren signifikant mehr und häufig intensiver markierte Zellen zu finden waren (p = 0,042) (Abb. 9 a, b). In der oberflächlichen Dermis des Wundrandes wurden am 4. Tag ebenfalls in beiden Gruppen Myofibroblasten sichtbar, jedoch in deutlich geringerem Maße als in der tiefen Dermis. Auch hier

zeichnete sich eine intensivere und ausgedehntere Reaktion in der Kontrolle ab ($p < 0,05$). Im Granulationsgewebe der Wundmitte waren zu diesem Zeitpunkt keine Myofibroblasten zu beobachten.

Am 8. postoperativen Tag hatte sowohl die Intensität als auch die Flächenausdehnung der Immunreaktionen in der tiefen und superfiziellen Dermis des Wundrandes in beiden Behandlungsgruppen signifikant über die Zeit zugenommen ($p < 0,05$). Zwischen den Behandlungsgruppen war kein Unterschied feststellbar. Zu diesem Zeitpunkt waren auch in der Wundmitte zahlreiche ASMA-haltige Fibroblasten erkennbar, wobei in Kontrolltieren signifikant mehr aber nicht intensiver markierte Zellen auftraten ($p = 0,05$). (Abb. 9 a, b).

Am Tag 14 konnte im Vergleich zum 8. Tag in der Kontrollgruppe in allen Wundbereichen ein signifikanter Rückgang der Immunreaktion bezüglich Intensität und Ausdehnung beobachtet werden ($p < 0,05$). In der Inhibitorgruppe zeigte sich ein ähnlicher Verlauf nur in der tiefen Dermis des Wundrandes ($p < 0,05$). Im Bereich der superfiziellen Dermis des Wundrandes blieb die Reaktion bei Inhibitorbehandlung auf dem Niveau des 8. Tages, in der Wundmitte hingegen vergrößerte sich ihr Ausmaß signifikant ($p = 0,003$). Verglichen mit der Kontrolle, war die Intensität und Fläche der ASMA-Immunreaktion am 14. Tag in allen untersuchten Hautanteilen in der Inhibitorgruppe als signifikant größer einzuschätzen ($p < 0,01$) (Abb. 9 a, b).

Abb. 9 a: siehe folgende Seite

Semiquantitative Bewertung der Intensität der ASMA-Immunreaktion in Kontroll- und mit Batimastat behandelte Gruppe zwischen dem 4. und 8. postoperativen Tag. Bewertet wurde die Intensität der Immunreaktion im Granulationsgewebe der Wundmitte sowie in der tiefen und superfiziellen Dermis des Wundrandes.

Signifikante Gruppenunterschiede in der Wundmitte am 14. postoperativen Tag, in tiefer und superfizieller Dermis des Wundrandes an den postoperativen Tagen 4 und 14.

$n = 12$ (Tag 4, Tag 14 pro Gruppe und Zeitpunkt), $n = 9$ (Tag 8 pro Gruppe und Zeitpunkt), Mittelwert \pm Standardabweichung, * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$

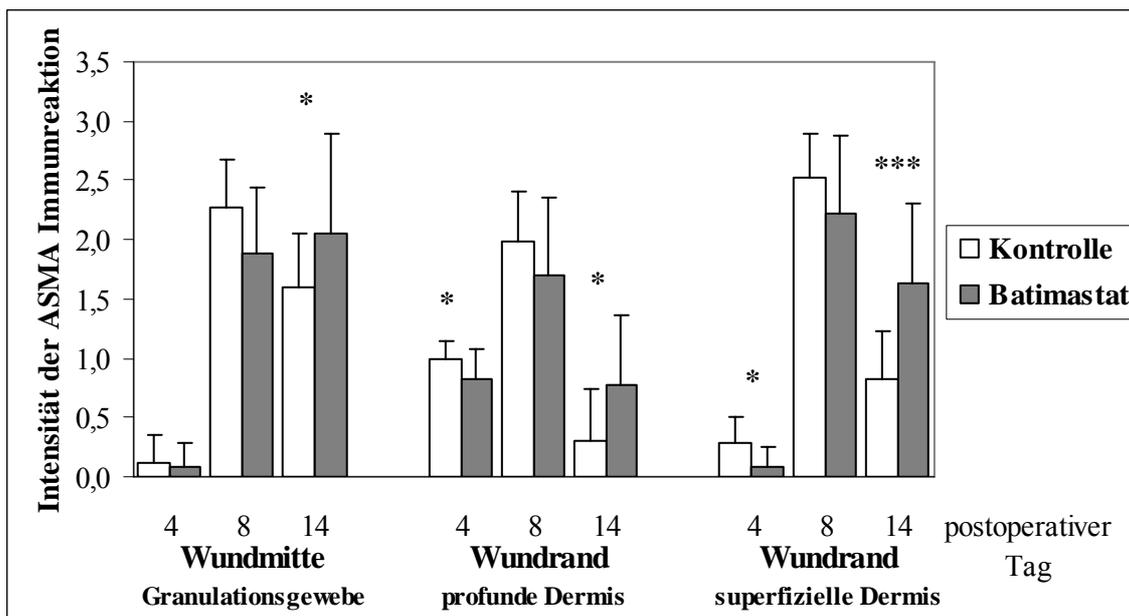


Abb. 9 a: Legende siehe Vorseite

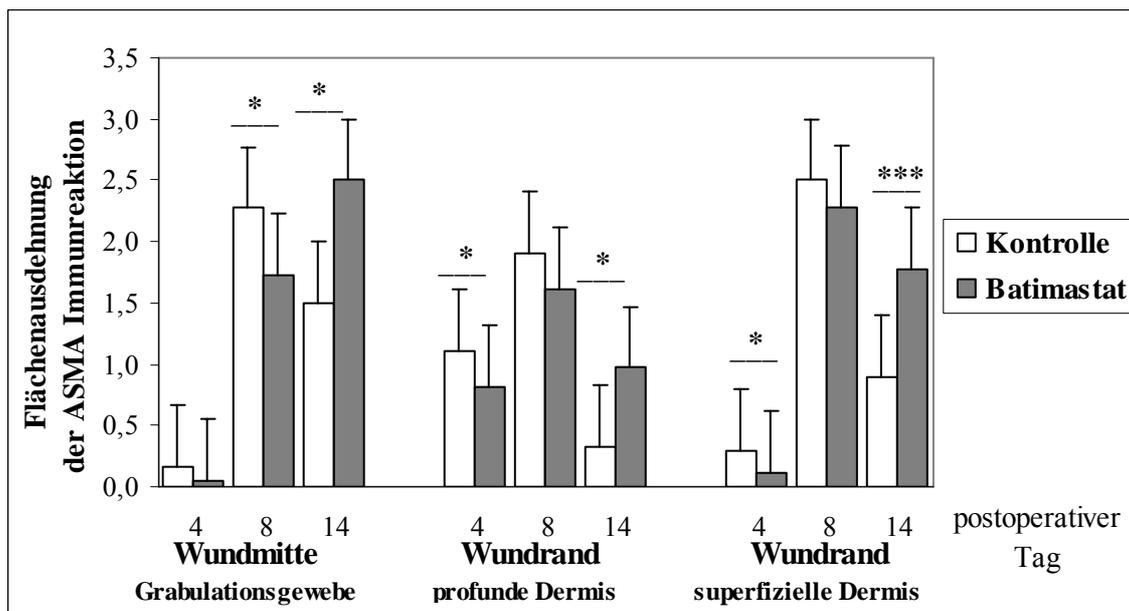


Abb. 9 b: Semiquantitative Bewertung der Flächenausdehnung der ASMA-Immunreaktion in Kontroll- und mit Batimastat behandelter Gruppe zwischen den postoperativen Tagen 4 und 14. Bewertet wurde die Flächenausdehnung der Immunreaktion im Granulationsgewebe der Wundmitte sowie in der tiefen und superfiziellen Dermis des Wundrandes.

Signifikante Unterschiede in der Wundmitte am 8. und 14. postoperativen Tag, in tiefer und superfizieller Dermis des Wundrandes an den postoperativen Tagen 4 und 14.

n = 12 (Tag 4, Tag 14 pro Gruppe und Zeitpunkt), n = 9 (Tag 8 pro Gruppe und Zeitpunkt), Mittelwert ± Standardabweichung, * p < 0,05, *** p < 0,005

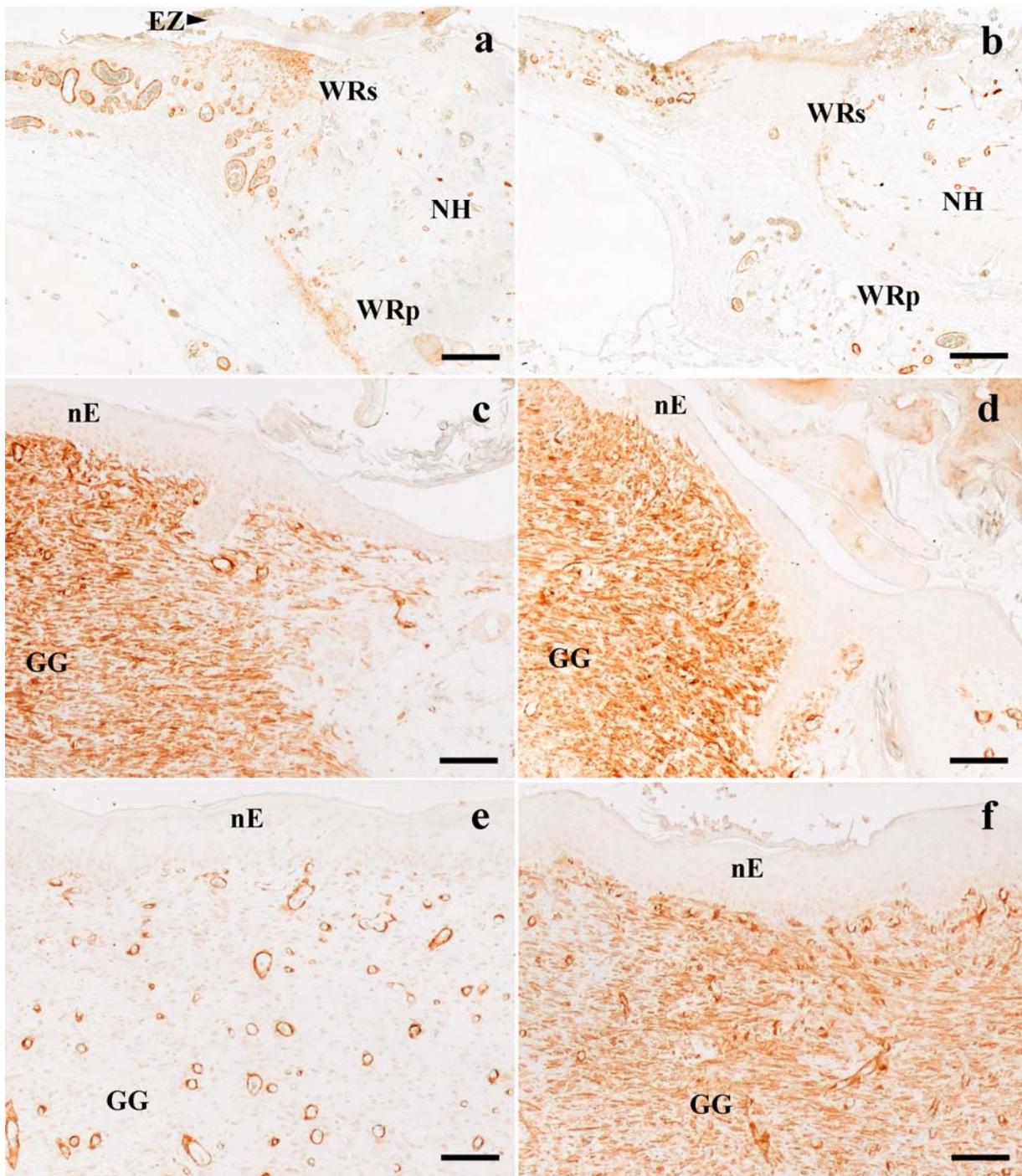


Abb. 10 a-f: ASMA-Immunreaktion in Kontrollgruppe (a),(c),(e) und mit Batimastat behandelter Gruppe (b),(d),(f) im Wundrand (a)-(d) und Wundmitte (e)-(f) am 4. (a)-(b), 8. (c)-(d) und 14.(e)-(f) postoperativen Tag.

Am 4. postoperativen Tag sind im Wundrand der Kontrolle bereits deutlich ASMA-positive Zellen zu erkennen. Am 8. Tag ist die Intensität der Reaktion zwischen den Gruppen weitgehend ausgeglichen. Am 14. Tag sind nach Batimastat zahlreiche Myofibroblasten markiert, während in der Kontrolle nur ASMA-positive Blutgefäße sichtbar sind.

EZ: Epithelzunge, nE: neues Epithel, WRs: superfizieller Wundrand, WRp: profunder Wundrand, GG: Granulationsgewebe, NH: Normalhaut

Maßstabsbalken: (a),(b): 200 µm, (c)- f): 100 µm

Neben Intensität und Ausdehnung der Immunreaktion fanden sich außerdem noch morphologische Unterschiede zwischen den Gruppen. Die ASMA enthaltenden Myofibroblasten der Kontrolle hatten eine deutlich spindelförmige Struktur und waren insbesondere in der Wundmitte auffallend parallel zum neuen Oberflächenepithel angeordnet (Abb. 11 a, b). In der überwiegenden Anzahl der Hautproben der mit Batimastat behandelten Gruppe hingegen waren zahlreiche abgerundete Myofibroblasten zu sehen, die nicht wie in der Kontrollgruppe zum Epithel streng ausgerichtet, sondern mehr irregulär verstreut im Gewebe lagen.

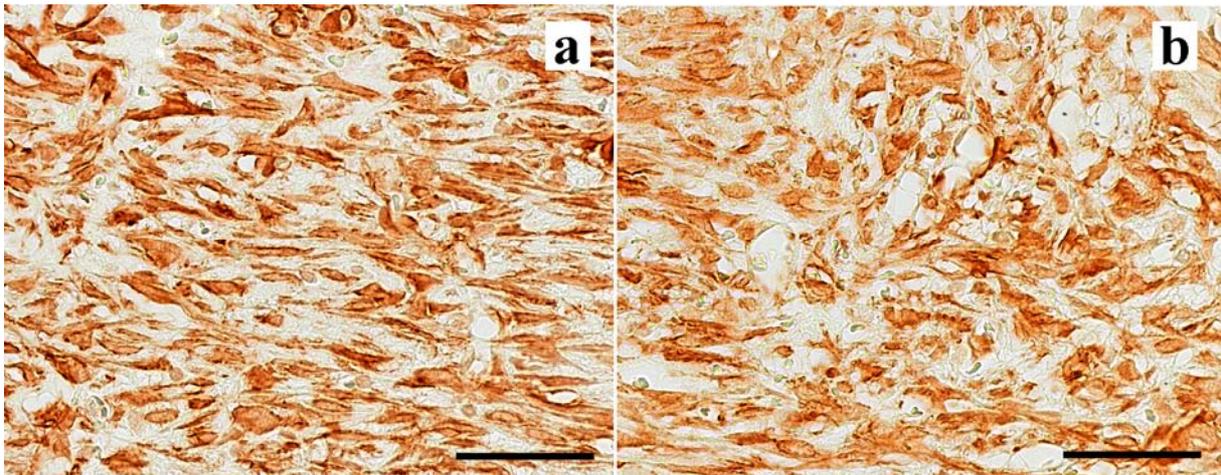


Abb. 11 a, b: ASMA-Immunreaktion in der Wundmitte eines Kontrolltieres (a) und in eines Batimastat behandelten Tieres (b). Batimastat bewirkte eine veränderte Morphologie und gestörte Ausrichtung der Myofibroblasten.

Maßstab balken: 50µm

3.5. Vaskularisierung im Wundbereich

Zur Beurteilung der Wundheilung wurde die Blutgefäßdichte gemessen. Blutgefäße stellten sich als ein Lumen umgeben von ASMA-positiven Zellen dar. In beiden Gruppen waren in beiden betrachteten Wundbereichen am 4. Tag nach Wundsetzung zahlreiche Gefäße nachweisbar, die höchste Gefäßdichte lag am 8. postoperativen Tag vor. Ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen wurde nur am 4. postoperativen Tag festgestellt: der Wundrandbereich der Kontrollgruppe enthielt signifikant mehr Gefäße pro Flächeneinheit als der der Inhibitorgruppe ($p = 0,027$). (Abb. 10 a, b)

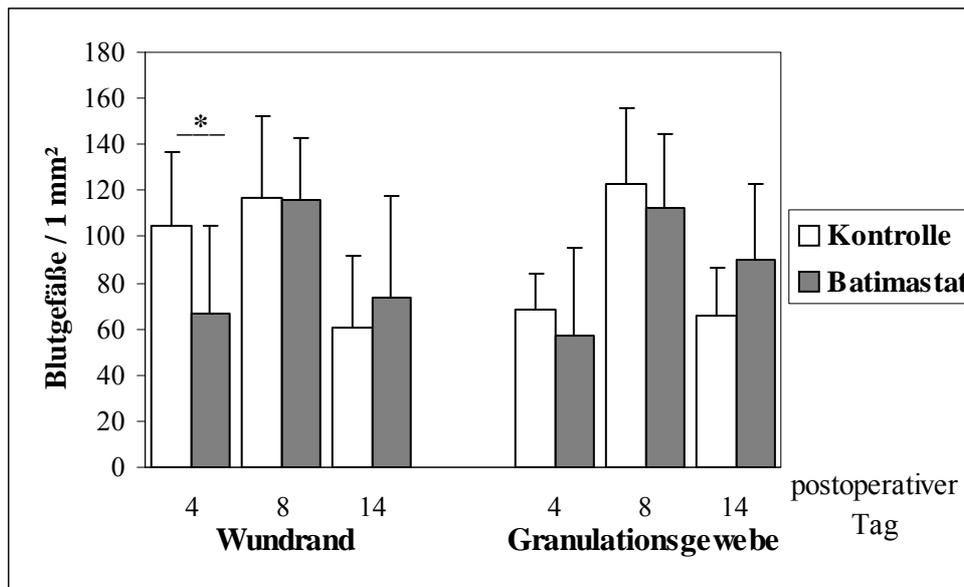


Abb. 12: Anzahl von Blutgefäßen pro 1 mm² Flächeneinheit im Wundrand und Granulationsgewebe von Kontroll- und mit Batimastat behandelten Tieren zwischen dem postoperativen Tag 4 und 14. Im Wundrand waren am 4. postoperativen Tag signifikant weniger Blutgefäße bei Batimastat-Behandlung nachweisbar.

n = 12 (pro Gruppe und Zeitpunkt), Mittelwert ± Standardabweichung, * p < 0,05

3.6. Gelatine-Zymographie: Veränderungen der MMP-2 und MMP-9 Sekretion

Mittels Zymographie konnten die aktiven und latenten Formen der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 gemessen werden. Untersucht wurden die Enzyme an den postoperativen Tagen 4, 8 und 14 im Rand und im Zentrum des Wundgewebes sowie in der umgebenden Normalhaut.

In der Normalhaut konnten geringe Mengen von MMP-2 in aktiver (im Mittel 25 % der Gesamt-MMP-2) und latenter Form (im Mittel 75 % der Gesamt-MMP-2) nachgewiesen werden, während sich MMP-9 zymographisch kaum darstellen ließ (Abb.13).

Abb. 13: siehe folgende Seite

Zymographische Darstellung der aktiven und latenten Formen der MMP-9 und MMP-2 in der Normalhaut, im Wundrand und Wundzentrum von Kontrolltieren am 4., 8. und 14. postoperativen Tag. In den Wundregionen war die in der Normalhaut fehlende aktive und latente MMP-9 bis zum 8. postoperativen Tag zu detektieren. Bei der MMP-2 war im Vergleich zur Normalhaut im gesamten Untersuchungszeitraum eine Zunahme der latenten Form zu verzeichnen

NH: Normalhaut, WR: Wundrand, WZ: Wundzentrum

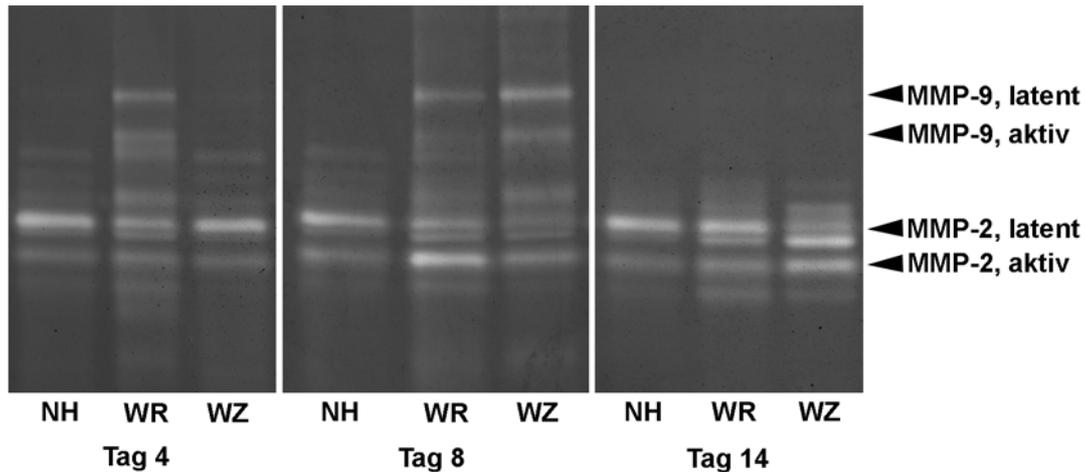


Abb. 13: Legende siehe Vorseite

3.6.1. MMP-2

Die Gesamtmenge der MMP-2 als Summe aus aktiver und latenter Form zeigte zu keinem Untersuchungszeitpunkt weder im Wundrand noch im Wundzentrum einen signifikanten Unterschied zwischen der mit Batimastat behandelten Gruppe und der Kontrolle (Abb. 14). Am 4. postoperativen Tag lag die Gesamtmenge der MMP-2 im Wundrand und im Wundzentrum unverändert auf dem Niveau der Normalhaut. Im weiteren Wundheilungsverlauf erhöhte sich die MMP-2 Gesamtmenge im Wundrand auf etwa 120 % der Normalhaut. Im Wundzentrum war eine gleichwertige Erhöhung erst am 14. Tag feststellbar. Zwischen dem 4. und 8. Tag war im Wundzentrum eine signifikante Reduktion der totalen MMP-2 in beiden Gruppen zu beobachten.

Betrachtet man die aktive und latente Form im Wundrand separat (Tab. 2), zeigten sich bereits am 4. Tag deutliche Veränderungen im Vergleich zur Normalhaut. Während sich in beiden Wundregionen die aktive MMP-2 auf etwa das 1 ½ fache erhöht hatte, nahm die latente Form um etwa ¼ ab. Am 8. Tag war die aktive MMP-2 auf das Doppelte angestiegen, die latente jedoch weitgehend unverändert geblieben. Am letzten Untersuchungstag hatte sich die aktive Form wieder dem Normalhautniveau (ca. 1/3 höher) angenähert, während die latente auf etwa 120 % der Normalhaut anstieg.

Im Wundzentrum war am 4. Tag ebenfalls ein Anstieg der aktiven und ein Abfall der latenten MMP-2 zu beobachten. Im Gegensatz zum Wundrand war jedoch am 8. Tag für die aktive wie auch die latente Form ein deutlicher Rückgang zu verzeichnen, welcher mit der ermittelten Reduktion der gesamten MMP-2 korreliert (Abb. 14). Am 14. Tag konnte für beide MMP-2 Formen die höchsten Werte gemessen werden (Tab 2).

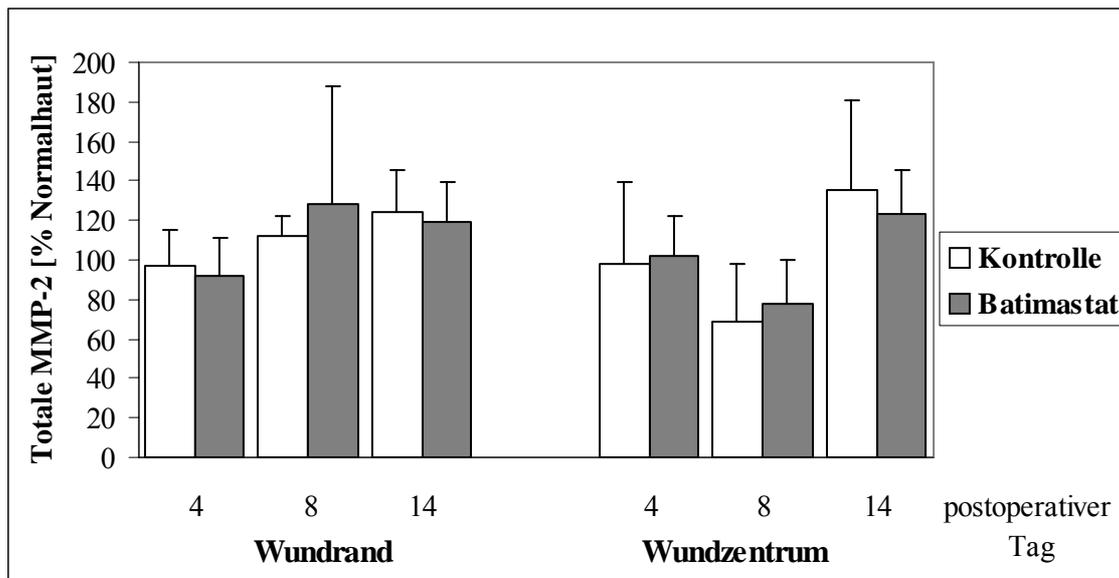


Abb. 14: Zymographisch ermittelte Gesamtmenge der Gelatinase MMP-2 im Wundrand und Wundzentrum in Kontroll- und mit Batimastat behandelter Gruppe. Die Messwerte wurden auf die Normalhaut normiert (totale MMP-2 der Normalhaut = 100 %).

Im Untersuchungszeitraum war zwischen den Gruppen kein Unterschied im Level der totalen MMP-2 feststellbar.

n = 12 (Tag 4, Tag 14 pro Gruppe und Zeitpunkt), n = 6 (Tag8 pro Gruppe und Zeitpunkt)
Mittelwert ± Standardabweichung

Tab. 2: Darstellung der aktiven und latenten Form der MMP-2 im Wundrand und im Wundzentrum in Kontroll- und mit Batimastat behandelter Gruppe an den postoperativen Tagen 4, 8 und 14. Die MMP-2 in der Normalhaut wurde mit 100% festgelegt.

Tag	Gruppe	Wundrand		Wundzentrum	
		MMP-2 aktiv	MMP-2 latent	MMP-2 aktiv	MMP-2 latent
4	Kontrolle	167,0 ± 47,6	78,4 ± 12,6	146,5 ± 65,0	85,2 ± 40,2
	Batimastat	145,1 ± 29,7	76,5 ± 18,1	143,9 ± 23,7	90,3 ± 24,5
8	Kontrolle	195,5 ± 40,6	98,4 ± 18,3	106,5 ± 27,0	64,7 ± 31,5
	Batimastat	207,0 ± 89,6	78,7 ± 62,9	117,9 ± 23,8	50,5 ± 30,9
14	Kontrolle	127,6 ± 19,0	116,9 ± 26,7	156,8 ± 50,1	111,2 ± 47,9
	Batimastat	138,2 ± 24,7	119,4 ± 19,6	178,6 ± 45,4	121,3 ± 22,9

n = 12 (Tag 4, Tag 14 pro Gruppe und Zeitpunkt), n = 6 (Tag 8 pro Gruppe und Zeitpunkt)
Mittelwert ± Standardabweichung, Daten = Prozent Normalhaut

3.6.2 MMP-9

Batimastat bewirkte im Wundrand eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der Gesamtmenge an MMP-9 am 4. und 8. Tag. Im Wundzentrum war erst am 8. und 14. Tag eine tendenzielle Erhöhung feststellbar (Abb. 15).

In beiden Wundregionen konnte die in der Normalhaut fehlende MMP-9 eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 15). Während im Wundrand die höchsten MMP-9 Werte bis zum 8. Tag messbar waren, erreichte das Enzym im Wundzentrum erst am 14. Tag seinen Höhepunkt. Am 14. Tag lag die MMP-9 im Wundrand bei den meisten Tieren wieder auf Normalhautniveau (in Kontrolle und Inhibitorgruppe in jeweils 7 von 9 Tieren). Auch im Wundzentrum war bei einem Teil der Tiere ein Rückgang des Enzyms zu verzeichnen (in der Kontrolle in 6 von 9 Tieren, in der Inhibitorgruppe in 5 von 9 Tieren).

Die aktive und latente MMP-9 veränderten sich im Zeitverlauf und durch den Einfluss des Inhibitors weitgehend analog zur Gesamt-MMP-9. Hierbei war im Wundzentrum die aktive MMP-9 dominierend, während im Wundrand beide MMP-9 Formen sich in etwa ausgeglichen zeigten (Tab 3).

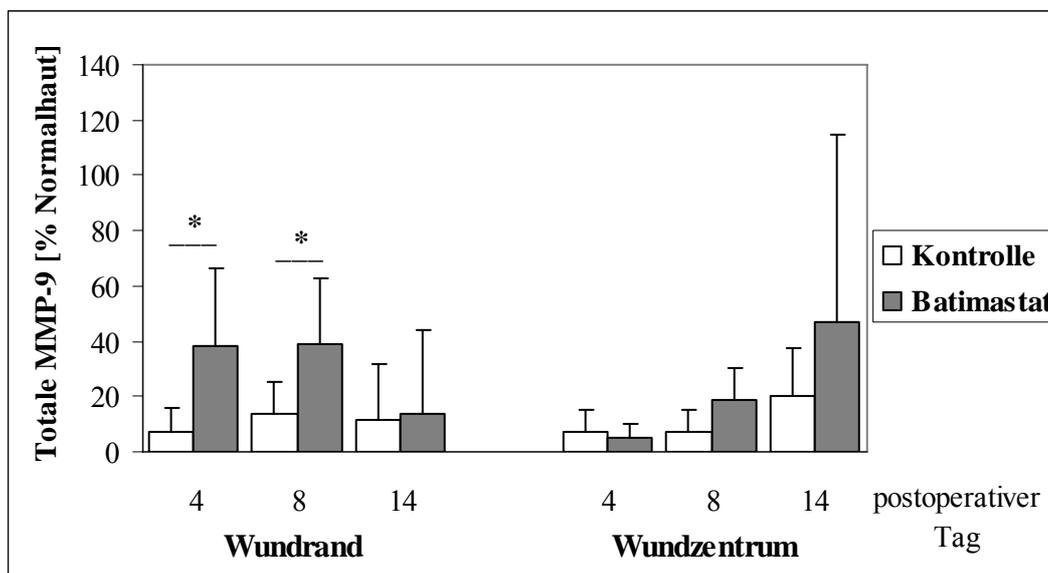


Abb. 15: Zymographisch ermittelte Gesamtmenge der Gelatinase MMP-9 im Wundrand und Wundzentrum in Kontroll- und mit Batimastat behandelter Gruppe. Die Messwerte wurden auf die Normalhaut normiert (totale MMP-9 der Normalhaut = 1).

Batimastat bewirkte im Wundrand am 4. und 8. Tag eine signifikante Zunahme der totalen MMP-9.

n = 12 (pro Gruppe und Zeitpunkt), Mittelwert \pm Standardabweichung, * $p < 0,05$

Tab. 3: Darstellung der aktiven und latenten MMP-9 im Wundrand und Wundzentrum in Kontroll- und mit Batimastat behandelter Gruppe an den postoperativen Tagen 4, 8 und 14. Die in der Normalhaut nicht messbare MMP-9 wurde mit 1 festgelegt.

Tag	Gruppe	Wundrand		Wundzentrum	
		MMP-9 aktiv	MMP-9 latent	MMP-9 aktiv	MMP-9 latent
4	Kontrolle	2,74 ± 4,02	4,97 ± 4,64	1,00 ± 0,00	7,04 ± 7,83
	Batimastat	20,33 ± 16,94	19,68 ± 11,00	1,00 ± 0,00	5,05 ± 5,29
8	Kontrolle	12,60 ± 9,87	15,48 ± 12,29	4,15 ± 4,28	10,83 ± 11,58
	Batimastat	36,71 ± 23,86	41,60 ± 24,72	9,56 ± 6,99	27,47 ± 16,57
14	Kontrolle	14,47 ± 27,13	8,36 ± 14,38	13,48 ± 22,77	27,80 ± 21,60
	Batimastat	15,96 ± 44,88	11,40 ± 20,67	32,77 ± 57,54	61,18 ± 83,34

n = 12 (Tag 4, Tag 14 pro Gruppe und Zeitpunkt), n = 6 (Tag 8 pro Gruppe und Zeitpunkt)
Mittelwert ± Standardabweichung, Daten = Vielfaches der Normalhaut

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Lokaltherapie von Vollhautexzisionswunden der Ratte mit dem synthetischen Hydroxamat-MMPI Batimastat in Hinblick auf die Wundheilung und Wundkontraktion der Haut untersucht. Die Lokaltherapie mit Batimastat zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf den Vitalstatus der Versuchstiere. Das Körpergewicht der Tiere mit und ohne Batimastat Behandlung unterschied sich nach einer postoperativen Gewichtsabnahme, die am 8. Tag wieder kompensiert wurde, nicht signifikant voneinander. In beiden Gruppen fand bei jedem Versuchstier eine Wundheilung statt, sodass am 14. postoperativen Tag makroskopisch (weitgehend) und mikroskopisch keine offenen Wundverhältnisse zu beobachten waren. Außerdem übte der Inhibitor keinen Einfluss auf das Fellwachstum und die umgebende Normalhaut aus. Postoperative Wundkomplikationen im Sinne von Blutungen, Infektionszeichen oder Nekrosen traten in beiden Gruppen nicht auf. Diese Ergebnisse zeigen die komplikationslose, lokale Anwendung des Inhibitors, um Wundheilungsprozesse beurteilen zu können. Außerdem kam Batimastat bereits in zahlreichen Studien sowohl in vitro als auch in vivo zum Einsatz, wobei keine direkte Zelltoxizität auf Keratinozyten festgestellt wurde [63, 64].

Es konnte eine signifikant verzögerte Wundheilung im Sinne einer verzögerten Reepithelialisierung der Wunden, sowie eine zeitlich signifikant verzögerte Wundkontraktion demonstriert werden. Die systemische Behandlung von Vollhautwunden mit dem Hydroxamat-MMPI Ilomastat zeigte in einer vorausgegangenen systemischen Studie, in der Wunden im gleichen Tiermodell bis zum 7. postoperativen Tag untersucht wurden, eine fehlende Wundkontraktion, fehlende ASMA-positive Myofibroblasten im Granulationsgewebe und eine stark reduzierte Keratinozytenmigration [62]. Offenbar wird der Inhibitor auch bei lokaler Applikation wirksam und ruft ähnliche, wenngleich auch verminderte Veränderungen im Wundheilungsprozess wie nach systemischer Therapie hervor. Es ist zu vermuten, dass durch die Progression der Wundheilung die Diffusion der immer gleich gebliebenen Menge des lokal angewandten Inhibitors zunehmend behindert wurde. Daher fanden mit zunehmendem zeitlichen Verlauf des Experimentes Epithelmigration und das Einwandern von ASMA-positiven Myofibroblasten in das Granulationsgewebe statt.

4.1. Epithelialisierung

Im histologischen Bild wird eine signifikant zeitlich verzögerte Reepithelialisierung der mit Batimastat behandelten Wunden deutlich. Verglichen mit den Kontrollwunden, die sich eine Woche postoperativ bereits zu 96 % mit Epithel bedeckt zeigten, waren erst 52 % der Inhibitorwunden reepithelialisiert. Zum Versuchsende waren alle Wunden in beiden Gruppen

vollständig mit neuem Epithel bedeckt. Offensichtlich wird der epitheliale Wundverschluss unter lokaler Inhibitoreinwirkung nicht wie nach systemischer Applikation [62] verhindert, sondern tritt nur zeitlich verzögert auf.

Eine reduzierte Migration von Keratinozyten unter Hydroxamat-MMPI Einfluss konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [58, 63]. Auch in einer ophthalmologischen Studie in Bezug auf Katarakte konnte unter Anwendung eines Hydroxamat-MMPI eine signifikante Reduktion der Migration von Epithelzellen der Linse nachgewiesen werden [65]. Diese Erkenntnisse verdeutlichen die Abhängigkeit der epithelialen Migration vom Einfluss der MMP. MMP im Allgemeinen und hier im Besonderen die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 degradieren *in vitro* Bestandteile der Basalmembran und Proteine der EZM und ermöglichen so die Keratinozytenmigration [58]. MMP-2 konnte immunhistochemisch in vielen Fibroblasten, in Endothelzellen und vor allem in dermo-epidermalen Verbindungen nachgewiesen werden. Außerdem wird MMP-2 konstitutionell in normaler Haut und der Epidermis exprimiert [66]. *In vitro* Studien [58] bestätigten die Hypothese, dass MMP-2 eine Hauptrolle in der Epithelialisierung von Wunden spielt [58]. MMP-9 wird vor allem in Zusammenhang gebracht mit der vertikalen Bewegung der Keratinozyten [58]. Verschiedene Studien stellten die essentielle Rolle von MMP-9 in der Zellmigration heraus. Die Migration von Keratinozyten wird verzögert durch MMP-9 blockierende Antikörper und auch durch unselektive MMPI [67]. Auch in der bronchio-epithelialen Zellmigration ist MMP-9 von essentieller Bedeutung [68].

4.2. Epitheliale und mesenchymale Proliferation

BrdU-immunpositive Zellen konnten in der Normalhaut beider Gruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum nur in einer geringen Zahl nachgewiesen werden. Wundheilung geht mit einer erhöhten zellulären Proliferation einher und dies zeigt sich anhand der deutlich erhöhten Zahl BrdU positiver Zellen im gesamten Wundgebiet beider Gruppen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die topische Behandlung mit Batimastat eine erhöhte epitheliale Proliferation in Vollhautwunden bewirkte. In der Epithelzunge wurde am 8. postoperativen Tag eine signifikant höhere Dichte proliferierender Keratinozyten in der Inhibitorgruppe detektiert. Außerdem waren im Epithel des Wundrandes über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant mehr proliferative Zellen in der mit Batimastat behandelten Gruppe nachweisbar. Die Proliferation wird offenbar nicht durch Batimastat gehemmt. Es wird häufig von der Annahme ausgegangen, dass sowohl MMP-2 als auch MMP-9 inhibitorische Effekte auf die Zellproliferation ausüben [69]. In verschiedenen Studien konnte ein antiproliferativer Effekt von MMP herausgestellt werden [70, 71].

Beispielsweise zeigte die Inkubation von Psoriasis Keratinozyten mit Batimastat eine signifikant erhöhte Zellproliferation. Der gleiche Effekt konnte auch durch Inkubation mit einem MMP-9 blockierendem Antikörper erzielt werden [71]. Der Zusatz des Hydroxamat-MMPI Ilomastat in eine Kultur von respiratorischen Epithelzellen erhöhte ebenfalls die Proliferation [70]. Bisher konnte allerdings nicht bewiesen werden, ob MMP direkt auf die Zellproliferation wirken. Es gibt viele Hinweise, dass MMP die Proliferation indirekt über die Aktivierung von TGF- β 1 beeinflussen [72] können. TGF- β ist unter anderem bekannt dafür, inhibierend auf die Proliferation und Migration von Epithelzellen zu wirken [73]. Yu und Stamenkovic [73] fanden heraus, dass TGF- β durch die Bindung von proteolytisch aktiver MMP-9 an den Hyaluronrezeptor CD-44 aktiviert wird. Der Rezeptor CD-44 befindet sich an der Zelloberfläche von Keratinozyten. Die Inhibierung der Aktivierung von TGF- β durch Batimastat könnte eine erhöhte Zellproliferation erklären [72]

Die in dieser Studie festgestellte erhöhte Anzahl proliferativer Epithelzellen der Epithelzunge in der Inhibitorgruppe könnte auch durch eine Art Stauung der proliferierenden Zellen verursacht sein. Durch den Batimastat-Einfluss werden die Keratinozyten an der Migration über das Granulationsgewebe gehemmt. (siehe Punkt 4.1.) Die Hemmung der MMP würde wie oben beschrieben bewirken, dass Bestandteile der Basalmembran und Tight Junctions nicht degradiert werden und somit eine laterale Migration der Keratinozyten nicht möglich ist. Die Länge der Epithelzunge ist deshalb in den Wunden der mit Batimastat behandelten Tiere bis zum Tag 8 deutlich verkürzt. Betrachtet man die Anzahl proliferierender Epithelzellen nicht pro Längeneinheit sondern pro gesamte Epithelzunge, ist kein Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar.

Wie im Epithel konnte auch im Granulationsgewebe eine signifikante Veränderung der Proliferation durch Batimastat beobachtet werden. Während am 4. postoperativen Tag in der Kontrolle signifikant mehr proliferierende Zellen zu detektieren waren, wies am 14. Tag die Inhibitorgruppe eindeutig mehr BrdU-positive Zellen auf. Der Proliferationsverlauf der Fibroblasten im Granulationsgewebe ist durch Batimastat offenbar zeitlich verzögert. Das steht im Widerspruch zur vorangegangenen systemischen Studie von Mirastschijski et al. [62], in der kein Inhibitoreinfluss auf die zelluläre Proliferation des Granulationsgewebes festgestellt wurde. Auch in einer Studie zum Einfluss von MMPI auf eine durch Fibroblasten induzierte Matrixkontraktion konnte kein Effekt des Hydroxamat-MMPI Ilomastat auf die Proliferation von Fibroblasten gefunden werden [74].

4.3. Makroskopischer und mikroskopischer Wundverschluss und Wundkontraktion

Die lokale Applikation von Batimastat auf Vollhautwunden führte zu einem signifikant verzögerten Wundverschluss. Bereits am 2. postoperativen Tag begannen die Wunden der Kontrolle sich zu schließen und reduzierten ihre Wundgröße auf 95 % der Ausgangsfläche, während die mit Batimastat behandelten Wunden ihre Fläche um 5 % vergrößerten. Danach reduzierte sich die relative Wundfläche in beiden Gruppen kontinuierlich mit unterschiedlichem Zeitverlauf: am 8. Tag lag die Wundfläche in der Inhibitorgruppe erst bei 46 % der Ausgangsfläche, wohingegen in der Kontrolle bereits eine Reduktion auf 21 % stattgefunden hatte. Die makroskopischen Untersuchungen wurden ergänzt durch ASMA-Immunhistochemie zur Detektion von Myofibroblasten, die zu den Haupteffektoren der Hautwundkontraktion gehören. Myofibroblasten entwickeln sich während des Wundheilungsprozesses aus Fibroblasten. Als Schlüsselreize in der Differenzierung von Fibroblasten zu kontraktilen Myofibroblasten sind Gewebetraction und TGF- β 1 bekannt. Der myofibroblastische Phänotyp wird dabei hauptsächlich von der Expression des ASMA bestimmt [10, 13, 75]. ASMA-positive Myofibroblasten waren in den untersuchten Vollhautwunden der Kontrollgruppe in höchster Dichte und streng paralleler Ausrichtung am 8. postoperativen Tag darstellbar. Die topische Behandlung mit Batimastat verzögerte das Auftreten von kontraktilen Myofibroblasten. Zudem lassen die veränderte Morphologie der Zellen und die eingeschränkte Ausrichtung im Zellverband auf eine Veränderung der Funktionalität der Myofibroblasten durch den Inhibitor schließen. Das ist in Übereinstimmung mit der beobachteten Verzögerung des makroskopisch sichtbaren Wundverschlusses nach Batimastat.

Eine Diskrepanz besteht zu den Resultaten der systemischen Studie bei Anwendung des Hydroxamat-MMPI Ilomastat [62]. Systemisch appliziertes Ilomastat führte zu einer Abwesenheit ASMA-positiver Myofibroblasten eine Woche postoperativ im Wundzentrum. Wenn man voraussetzt, dass Batimastat und Ilomastat als Hydroxamat-Inhibitoren eine im Grundsatz gleiche Wirkung hervorrufen, kann neben der in Betracht zu ziehenden stärkeren Inhibitorwirkung des Ilomastats (IC-50 für MMP-2: 0,5 nM, für MMP-9: 0,2 nM) auch die Applikationsart Ursache für die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse sein. Durch die zunehmende Epithelialisierung entsteht eine Diffusionsbarriere, durch die eine immer geringere Menge des lokal verabreichten Inhibitors das Wundzentrum erreicht. Bei der systemischen Therapie hingegen ist der MMPI kontinuierlich in konstanter Dosierung im Organismus vorhanden und kann seine Wirksamkeit gleichmäßig entfalten. Es war bisher nicht bekannt, ob die lokale Applikation von Batimastat den epithelialen Wundverschluss und

die Wundkontraktion vollständig verhindert. Wir konnten zeigen, dass bei lokaler Anwendung die Wunden bis zum Tag 14 trotz zwischenzeitlicher Verzögerungen komplett epithelialisiert und weitgehend verschlossen werden.

Ursächlich für die in dieser Studie nachgewiesene verzögerte Kontraktion kann die Inhibierung von TGF- β 1 durch Batimastat vermutet werden. Wie bereits dargelegt, gilt TGF- β 1 als der am meisten akzeptierte Stimulator in der Differenzierung von Myofibroblasten [11]. Erhöhtes TGF- β wird mit der Ausbildung von hypertrophen Narben und Fibrose in Verbindung gebracht [76]. MMP können nachweislich latentes TGF- β 1 der EZM aktivieren [77, 78]. Kürzlich wurde in einer in vitro Studie der Einfluss des MMPI Batimastat auf die Aktivierung von TGF- β 1 in dermalen Fibroblasten und die Differenzierung von Myofibroblasten untersucht. Dabei inhibierte Batimastat indirekt die Aktivierung von latentem TGF- β 1 durch Hemmung von MMP. Außerdem war die Umwandlung in ASMA-positive Myofibroblasten deutlich reduziert [72].

Das erst verzögerte Auftreten von ASMA-positiven Myofibroblasten in den mit Batimastat behandelten Wunden kann auch im Zusammenhang mit der gleichzeitig beobachteten verzögerten Reepithelialisierung betrachtet werden. Verschiedene in vitro Studien [79, 80] belegen, dass in gemeinsamen Kulturen von Keratinozyten und Fibroblasten signifikante Mengen an aktivem TGF- β produziert werden. Es ist möglich, dass durch den späten Wundverschluss die notwendigen epithelial-mesenchymalen Interaktionen auch erst verzögert eintraten und somit erst eine spätere Differenzierung in Myofibroblasten einsetzte. Dafür spricht die Hypothese des doppelt parakrinen Signalaustausches zwischen Keratinozyten und Fibroblasten. Keratinozyten stimulieren Fibroblasten, die wiederum Wachstumsfaktoren wie KGF und FGF sezernieren, die dann proliferativ auf die Keratinozyten wirken. Außerdem sind Keratinozyten selbst Quelle von Wachstumsfaktoren, die auch Fibroblasten stimulieren können. Unter der Kontrolle von Keratinozyten können sich in einer durch TGF- β dominierten Umgebung Fibroblasten in Myofibroblasten umwandeln [81]. Der möglicherweise durch die verzögerte Keratinozytenmigration bedingte gestörte Signalaustausch zwischen Keratinozyten und Fibroblasten könnte auch zu der oben genannten abnormen Gewebearchitektur des Granulationsgewebes in der mit Batimastat behandelten Gruppe geführt haben. Ähnliche histomorphologische Veränderungen wurden ebenfalls nach systemischer Applikation von Ilomastat beobachtet [62].

4.4. Sekretion von Gewebegelatinasen

Die MMP-2 Sekretion der mit Batimastat behandelten Gruppe ähnelte der der Kontrollgruppe in den analysierten Wundbereichen im Zeitverlauf. Biochemische Analysen normaler Haut zeigten, dass MMP-2 hauptsächlich in latenter Form vorliegt [82]. Während der Wundphase wird MMP-2 vermehrt gebildet wie auch aktiviert, der Anteil der latenten Form sinkt. Unser MMP-2 Ergebnis bestätigt die im Wundrand beobachteten Veränderungen nach systemischer Applikation von Ilomastat [82]. Jedoch besteht eine Diskrepanz in Bezug auf das Ergebnis der Wundmitte mit reduzierter, aktiver MMP-2 [82], einem Befund, der auch für epidermale, humane Wunden beschrieben wurde [58]. Eine mögliche Erklärung für diese divergierenden Ergebnisse kann die unterschiedliche Applikationsformen der MMPI oder aber auch die unterschiedlichen Wundmodelle und Spezies sein.

Die MMP-9 wurde während des Wundheilungsprozesses hochreguliert, sodass sich sowohl latente als auch aktive Form zymographisch darstellen ließ. In der normalen Haut ist sie kaum nachweisbar. Diese Hochregulation war signifikant im Vergleich zur Kontrolle in frühen Phasen der Wundheilung. Ähnliche Resultate wurden mit dem Hydroxamat-MMPI Ilomastat gesehen und zwar sowohl nach systemischer Therapie in der Ratte als auch nach lokaler Applikation auf epidermale, humane Wunden [58, 82]. Allerdings war in diesen Studien keine aktive Form der MMP-9 nachweisbar gewesen, die in unseren Untersuchungen in den Kontrolltieren und nach Batimastat sogar verstärkt auftrat.

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, besitzt Batimastat die Fähigkeit, die analysierten Enzyme MMP-2 und MMP-9 im nanomolaren Bereich zu inhibieren. In der vorliegenden Zymographie wurde jedoch eine Zunahme der aktiven Formen von MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen. Dieser scheinbare Widerspruch liegt in der Methode der Zymographie begründet. Während der elektrophoretischen Auftrennung dissoziiert Batimastat vom aktiven Zentrum des Enzyms, das im Anschluss die im Gel vorhandene Gelatine lysieren kann. Folglich ist die Gelatine-Zymographie zwar durchaus eine äußerst sensitive Methode, Gelatinasen in pro-Form und in aktivierter Form zu detektieren, jedoch erlaubt sie keine Aussage über die reale Aktivität der MMP *in vivo*. Aufgrund der unterschiedlichen Wundheilung der Versuchsgruppen kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt durch die Behandlung mit dem MMPI hervorgerufen wurde und *in vivo* die enzymatische Aktivität der aktivierten MMP durch kompetitive Hemmung des MMP Inhibitors Batimastat herabgesetzt war.

Die Batimastat-Behandlung bewirkte eine signifikante Zunahme der aktiven Form der MMP-9. Bei der MMP-2 wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Ursache hierfür sind möglicherweise

unterschiedliche Hauptaktivierungswege. Die MMP-9 wird vorwiegend durch Serinproteasen wie zum Beispiel Plasmin aktiviert [83], während MMP-2 durch einen trimolekulären Komplex bestehend aus MMP-14, TIMP-2 und einem weiteren MMP-14 Molekül aktiviert wird [35, 37, 38]. Batimastat hemmt als Breitbandinhibitor zwar verschiedene MMP, aber nicht die Serinproteasen. Somit ist die vermehrte Bildung aktiver MMP-9 in Gegenwart des Batimastats durchaus möglich. Für die MMP-2 hingegen wäre eine Abnahme der aktiven Form zu erwarten, was unter Ilomastat Einwirkung auch beobachtet wurde [58, 82]. Die fehlende Reduktion aktiver MMP-2 in unserem Versuch könnte durch verringerte MMP-14 Konzentration in der heilenden Wunde erklärt werden, da die Hemmung von MMP-14 eine höhere Konzentration von Batimastat erfordert im Vergleich mit der Inhibierung von MMP-2 und MMP-9.

Batimastat nimmt offenbar Einfluss auf Prozesse, die zu einer Vermehrung und Aktivierung von MMP-9 führen. MMP-9 degradiert Bestandteile der epidermalen Basalmembran, eine entscheidende Voraussetzung für die laterale Migration der Keratinozyten und somit für die Epithelialisierung [2]. Die durch Batimastat verminderte MMP-Aktivität nicht nur der MMP-9 sondern auch anderer MMP, wie zum Beispiel MMP-1 [84] führt vermutlich zu der festgestellten Störung der Reepithelialisierung. Eine kompensatorische Hochregulation der MMP-Sekretion durch die gehemmte Aktivität der Enzyme im Sinne eines Rebound-Phänomens ist durchaus wahrscheinlich, um die blockierte Migration zu überwinden.

Wie bereits ausgeführt kann aktive MMP-9 den latenten Wachstumsfaktor TGF- β aktivieren und aus Proteinverbindungen in der EZM lösen [77]. Aktiviertes TGF- β wirkt antiproliferativ auf Epithelzellen [73] und ist Schlüsselreiz in der Differenzierung von Myofibroblasten [11]. Die Beeinträchtigung der fibroblastären Funktionalität unter Batimastat-Behandlung und die gesteigerte epitheliale Proliferation im Wundrand könnten somit auf die verminderte Freisetzung und Aktivierung von TGF- β zurück zu führen sein.

Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen wurde in einer in vitro Studie mit humanen Keratinozyten in Zellkulturen kein Effekt von Batimastat auf die MMP-9 Sekretion gezeigt [63]. In Monozyten wurde MMP-9 durch TGF- β herunterreguliert [85]. In transgenen Mäusen bewirkte die Unterdrückung von TGF- β jedoch eine erhöhte MMP Expression in Pankreaszellen [86]. Auch wenn man berücksichtigen muss, dass zwischen in vitro und in vivo erhobenen Daten Diskrepanzen bestehen können, so verdeutlicht diese kontroverse Literaturlage zur Regulation von MMP-9 doch die Komplexität der beteiligten Signaltransduktionsmechanismen.

4.5. Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Kontraktion von Hautwunden unter lokaler Therapie mit dem MMPI Batimastat unter Vermeidung potentieller Nebenwirkungen einer systemischen Therapie. Der Effekt von Batimastat auf pathologische Wundkontraktion wurde in diesem Experiment nicht untersucht. Da Narbenkontrakturen vor allem beim Menschen auftreten, gibt es keine adäquaten Tiermodelle, um den Einsatz von MMPI in pathologischer Wundkontraktion zu studieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Stabilität kutaner Wunden unter Inhibitoreinfluss nicht beeinträchtigt ist und die Reißfestigkeit zunimmt [87].

Unter der lokalen Therapie mit Batimastat waren die Wunden zwar zeitlich verzögert aber am 14. postoperativen Tag verschlossen. Die intakte Epithelialisierung bei reduzierter Wundkontraktion würde im Gegensatz zum systemischen Wundverschluss für die topische Applikationsart sprechen. Die bei der systemischen Studie beobachtete fehlende Epithelialisierung des Wundbereiches gefährdet den Organismus durch die hohe Anfälligkeit für Wundinfektionen. Intensive Wundpflege und häufige Verbandswechsel könnten bei der Lokaltherapie die geringe zeitliche Verzögerung des Wundverschlusses kompensieren.

Die Ergebnisse zeigten, dass auch die topische Applikation von Batimastat einen deutlich hemmenden Einfluss im Sinne einer verzögerten Wundkontraktion bei reduzierter Epithelialisierung ausübt. Ob es sich bei der veränderten Wundkontraktion um einen zeitlich verzögerten oder dauerhaften Prozess handelt, werden Studien mit einem längeren Beobachtungszeitraum klären. Weiterhin wäre der Einsatz selektiver MMP-Inhibitoren eine Möglichkeit, gezielt in promigratorische und prokontraktile Prozesse während der Wundheilung einzugreifen. Klinische Anwendung würden solche selektiven Inhibitoren der MMP dann als Lokaltherapeutikum bei Problemwunden, die bekanntermaßen zu Kontrakturen führen, finden.

5. Zusammenfassung

Der Heilungsprozess von Hautwunden schließt in der letzten Phase die Wundkontraktion ein. Pathologische Wundheilung äußert sich in Form von hypertrophen Narben, Narbensträngen und Narbenkontrakturen. Klinische Bedeutsamkeit erreichen diese Prozesse bei Lokalisation über Gelenken mit funktioneller Einschränkung der aktiven und passiven Beweglichkeit und Immobilisation. Zentrale Rolle bei der Wundheilung spielen Myofibroblasten als Haupteffektoren der Wundkontraktion und Matrixmetalloproteinasen in der Umwandlung des Gewebes und der Reepithelialisierung. Wir gingen im experimentellen Tiermodell der Fragestellung nach, ob die Wundkontraktion von Vollhautexzisionswunden über die lokale Applikation des synthetischen Matrixmetalloproteinasen-Inhibitor Batimastat gehemmt werden kann. Die Wirkung des Inhibitors wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Epithelialisierung und Beschaffenheit des Granulationsgewebes der Wunden wurden im histologischen Präparat, die Größe der Wunden zusätzlich makroskopisch gemessen. Über BrdU-Immunhistochemie konnte die Zellproliferation ermittelt werden. Zur Beurteilung der Wundkontraktion erfolgte der immunhistochemische Nachweis von Myofibroblasten mit Hilfe der Markierung von alpha-smooth-muscle-actin. Die Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 wurden mit der Gelatine-Zymographie dargestellt.

Die lokale Behandlung mit Batimastat führte zu einer signifikant verzögerten Reepithelialisierung der Wunden ($p < 0,05$). Verglichen mit den Kontrollwunden, die sich am 8. postoperativen Tag bereits zu 96 % mit Epithel bedeckt zeigten, waren erst 52 % der mit Batimastat behandelten Wunden reepithelialisiert. Außerdem bewirkte Batimastat eine verzögerte Wundkontraktion. Am 8. postoperativen Tag hatte sich die relative Wundfläche erst auf 46 % reduziert, wohingegen in der Kontrolle bereits eine Reduktion auf 21 % der Ausgangsfläche stattgefunden hatte. ASMA-positive Zellen traten in der mit Batimastat behandelten Gruppe erst verzögert auf. Zudem zeigten Myofibroblasten durch Batimastat eine veränderte Zellmorphologie und Ausrichtung im Zellverband, was auf eine Veränderung in deren Funktionalität schließen lässt. Batimastat erhöhte die epitheliale Proliferation ($p < 0,05$) im Wundrand und im sich neu bildenden Epithel und führte zur signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der MMP-9 im Wundrand in den frühen Wundheilungsphasen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass im Wundgewebe lokalisierte Matrixmetalloproteinasen nicht nur die Epithelialisierung, sondern auch die Kontraktion von Vollhautwunden beeinflussen. Weiterführende Untersuchungen werden klären müssen, ob Batimastat als Lokaltherapeutikum auch bei Problemwunden, die bekanntermaßen zu Kontrakturen führen, wirksam ist.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Roessner, A., Pfeifer, U., Müller-Hermlink, H.K., Grundmann Allgemeine Pathologie, Urban und Fischer Verlag, München, 2004, p. 182.
- [2] Martin, P.: Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 276. 75-81 (1997)
- [3] Smola, H., Eming, S., Hess, S., Werner, S., Krieg, T.: Wundheilung und Wundheilungsstörung - Moderne Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie. *Dt Ärztebl [Heft 43]*. A 2802-2809 (2001;98)
- [4] Madlener, M., Parks, W.C., Werner, S.: Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res*. 242. 201-210 (1998)
- [5] Yarger, C.C., Luckner, J.L.: Itinerant teaching: the inside story. *Am Ann Deaf*. 144. 309-314 (1999)
- [6] Singer, A.J., Clark, R.A.: Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 341. 738-746 (1999)
- [7] Leibovich, S.J., Ross, R.: The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 78. 71-100 (1975)
- [8] Clark, R.A., Nielsen, L.D., Welch, M.P., McPherson, J.M.: Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. *J Cell Sci*. 108 (Pt 3). 1251-1261 (1995)
- [9] Welch, M.P., Odland, G.F., Clark, R.A.: Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol*. 110. 133-145 (1990)
- [10] Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C.E., Chaponnier, C., Gabbiani, G.: Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol*. 159. 1009-1020 (2001)
- [11] Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., Gabbiani, G.: Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 122. 103-111 (1993)
- [12] Hinz, B.: Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol*. 85. 175-181 (2006)

- [13] Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R.A.: Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3. 349-363 (2002)
- [14] Darby, I., Skalli, O., Gabbiani, G.: Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest.* 63. 21-29 (1990)
- [15] Burridge, K., Chrzanowska-Wodnicka, M.: Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12. 463-518 (1996)
- [16] Dugina, V., Fontao, L., Chaponnier, C., Vasiliev, J., Gabbiani, G.: Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci.* 114. 3285-3296 (2001)
- [17] Gabbiani, G., Chaponnier, C., Huttner, I.: Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *J Cell Biol.* 76. 561-568 (1978)
- [18] Bombaro, K.M., Engrav, L.H., Carrougher, G.J., Wiechman, S.A., Faucher, L., Costa, B.A., Heimbach, D.M., Rivara, F.P., Honari, S.: What is the prevalence of hypertrophic scarring following burns? *Burns.* 29. 299-302 (2003)
- [19] Engrav, L.H., Covey, M.H., Dutcher, K.D., Heimbach, D.M., Walkinshaw, M.D., Marvin, J.A.: Impairment, time out of school, and time off from work after burns. *Plast Reconstr Surg.* 79. 927-934 (1987)
- [20] Nedelec, B., Ghahary, A., Scott, P.G., Tredget, E.E.: Control of wound contraction. Basic and clinical features. *Hand Clin.* 16. 289-302 (2000)
- [21] Desmouliere, A., Darby, I., Costa, A.M., Raccurt, M., Tuchweber, B., Sommer, P., Gabbiani, G.: Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest.* 76. 765-778 (1997)
- [22] Roy, S.G., Nozaki, Y., Phan, S.H.: Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 33. 723-734 (2001)
- [23] Karsdal, M.A., Larsen, L., Engsig, M.T., Lou, H., Ferreras, M., Lochter, A., Delaisse, J.M., Foged, N.T.: Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem.* 277. 44061-44067 (2002)

- [24] Löffler, G., *Basiswissen Biochemie*, Springer-Verlag Berlin, 2003, pp. 698-706.
- [25] Mott, J.D., Werb, Z.: Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 16. 558-564 (2004)
- [26] Miranti, C.K., Brugge, J.S.: Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol.* 4. E83-90 (2002)
- [27] Michele, D.E., Campbell, K.P.: Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem.* 278. 15457-15460 (2003)
- [28] Yoneda, A., Couchman, J.R.: Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans. *Matrix Biol.* 22. 25-33 (2003)
- [29] Hynes, R.O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110. 673-687 (2002)
- [30] Stamenkovic, I.: Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 200. 448-464 (2003)
- [31] Ravanti, L., Kahari, V.M.: Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med.* 6. 391-407 (2000)
- [32] Nuti, E., Tuccinardi, T., Rossello, A.: Matrix metalloproteinase inhibitors: new challenges in the era of post broad-spectrum inhibitors. *Curr Pharm Des.* 13. 2087-2100 (2007)
- [33] Nagase, H., Woessner, J.F., Jr.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274. 21491-21494 (1999)
- [34] Sternlicht, M.D., Werb, Z.: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17. 463-516 (2001)
- [35] Visse, R., Nagase, H.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92. 827-839 (2003)
- [36] Hernandez-Barrantes, S., Shimura, Y., Soloway, P.D., Sang, Q.A., Fridman, R.: Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. *Biochem Biophys Res Commun.* 281. 126-130 (2001)

- [37] Toth, M., Bernardo, M.M., Gervasi, D.C., Soloway, P.D., Wang, Z., Bigg, H.F., Overall, C.M., DeClerck, Y.A., Tschesche, H., Cher, M.L., Brown, S., Mobashery, S., Fridman, R.: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J Biol Chem.* 275. 41415-41423 (2000)
- [38] Bernardo, M.M., Brown, S., Li, Z.H., Fridman, R., Mobashery, S.: Design, synthesis, and characterization of potent, slow-binding inhibitors that are selective for gelatinases. *J Biol Chem.* 277. 11201-11207 (2002)
- [39] Sawicki, G., Marcoux, Y., Sarkhosh, K., Tredget, E.E., Ghahary, A.: Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol Cell Biochem.* 269. 209-216 (2005)
- [40] Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A.: Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 4. 197-250 (1993)
- [41] Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S., Liotta, L.A.: Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol.* 9. 541-573 (1993)
- [42] Giamberardi, T.A., Grant, G.M., Taylor, G.P., Hay, R.J., Maher, V.M., McCormick, J.J., Klebe, R.J.: Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol.* 16. 483-496 (1998)
- [43] Han, Y.P., Tuan, T.L., Hughes, M., Wu, H., Garner, W.L.: Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem.* 276. 22341-22350 (2001)
- [44] Salo, T., Makela, M., Kylmaniemi, M., Autio-Harmainen, H., Larjava, H.: Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest.* 70. 176-182 (1994)
- [45] Page, R.C.: The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 26. 230-242 (1991)
- [46] Luttun, A., Dewerchin, M., Collen, D., Carmeliet, P.: The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep.* 2. 407-416 (2000)
- [47] Parks, W.C.: Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen.* 7. 423-432 (1999)

- [48] Lindy, O., Konttinen, Y.T., Sorsa, T., Ding, Y., Santavirta, S., Ceponis, A., Lopez-Otin, C.: Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 40. 1391-1399 (1997)
- [49] Keyszer, G., Lambiri, I., Keysser, M., Keysser, C., Nagel, R., Burmester, G.R., Jung, K.: Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H, and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity. *Z Rheumatol.* 57. 392-398 (1998)
- [50] Woessner, J.F., Jr.: Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci.* 878. 388-403 (1999)
- [51] Mallya, S.K., Van Wart, H.E.: Mechanism of inhibition of human neutrophil collagenase by Gold(I) chrysotherapeutic compounds. Interaction at a heavy metal binding site. *J Biol Chem.* 264. 1594-1601 (1989)
- [52] Overall, C.M., Kleifeld, O.: Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *Br J Cancer.* 94. 941-946 (2006)
- [53] Puerta, D.T., Lewis, J.A., Cohen, S.M.: New beginnings for matrix metalloproteinase inhibitors: identification of high-affinity zinc-binding groups. *J Am Chem Soc.* 126. 8388-8389 (2004)
- [54] Overall, C.M.: Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol.* 22. 51-86 (2002)
- [55] Lopez-Otin, C., Overall, C.M.: Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3. 509-519 (2002)
- [56] Borchert, D., Der Einfluß von Batimastat auf Prostatakarzinom Zelllinien und den Dunning Tumor der Ratte, Medizinische Fakultät der Charité-Universitätsmedizin, Berlin, 2004.
- [57] Botos, I., Scapozza, L., Zhang, D., Liotta, L.A., Meyer, E.F.: Batimastat, a potent matrix metalloproteinase inhibitor, exhibits an unexpected mode of binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93. 2749-2754 (1996)
- [58] Agren, M.S., Mirastschijski, U., Karlsmark, T., Saarialho-Kere, U.K., (Eds.), Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds, 2001.

- [59] Lund, L.R., Romer, J., Bugge, T.H., Nielsen, B.S., Frandsen, T.L., Degen, J.L., Stephens, R.W., Dano, K.: Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *Embo J.* 18. 4645-4656 (1999)
- [60] Mirastschijski, U., Impola, U., Karsdal, M.A., Saarialho-Kere, U., Agren, M.S.: Matrix metalloproteinase inhibitor BB-3103 unlike the serine proteinase inhibitor aprotinin abrogates epidermal healing of human skin wounds ex vivo. *J Invest Dermatol.* 118. 55-64 (2002)
- [61] Sheridan, C.M., Occeleston, N.L., Hiscott, P., Kon, C.H., Khaw, P.T., Grierson, I.: Matrix metalloproteinases: a role in the contraction of vitreo-retinal scar tissue. *Am J Pathol.* 159. 1555-1566 (2001)
- [62] Mirastschijski, U., Haaksma, C.J., Tomasek, J.J., Agren, M.S.: Matrix metalloproteinase inhibitor GM 6001 attenuates keratinocyte migration, contraction and myofibroblast formation in skin wounds. *Exp Cell Res.* 299. 465-475 (2004)
- [63] Makela, M., Sorsa, T., Uitto, V.J., Salo, T., Teronen, O., Larjava, H.: The effects of chemically modified tetracyclines (CMTs) on human keratinocyte proliferation and migration. *Adv Dent Res.* 12. 131-135 (1998)
- [64] Sledge, G.W., Jr., Qulali, M., Goulet, R., Bone, E.A., Fife, R.: Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Natl Cancer Inst.* 87. 1546-1550 (1995)
- [65] Wong, T.T., Daniels, J.T., Crowston, J.G., Khaw, P.T.: MMP inhibition prevents human lens epithelial cell migration and contraction of the lens capsule. *Br J Ophthalmol.* 88. 868-872 (2004)
- [66] Oikarinen, A., Kylmaniemi, M., Autio-Harmanen, H., Autio, P., Salo, T.: Demonstration of 72-kDa and 92-kDa forms of type IV collagenase in human skin: variable expression in various blistering diseases, induction during re-epithelialization, and decrease by topical glucocorticoids. *J Invest Dermatol.* 101. 205-210 (1993)
- [67] McCawley, L.J., O'Brien, P., Hudson, L.G.: Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. *J Cell Physiol.* 176. 255-265 (1998)
- [68] Bove, P.F., Wesley, U.V., Greul, A.K., Hristova, M., Dostmann, W.R., van der Vliet, A.: Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36. 138-146 (2007)

- [69] Gill, S.E., Parks, W.C.: Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 40. 1334-1347 (2008)
- [70] Sigurdson, L., Sen, T., Hall, L., 3rd, Rubinfeld, A., Hard, R., Gardella, J., Bright, F., Hicks, W.L., Jr.: Possible impedance of luminal reepithelialization by tracheal cartilage metalloproteinases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 129. 197-200 (2003)
- [71] Buisson-Legendre, N., Emonard, H., Bernard, P., Hornebeck, W.: Relationship between cell-associated matrix metalloproteinase 9 and psoriatic keratinocyte growth. *J Invest Dermatol.* 115. 213-218 (2000)
- [72] Mirastschijski, U., Schnabel, R., Claes, J., Tomasek, J.J., Agren, M.S., Schneider, W., Matrix Metalloproteinase Inhibitor Delays Contraction through Attenuated Transforming Growth Factor beta 1 Activation, *Wound Repair Regen*, 2009, Vol. submitted.
- [73] Yu, Q., Stamenkovic, I.: Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.* 13. 35-48 (1999)
- [74] Daniels, J.T., Cambrey, A.D., Occeleston, N.L., Garrett, Q., Tarnuzzer, R.W., Schultz, G.S., Khaw, P.T.: Matrix metalloproteinase inhibition modulates fibroblast-mediated matrix contraction and collagen production in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44. 1104-1110 (2003)
- [75] Desmouliere, A., Chaponnier, C., Gabbiani, G.: Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 13. 7-12 (2005)
- [76] Ghahary, A., Shen, Y.J., Scott, P.G., Gong, Y., Tredget, E.E.: Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor-beta, type I and type III procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues. *J Lab Clin Med.* 122. 465-473 (1993)
- [77] Yu, Q., Stamenkovic, I.: Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14. 163-176 (2000)
- [78] Maeda, S., Dean, D.D., Gomez, R., Schwartz, Z., Boyan, B.D.: The first stage of transforming growth factor beta1 activation is release of the large latent complex from the extracellular matrix of growth plate chondrocytes by matrix vesicle stromelysin-1 (MMP-3). *Calcif Tissue Int.* 70. 54-65 (2002)
- [79] Shephard, P., Hinz, B., Smola-Hess, S., Meister, J.J., Krieg, T., Smola, H.: Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. *Thromb Haemost.* 92. 262-274 (2004)

- [80] Xia, W., Phan, T.T., Lim, I.J., Longaker, M.T., Yang, G.P.: Complex epithelial-mesenchymal interactions modulate transforming growth factor-beta expression in keloid-derived cells. *Wound Repair Regen.* 12. 546-556 (2004)
- [81] Werner, S., Krieg, T., Smola, H.: Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 127. 998-1008 (2007)
- [82] Mirastschijski, U., Johannesson, K., Jeppsson, B., Agren, M.S., Effect of a matrix metalloproteinase activity and TNF-alpha converting enzyme inhibitor on intra-abdominal adhesions, 2005.
- [83] Lijnen, H.R., Silence, J., Lemmens, G., Frederix, L., Collen, D.: Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* 79. 1171-1176 (1998)
- [84] Pilcher, B.K., Sudbeck, B.D., Dumin, J.A., Welgus, H.G., Parks, W.C.: Collagenase-1 and collagen in epidermal repair. *Arch Dermatol Res.* 290 Suppl. S37-46 (1998)
- [85] Nguyen, J., Knapnougel, P., Lesavre, P., Bauvois, B.: Inhibition of matrix metalloproteinase-9 by interferons and TGF-beta1 through distinct signalings accounts for reduced monocyte invasiveness. *FEBS Lett.* 579. 5487-5493 (2005)
- [86] Hahm, K.B., Im, Y.H., Lee, C., Parks, W.T., Bang, Y.J., Green, J.E., Kim, S.J.: Loss of TGF-beta signaling contributes to autoimmune pancreatitis. *J Clin Invest.* 105. 1057-1065 (2000)
- [87] Witte, M.B., Thornton, F.J., Kiyama, T., Efron, D.T., Schulz, G.S., Moldawer, L.L., Barbul, A.: Metalloproteinase inhibitors and wound healing: a novel enhancer of wound strength. *Surgery.* 124. 464-470 (1998)

7. Danksagungen

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Schneider, Direktor der Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg für die Überlassung des interessanten Themas und für die Möglichkeit zur Doktorarbeit in seiner Klinik.

Darüber hinaus bedanke ich mich vielmals bei Frau Dr. med. Dr. phil. Ursula Mirastschijski für die ständige Hilfsbereitschaft, das Korrekturlesen, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und die freundliche Betreuung der Arbeit bis zur Fertigstellung.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Reinhild Schnabel für die überaus intensive und zeitaufwendige Unterstützung im experimentellen und statistischen Teil der Arbeit, die fachlichen Diskussionen und wertvollen Anregungen, sowie für die schöne und unvergessliche Zeit im Labor.

Bei Frau Sabrina Sattelkau bedanke ich mich für die technische Assistenz und die stets freundliche Unterstützung.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern für das ermöglichte Studium und die Unterstützung in jeder Lebenslage bedanken.

Und nicht zuletzt danke ich Juliane Burkhardt für die Durchsicht der Arbeit und die motivierenden Worte.

8. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Der Einfluss des synthetischen Matrixmetalloproteinase-Inhibitors Batimastat auf die Wundkontraktion der Haut“

in der Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie der Otto-von-Guericke Universität
Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr .med. Wolfgang Schneider, Frau Dr. med. Dr. phil.
Usula Mirastschijski, Frau Dr .rer .nat. Reinhild Schnabel und Frau Sabrina Sattelkau

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 28.11.2008

9. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Claes
Vorname: Juliane
Geburtsdatum: 15.05.1983
Geburtsort: Bernburg

Schulbildung

1989 – 1993 Grundschole Könnern
1993 – 2002 Gymnasium Carolinum Bernburg

Hochschulausbildung

2002 – 2008 Studium der Humanmedizin
an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
September 2004 Physikum
November 2008 2. Staatsexamen
2005-2008 Dissertation in der Klinik für Plastische, Ästhetische
und Handchirurgie der Otto-von-Guericke-Universität
Magdeburg bei Prof. Dr. med. Wolfgang Schneider

Praktisches Jahr

August 2007- August 2008 an der Otto-von-Guericke-Universitätsklinik Magdeburg
Chirurgie Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie (Prof. Lippert)
Plastisch, Ästhetische und Handchirurgie (Prof. Schneider)
Innere Medizin Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen (PD Lobmann)
Gastroenterologie und Hepatologie (Prof. Malfertheiner)
Wahlfach Anästhesiologie (Prof. Hachenberg)

Zusatzqualifikationen

Grundkurs zur Übernahme der Funktion eines Transfusionsbeauftragten, Seminar
tierexperimentelle Methoden

Magdeburg, 28.11.2008

10. Anlagen

10.1. Paraffineinbettung

10.1.1. Material

- Paraffin: Roti®-Plast (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ethanol (Stammlösung 99,8 %), vergällt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Xylol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

10.1.2. Durchführung:

1. Waschen der fixierten Präparate in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2 4x 30 min
2. beginnende Entwässerung in 50 % Alk. 2x 1 h
3. Entwässerung und Paraffininfiltration im Gewebeeinbettautomat Shandon Citadel™ 100
(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit folgenden Stufen:

70 % Alk	2 h
80 % Alk	2 h
90 % Alk	1,5 h
90 % Alk	1,5 h
100 % Alk I	1 h
100 % Alk II	1 h
100 % Alk III	1 h
Xylol I	1,5 h
Xylol II	1,5 h
Xylol III	1,5 h
Paraffin I	3 h
Paraffin II	3 h

4. Gießen und Härten der Paraffinblöcke mit Hilfe der Paraffinausgießstation Leica EG 1150
(Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland)

10.2. Hämalaun- Eosin Färbung

10.2.1. Material:

- Hämalaunlösung nach Mayer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Eosin G-Lösung: wässrig, 0,5 % (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Roti®Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ethanol (Stammlösung 99,8 %), vergällt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Xylol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

- Proben: 5 µm dicke Paraffinschnitte auf Superfrost® Plus Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland), vorbehandelt mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), aufgezogen und über Nacht bei 60°C getrocknet

10.2.2. Durchführung:

1. Entparafinieren in 3 Stufen Xylol	3x	5 min
2. 100 % Alkohol		3 min
3. 96 % Alkohol		3 min
4. 90 % Alkohol		3 min
5. 70 % Alkohol		3 min
6. 50 % Alkohol		3 min
7. Aqua dest		10 min
8. Häkalaunlösung nach Mayer		2 min
9. unter fließendem Leitungswasser bläuen		10 min
10. Eosin G-Lösung		2 min
11. kurz in Aqua dest abspülen		
12. kurz in 70 % und 96 % Alkohol differenzieren		
13. 2 Stufen 100 % Alkohol	2x	3 min
14. Xylol I		3 min
15. Xylol II		10 min
16. Eindecken in Roti Histokit		

10.3. BrdU- und ASMA-Immunhistochemie

10.3.1. Material - (a) nur BrdU, (b) nur ASMA

- Freilegung der Epitope
 - (a) 10 mM Na-Zitratpuffer: 2,94 g Trinatrium-Zitrat (x2 H₂O) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 600 ml demineralisiertem Wasser lösen, mit 1N HCl auf pH 6,0 einstellen, auf 1000 ml mit demineralisiertem Wasser auffüllen
- TBS (Tris buffered saline = 0,05 M Tris/HCL + 0,9 % NaCL, pH 7,6): Tris (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Roti Liquid Barrier Marker (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Blockade unspezifischer Bindungen:
 - Rinderserumalbumin (BSA; Sigma-Adrich, Steinheim, Deutschland), 1 % in TBS
 - Kaninchennormalserum (KNS, X0903, DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark)

- Primäre Antikörper:
 - (a) monoklonaler (Maus) Antikörper gegen BrdU (M744; DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark), Verdünnung 1:100 in TBS und 1 % KNS
 - (b) monoclonaler mouse-anti-human-smooth-muscle (ASMA; CBL 171, Chemicon), Verdünnung 1:150 in TBS + 1 % KNS
- Sekundäre Antikörper:
 - (a) biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus Antikörper (E354; DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark), Verdünnung 1:400 in TBS
 - (b) biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus Antikörper (E354; DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark), Verdünnung 1:400 in TBS
- Nachweissystem:
 - Vectastain ABC Kit mit biotinylierter Meerrettichperoxidase (PK 4000, Vektor Laboratories, Peterborough, Großbritannien): Gebrauchslösung: 1 Tropfen Reagenz A und 1 Tropfen Reagenz B nacheinander in 20 ml 0,05 M Tris/HCl, pH 7,6 geben und 30 min rühren, frisch hergestellt
 - DAB: 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland): Gebrauchslösung: 0.05 % DAB - 0.015 % H₂O₂ in 0,05 M Tris/HCl, pH 7,6, frisch hergestellt
- Häkalaunlösung nach Mayer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Roti®Histokit (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Proben: 5 µm dicke Paraffinschnitte auf Superfrost® Plus Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland), vorbehandelt mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), aufgezogen und über Nacht bei 60 °C getrocknet

10.3.2. Durchführung (ASMA-Immunhistochemie ohne Schritt 5!)

1. Entparaffinieren der Schnitte in 3 Stufen Xylol 3x 5 min
2. Wässern der Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe bis zum Aqua dest
jede Stufe 5 min
3. Hemmung der endogenen Peroxidase mit 3 % H₂O₂ in Aqua dest 20 min
4. kurz spülen in Aqua dest
5. Zur Freilegung der Epitope kochen der Schnitte in 10 mM Na-Zitrat-Puffer (pH 6,0) bei 95-100 °C im Dampftopf 50 min

6. Spülen in TBS		10 min
7. Umzeichnen der Schnitte mit Roti Liquid Barrier Marker		
8. Spülen in TBS	2x	5 min
9. Blockieren unspezifischer Bindungen mit 1 % BSA in TBS		30 min
10. Blockieren unspezifischer Bindungen mit 1 % KNS in TBS		15 min
11. Inkubation mit dem <i>Primären AK</i> über Nacht bei 4 °C		
12. Spülen in TBS	3x	5 min
13. Inkubation mit dem <i>Sekundären AK</i>		90 min
14. Spülen in TBS	3x	5 min
15. Inkubation mit Vectastain		60 min
16. Visualisierung mit DAB		2 min
17. Spülen in TBS	2x	5 min
18. Spülen in Aqua dest	2x	5 min
19. Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer		45 sec
20. Bläuen in fließendem Leitungswasser		5 min
21. Spülen in Aqua dest		2 min
22. Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und 2 Stufen Xylol	je	2 min
23. Eindecken in Roti®Histokitt		

Anmerkung: Schritte 18-20 nur bei einem Teil der Schnitte durchgeführt

10.4. Zymographie

10.4.1. Material

Extraktionspuffer

10 mM Natrium-Cacodylat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1 M Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,01 % Triton-X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,001 % Natriumacid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1 µM Zinkchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH-Wert 6,0

Extraktionslösung

Extraktionspuffer + 1 µM Pepstatin (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) + Complete™ (Mini, EDTA-free, 1 Tablette pro 10 ml) (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Waschpuffer

0,05 M Tris (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 6,7 mM Calciumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 10 µM Zinkchlorid, 0,02 % Natriumazid, 2,5 % Triton X-100

Inkubationspuffer

0,05 M Tris, 6,7 mM Calciumchlorid, 10 µM Zinkchlorid, 0,02 % Natriumazid, 0,1 % Triton X-100

Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCL pH 6,8

SDS

=Natriumdodecylsulfat (Bio-Rad, Hercules, CA,USA)

20 % SDS in Aqua dest

Acrylamid

30 % Acrylamide/Bis-Solution 37,5 : 1 (Bio-Rad, Hercules, CA,USA)

Ammoniumpersulfat

10 % Ammoniumperoxodisulfat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in Aqua dest

TEMED

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Bio-Rad, Hercules, CA,USA)

Probenpuffer

Trenngelpuffer, Glycerol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 20 % SDS im Verhältnis 1:1,6:1,6 gemischt und mit wenigen Körnchen Bromphenolblau (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt

Elektrophoresepuffer

0,025 M Tris, 0,2 M Glycine (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1 % SDS

Zymo-Färbelösung

2,5 % Coomassie Brilliant Blau R-250 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 45 % (vol/vol) Methanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 3 % (vol/vol) Essigsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Zymo Schnell-Entfärbelösung

20 % (vol/vol) Methanol, 16,6 % (vol/vol) Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland),
7 % (vol/vol) Essigsäure, 0,6 % (vol/vol) Diethylether (Carl Roth, Karlsruhe,
Deutschland)

Gelatine

aus Schweinehaut (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Zymographie-Standard:

humane MMP-2 (0,1 mg/ml, Molekulargewicht 72 kDa)/ MMP-9 (0,1 mg/ml,
Molekulargewicht 92 kDa) (CC073, Millipore/Chemicon, Billerica, MA, USA) verwendet
in einer Konzentration von 50 ng/ μ l

Elektrophoresesystem

XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)

10.4.2. Proben-Extraktion

1. Hautstück auftauen und wiegen
2. Inkubieren bei 4 °C unter kontinuierlichem Schütteln 24 h
in 4 ml Extraktionslösung pro 100 mg Probe
3. Hautstück herausnehmen und verwerfen
4. Zentrifugieren bei 12000 g 10 min
5. Überstand direkt zur weiteren Analyse

10.4.3. Proteinanalyse

Bestimmung des Proteingehaltes im Probenextrakt (s. 10.4.2.,3.2) mit dem DC Protein Assay
(Bio-Rad, Hercules, CA,USA) nach Vorschrift des Herstellers

10.4.4. Gelpräparation, Vorbereitung der Elektrophorese

Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel:

Substanz	Sammelgel	Trenngel
	Für 1 Gel	Für 1 Gel
Gelatine	-	6 mg (=0,5 mg/ml)
Aqua dest	1,59 ml	5,84 ml
Trenngelpuffer		3,0 ml (=1:4)
Sammelgelpuffer	0,75 ml (=1:4)	
20 % SDS	15 µl (=0,1 %)	60 µl (=0,1 %)
30 % Acrylamid	0,5 ml (=5 %)	3,0 ml (=7,5 %)
10 % Ammonium persulfate	22,5 µl (=0,075 %)	90 µl (=0,075 %)
TEMED	2,25 µl (0,075 %)	9 µl (=0,075 %)

Durchführung:

1. Komponenten des Trenngels mischen
2. in die Gelkammer (bis zur 1. Linie) luftblasenfrei einfüllen
3. vorsichtig mit Aqua dest (oder Isopropanol) überschichten
4. 45 min gelieren lassen (Rest des angesetzten Gels als Gelierkontrolle!)
5. Aqua dest abgießen
6. Komponenten des Sammelgels mischen
7. Luftblasenfrei über Trenngel gießen und die Gelkammer komplett füllen
8. Proben-Kamm luftblasenfrei einsetzen
9. 45 min gelieren lassen
10. Probenkamm vorsichtig herausnehmen
11. Schutzstreifens an der Gel-Kammerelektrode abziehen
12. Einsetzen der Gele in die Elektrophorese-Apparatur
13. Füllen der inneren und äußeren Kammer mit Elektrophoresepuffer

10.4.5. Bestückung der Gele und Elektrophoretische Auftrennung

1. bei allen Proben Auftragung einer Proteinmenge von 5 µg (in 25 µl), Extraktionslösungen entsprechend mit Inkubationspuffer auf ein Endvolumen von 40 µl verdünnen
2. mit 10 µl Probenpuffer mischen
3. mit Hilfe einer Hämiltonspritze 25 µl dieser Probenlösung in die Geltaschen füllen
4. neben den Probenlösungen in jedem Gel 20 µl des Zymographie-Standard (1:2000 mit 2x Probenpuffer verdünnt) auftragen

5. Gele bei 25 mA pro Gel und maximaler Spannung laufen lassen, bis die Proben durch den Farbstoff sichtbar auf Höhe der unteren Kammer-Elektrode angekommen sind

10.4.6. Enzymreaktion, Färbung und Konservierung

1. Gele aus den Gelkammern herausnehmen, Sammelgel und untersten Rand des Trenngels abschneiden, die Auftragsrichtung durch Abtrennen einer kleinen Ecke zur Orientierung markieren
2. Gele in Waschpuffer spülen 3x 30 min
3. bei 37 °C in Zymo-Inkubationslösung inkubieren 18 h
4. in Zymofärbelösung färben 30 min
5. in Schnell-Entfärbelösung einlegen 30 min
6. in 7 % Essigsäure weiter entfärben 2x 30 min
7. Einlegen in 3 % Glycerin (mindesten 3 Stufen) über Nacht
8. Gel zwischen Folie blasenfrei einlegen, in einen Rahmen spannen und mindestens 2 Tage trocknen lassen

Anmerkung: Schritte 2-7 werden auf einem Schüttler unter ständiger leichter Bewegung durchgeführt.