

**Aus der Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
Intensiveinheit für Schwerbrandverletzte
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. P. Mailänder**

**Steuerung der gezielten Freisetzung von VEGF¹⁶⁵ und bFGF in
einer kollagenen Matrix durch Konstruktion eines
„Slow release“ Systems in vitro und in vivo**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Insa Wilcke
aus Leer

Lübeck 2007

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Günther Machens
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Hoch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.10.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Bisherige Publikationen der Dissertationsschrift

Originalarbeiten

Wilcke I, Lohmeyer JA, Liu S, Condurache A, Krüger S, Mailänder P, Machens HG;
„VEGF¹⁶⁵ and bFGF protein-based therapy in a slow release system to improve angiogenesis in a bioartificial dermal substitute in vitro and in vivo”
Langenbecks Arch Surg (2007) 392:305–314

Vorträge

Wilcke I, Egana T, Lohmeyer JA, Liu S, Thome D, Mailänder P, Machens HG;
„VEGF¹⁶⁵ and bFGF protein based therapy in a slow release system to improve angiogenesis in a bioartificial dermal substitute in vitro and in vivo”. European conference of scientists and Plastic Surgeons (ECSAPS) 21-23.09.2006, London
Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery (2007) 60(4): S12

Wilcke I, Egana T, Lohmeyer JA, Liu S, Thome D, Condurache A, Mailänder P, Machens HG;
„Steuerung der gezielten Freisetzung von bFGF/VEGF¹⁶⁵ in einer kollagenen Matrix durch Konstruktion eines „Slow release” Systems in vitro”. 28. Jahrestagung der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der peripheren Nerven und Gefäße (DAM), 16.–18.11.2006, Lübeck-Travemünde, Förderpreis der DAM (1000 €)

Wilcke I, Egana T, Lohmeyer JA, Liu S, Thome D, Condurache A, Mailänder P, Machens HG;
„Die Steuerung der gezielten Freisetzung von VEGF¹⁶⁵ und bFGF in einer kollagenen Matrix durch Konstruktion eines „Slow release” Systems in vitro und in vivo. 124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH) 01.-04.05.2007; München
Chirurgisches Forum (2007) 36: 317-319; ISBN 978-3-540-71122-3

Poster

Wilcke I, Egana T, Lohmeyer JA, Liu S, Thome D, Mailänder P, Machens HG;
„Steuerung der gezielten Freisetzung von bFGF/VEGF¹⁶⁵ in einer kollagenen Matrix durch Konstruktion eines „Slow release” Systems in vitro”. DGPRÄC 29.09–02.10.2006; Aachen;
Plast. Chir. 6 (Suppl. 1):77–78

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	3
1.1	KLINISCHE GRUNDLAGEN.....	3
1.2	ANGIOGENESE	5
1.2.1	<i>Steuerungsmechanismen in der Angiogenese</i>	7
1.3	VOR- UND NACHTEILE DER PROTEINBASIERTEN THERAPIE	8
1.4	FRAGESTELLUNG.....	11
2.	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	IN VITRO EXPERIMENT	12
2.1.1	<i>Versuchsmodell</i>	14
2.1.2	<i>Gruppendesign</i>	14
2.1.3	<i>Integra™ Matrix</i>	15
2.1.4	<i>VEGF¹⁶⁵ und bFGF</i>	16
2.1.5	<i>Fibrinkleber</i>	17
2.1.6	<i>Auswertung ELISA</i>	17
2.2	IN VIVO EXPERIMENT	18
2.2.1	<i>Tiermodell/ Tierversuchsantrag</i>	18
2.2.2	<i>Gruppendesign</i>	19
2.2.3	<i>Operationstechnik</i>	20
2.2.4	<i>Materialgewinnung</i>	21
2.2.5	<i>Klinische Beobachtung</i>	22
2.2.6	<i>Segmentierung</i>	22
2.2.7	<i>Auswertung</i>	24
2.2.8	<i>Histologie</i>	24
2.3	STATISTIK	25
3.	ERGEBNISSE	26
3.1	IN VITRO EXPERIMENT	26
3.1.1	<i>Auswertung ELISA</i>	26
3.2	IN VIVO EXPERIMENT	28
3.2.1	<i>Resultate Segmentierung</i>	28

3.2.2	<i>Histologie</i>	31
3.2.3	<i>Klinische Beobachtung</i>	32
4.	DISKUSSION	33
5.	ZUSAMMENFASSUNG	44
6.	LITERATURVERZEICHNIS	46
	ANHANG	52
	ERGEBNISTABELLEN.....	52
	STATISTIK.....	54
	DANKSAGUNG.....	60
	LEBENS LAUF	62
	ERKLÄRUNG	62

1. EINLEITUNG

1.1 KLINISCHE GRUNDLAGEN

Das Überleben transplantiertter Zellen erfordert eine frühzeitige nutritive Versorgung, die aufgrund des fehlenden vaskulären Netzwerkes einer bioartifiziellen Haut primär jedoch nicht gegeben ist. Ischämie bewirkt die Freisetzung endogener biochemischer Stoffe, unter anderem Wachstumsfaktoren, welche die Angiogenese (Ausbildung neuer Blutgefäße) stimulieren [17,55,62].

Kommt es zu einer ischämischen Situation im Gewebe, entstehen molekulare Mechanismen, um der Ischämie so schnell wie möglich entgegen zu wirken. Es kommt im ischämischen Gewebe zur Vasodilatation, um dem nun erhöhten Sauerstoffbedarf des Gewebes gerecht zu werden und auch zur Öffnung zusätzlicher arteriovenöser Shuntverbindungen, sogenannter „choke vessels“. Sind diese Regulierungsmaßnahmen im Gewebe nicht ausreichend und ist die ischämische Schädigung nicht schon zu sehr ausgeprägt, werden energieabhängige, gewebestrukturelle Veränderungen in Gang gesetzt, um den chronisch gesteigerten Sauerstoffbedarf auszugleichen: Es kommt zur Angiogenese [43]. All diese regenerativen Prozesse wie bei der Wiederherstellungssituation im Gewebe nach Ischämie sind auch bei Ersatztherapien nötig, bei denen bioartifizielle Haut verwendet wird.

In der Wiederherstellung ist es zunächst das Ziel, die bereits bestehende physiologische Gefäßarchitektur zu erhalten und somit das Überleben des verwendeten Gewebes zu sichern. Jedoch muss gesagt werden, dass es bis auf sehr wenige experimentelle Ansätze derzeit kein etabliertes klinisches Verfahren gibt, welches nach akutem Beginn einer schweren Gewebeischämie noch eine signifikante therapeutische Angiogeneseinduktion im Zielgewebe bewirken kann [43]. Pharmakologische und mechanische Beeinflussung bewirken höchstens eine Verbesserung der Mikrozirkulation mit dem Ziel, dass möglichst wenig Gewebe der ischämischen Schädigung zum Opfer fällt. Die postischämische endotheliale Dysfunktion im Kapillarbereich des Gewebes führt über mehrere pathophysiologische Wege [56] erst zum Verschluss der kapillären Strombahn und danach auch größerer Blutgefäße und zum Untergang der davon abhängigen

Gewebekompartimente. Hingegen bestehen präoperativ oder auch postoperativ bei Vorliegen einer subakuten, nicht deletären Gewebeischämie durchaus noch Möglichkeiten des Organismus, die Versorgung des Zielgewebes zu verbessern [43].

Der mögliche Nutzen der therapeutischen Angiogeneseinduktion liegt in der Verbesserung der Behandlung schlecht vaskularisierter Wunden, die ohne Behandlung nicht oder nur unter Bildung instabiler Narben heilen oder die eine Vaskularisierung von Spalt-, Vollhaut und Hautersatzmaterialien nicht zulassen.

Ein großes Problem bei der biotechnologischen Herstellung von Haut ist das Fehlen eines dermalen Gefäßplexus und der daraus resultierenden progradienten Ischämie der transplantierten dermalen Matrix. Wird eine derartige Matrix verwendet, entwickelt sich klinisch häufig nur ein kollagenreiches Substrat. In den bisherigen experimentellen Arbeiten hat sich gezeigt, dass eine verzögerte Vaskularisierung der Neodermis eine stabile Integration der Matrix an der Wundoberfläche und dadurch den Erfolg einer zweizeitigen Keratinozytentransplantation nach Einheilung der Dermis behindert. Deshalb wurden viele Anstrengungen unternommen, die dermale Matrix durch bioaktive Substanzen schneller und zuverlässiger zu vaskularisieren [59]. Es konnte auch gezeigt werden, dass durch Implantation von vitalen Zellen in einer Kollagen-GAG (Glykosaminoglykan)-Matrix eine bessere Einheilung im Wundgrund erfolgt als durch humane Dermis allein [60]. Weiterführende Experimente haben gezeigt, dass durch Co-Transplantation von dermalen Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten in einer Biopolymermatrix eine Verbesserung der Vaskularisierung erreicht werden kann [43].

Das Tissue Engineering stellt den künstlichen Herstellungsprozess biokompatibler Ersatzsysteme aus Werkstoffen und Zellen mit Einbeziehung endogener Regenerationsprozesse des menschlichen Körpers dar. Es ist inzwischen zum integralen Bestandteil der Regenerativen Medizin geworden.

Die plastische Chirurgie hatte durch ihr elementares Interesse an der Wiederherstellung verloren gegangener Formen und Funktionen des Körpers durch lebendes Gewebe von Anfang an Beiträge zu diesem Gebiet geleistet und gleichzeitig früh erkannt, dass bei allen bioartifiziellen Konstrukten die erfolgreiche Anwendung *in vivo* von einer ausreichenden Vaskularisierung abhängig ist [43].

1.2 ANGIOGENESE

Als Angiogenese bezeichnet man das Wachstum von Kapillaren, wobei durch Aktivierung, Migration und Proliferation von Endothelzellen aus vorbestehenden Endothel-Perizytenverbänden neue Kapillaren gebildet werden. Es handelt sich um einen sehr komplexen Prozess, bei dem die zur Bildung der Gefäßwände notwendigen Endothel-, Perizyt- und glatten Muskelzellen durch den Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) aktiviert werden [46].

Der Prozess der Angiogenese beginnt mit NO-vermittelter Vasodilatation von bereits vorbestehenden Gefäßen. Die Gefäßpermeabilität nimmt in Antwort auf VEGF zu und erlaubt die Aussprossungen der aktivierten Endothelzellen in das Bindegewebsstroma durch eine partielle Desintegration der Basalmembran im Muttergefäß.

Die sich auf diese Weise neu geformten Blutgefäße können entweder als reife Kapillaren oder sich zu größeren venösen oder arteriellen Gefäßen weiterentwickeln, wobei besonders komplexe Mechanismen im Bindegewebe eine Rolle spielen unter Einbeziehung von Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen.

Durch angiogenetische Stimuli wird die Migration der Endothelzelle richtungsbestimmt und unterstützt durch die Proliferation der benachbarten Endothelzellen. Hier spricht man von der Entwicklung so genannter „buds“ und „sprouts“. Nach Ausbildung eines Lumens und Fusion zweier benachbarter aussprossender Endothelzellen beginnt der Blutfluss durch die neu gebildete Kapillare [43].

Einen weiteren Angiogenesemechanismus, der aus bereits vorbestehenden Blutgefäßen neue bilden kann, stellen die Längsteilung bestehender Endothelschläuche („intussusception“) und das axiale endotheliale Längenwachstum („pruning“) [37] dar.

Zu unterscheiden ist hiervon die Bildung von Blutgefäßen durch endotheliale Progenitorzellen, die auch als Vaskulogenese bezeichnet wird [11]. Die Entwicklung embryonaler Blutgefäße beginnt mit der Vaskulogenese, wobei sich endotheliale Precursorzellen (Angioblasten) zu Endothelzellen differenzieren und welche später unter anderem durch die Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF (basic fibroblast growth factor) sowie ihre Rezeptoren beeinflusst werden [10]. Auch im adulten Organismus können diese Endothelvorläuferzellen im Knochenmark und peripherem Blut gefunden werden.

Werden Gefäße in ihrem Aufbau durch kontraktile Elemente verstärkt, spricht man von Arteriogenese. Glatte Muskelzellen stabilisieren die Gefäße durch Inhibition von Endothelzellproliferation und -migration. Des Weiteren sind periendotheliale Zellen metabolisch aktiv und exprimieren eine Vielzahl von vasoaktiven Peptiden und Wachstumsfaktoren [12].

Eine vereinfachte Darstellung der drei unterschiedlichen Mechanismen ist in **Abbildung 1** zu sehen.

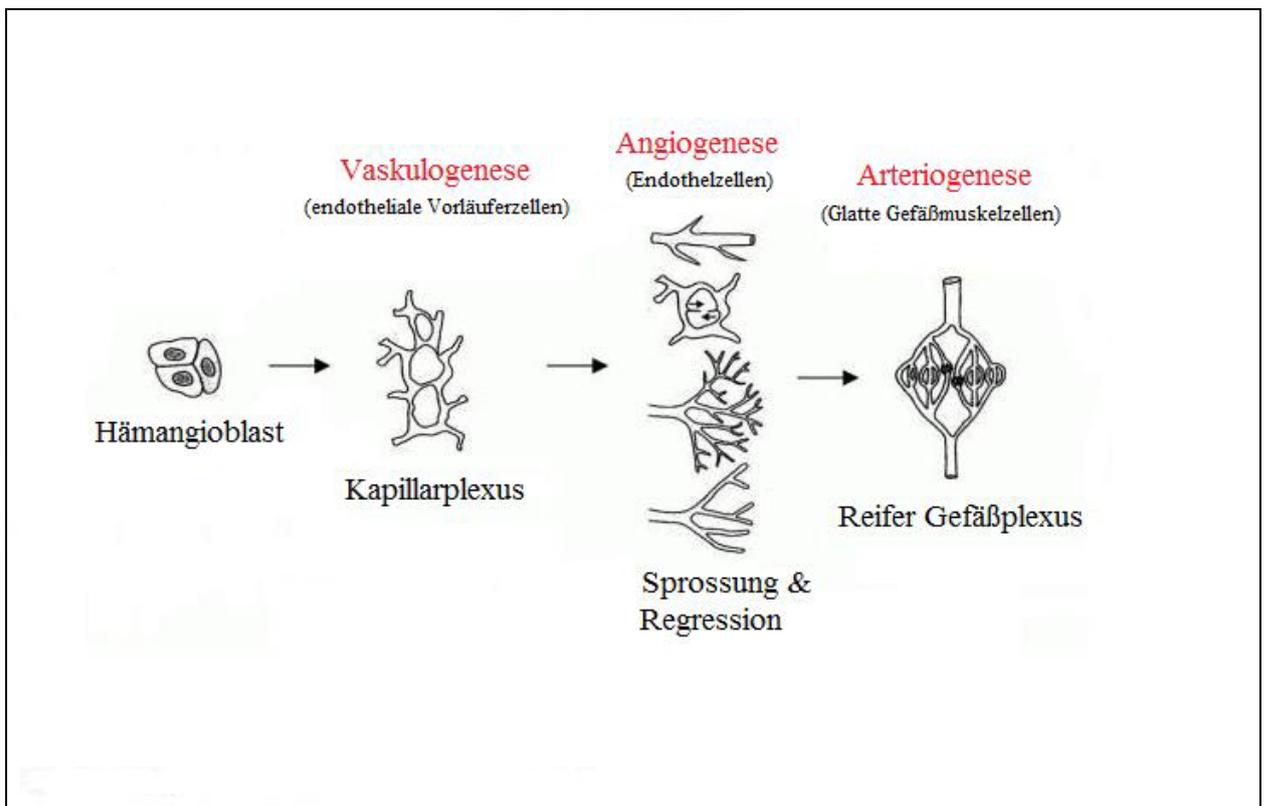


Abb.1
Stadien der Gefäßausbildung (Abb. aus Kopp 2004 [35])

1.2.1 Steuerungsmechanismen in der Angiogenese

Mindestens drei verschiedene Regulationsmechanismen spielen bei der Angiogenese eine Rolle:

- Proteine, die autokrin oder von benachbarten Zellen in parakriner Form sezerniert oder aus der extrazellulären Matrix und lysierten Zellen freigesetzt werden,
- direkte Zell-Zell-Interaktionen oder solche zwischen Zellen und extrazellulären Matrix auf der Ebene der Zelloberflächen, Adhäsionsmolekülen, Zytoskelettproteinen und Integrinen
- proteolytische Enzyme, die entweder eine Modifikation dieser regulatorischen Substanzen, Zelloberflächenmoleküle und der extrazellulären Matrix bewirken oder direkt mit der endothelialen Funktion interferieren.

Proteine spielen bei der Angiogeneseinduktion eine Schlüsselrolle. Diese Substanzen sind sehr unterschiedlich in ihrem Ursprung, Molekulargewicht, chemischer Zusammensetzung und biologischer Wirksamkeit. Die meisten Faktoren mit höherem Molekulargewicht gehören dabei in eine der drei folgenden Substanzklassen, die die Angiogenese *in vivo* regulieren:

1. Wachstumsfaktoren und Zytokine
2. Bestandteile der Zelloberflächen und der extrazellulären Matrix
3. Proteasen

Um therapeutisch und klinisch für angiogenetische Zwecke Anwendung finden zu können, sollten diese Substanzen dabei folgende Eigenschaften besitzen:

- die Fähigkeit zur Induktion und Stimulation einer kontrollierten Angiogenese in adultem Gewebe,
- klar begrenzte Zelleffekte durch die Angiogenese mit vernachlässigbaren lokalen und systemischen Nebenwirkungen,
- effektive Dosen bereits im Nano- und Pikomolarbereich mit Dosis-Wirkungs-Relation, chemisch definierte Substanzen, die problemlos zu handhaben sind und
- ein breites klinisches Anwendungsfeld.

Diese Kriterien werden von der Gruppe der Wachstumsfaktoren und Zytokinen erfüllt, die sich zudem durch die Techniken der Biotechnologie und Molekularbiologie rekombinant

in vitro herstellen und von extern applizieren lassen (proteinbasierte Therapie). Ein weiterer Vorteil dieser Substanzen liegt darin, dass sie parakrin von genetisch modifizierten Zellen sezerniert werden können [43].

1.3 VOR- UND NACHTEILE DER PROTEINBASIERTEN THERAPIE

Das Wissen um die Wichtigkeit einer ausreichenden Gewebepерfusion für die Wundheilung hat dazu geführt, dass versucht wurde, viele Möglichkeiten zur Induktion einer therapeutischen Angiogenese *in vivo* zu finden.

In der plastisch-chirurgischen Forschung wird die therapeutische Einflussnahme auf die Angiogenese zurzeit auf vier unterschiedlichen Wegen umgesetzt:

1. die ein- oder mehrfache Applikation angiogenetischer Wachstumsfaktoren in das gewünschte Zielgebiet
2. die Transfektion von Zellen *in vitro/vivo* zur Modulation ihrer Genexpression
3. die Applikation von *ex vivo* präparierten Carriern zur gesteuerten Freisetzung von angiogenetischen Proteinen
4. die Transplantation von adulten Stammzellen des Knochenmarkes oder des peripheren Blutes [43].

Mit den wachsenden Erkenntnissen über die molekularen Mechanismen der Angiogeneseinduktion und nach der erfolgreichen Erstanwendung von „Angiotropin“ zur Verbesserung der Überlebensrate ischämisch gefährdeter Lappengewebe [27] wurde schnell der Ruf nach der klinischen Umsetzung proteinbasierter Studien laut.

Weiterführende tierexperimentelle Studien, welche hauptsächlich mit VEGF¹⁶⁵ und bFGF als angiogenetische Signalproteine *in vivo* durchgeführt wurden, ergaben jedoch durchaus widersprüchliche Ergebnisse [26]. Dies mag zum Teil an den unterschiedlichen Tiermodellen, Applikationsmodi und Wirkstoffkombinationen in den jeweiligen Studien gelegen haben [44]. Auch wegen der relativ kurzen Halbwertszeit applizierter therapeutischer Proteine *in vivo* besteht inzwischen Einigkeit darüber, dass eine echte Angiogeneseinduktion durch die proteinbasierte Therapie zumindest mittels VEGF¹⁶⁵ allein primär nicht stattfindet. Stattdessen steht eine Stimulierung vasodilatatorischer, Stickstoffmonoxid-Synthase-gesteuerter Prozesse im Vordergrund [3,29]. Hierbei ist es auch in Abhängigkeit vom verwendeten tierexperimentellen Modell von entscheidender

Bedeutung, ob das Zielgewebe über eine bereits ausreichende vaskuläre Kapazität verfügt oder ob das Zielgewebe primär hypovaskularisiert ist.

Bisher stellen experimentelle Studien zur proteinbasierten Therapie ischämischer Gewebe oder zur verbesserten Wundheilung mit mehr als 75% Literaturanteil (PubMed) die größte Gruppe innerhalb der Techniken zur therapeutischen Angiogeneseinduktion für die plastische Chirurgie dar [43]. Die meisten Publikationen zu diesem Thema aus den letzten Jahren hatten beschrieben, dass viele angiogenetische Faktoren isoliert wurden, von denen die am häufigsten verwendeten Wachstumsfaktoren mit angiogenetischer Potenz unter anderem Vascular Endothelial Growth Factor/ Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF), und, -Fibroblast Growth Factor (FGF) sind.

VEGF und FGF entfalten ihre Wirkung direkt an den Endothelzellen. VEGF ist ein homodimeres Glykoprotein (40-45 kD) (**Abb. 2**). Es entfaltet seine angiogenetische Wirkung, indem es über die endothelialen Rezeptoren auf Zellen wirkt und letztendlich den Vorgang der Angiogenese stabilisiert. VEGF wirkt *in vivo* und *in vitro* über die endothelialen Rezeptoren mitogen [52]. Es wird in zeitlicher und räumlicher Korrelation mit physiologischen Ereignissen während der Angiogenese exprimiert [30,52]. VEGF bindet sich mit einer hohen Affinität selektiv an die Tyrosinkinase-Rezeptoren von Endothelzellen und wird sowohl parakrin von Makrophagen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und anderen Zellen als auch autokrin von Endothelzellen selbst synthetisiert [43,52].

bFGF kann an Gefäßen die Proliferation aller drei Gefäßzellarten (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) stimulieren. Es wurde 1974 zum ersten Mal isoliert [24]. Es wird als Polypeptid von einer Vielzahl verschiedener Zellen synthetisiert und liegt in zwei verschiedenen Formen vor: als acidic FGF (aFGF) mit 16 kD und als basic FGF (bFGF) mit 18 kD (**Abb. 2**). Im Gegensatz zu VEGF ist FGF nicht allein spezifisch für Endothelzellen, sondern bindet sich auch an verschiedene Zelltypen wie zum Beispiel glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Myoblasten. Durch die unterstützende Funktion bei der Degradierung von Kapillarmembranen, bei der Migration und Proliferation von Endothelzellen und durch die Produktion von Plasminogen-Aktivator spielt es eine wichtige Rolle in der Angiogenese.

Das Vorhandensein synergistischer Effekte von VEGF und bFGF um eine vollentwickelte Angiogenese zu induzieren, wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben [2,7,14,28,33,50].

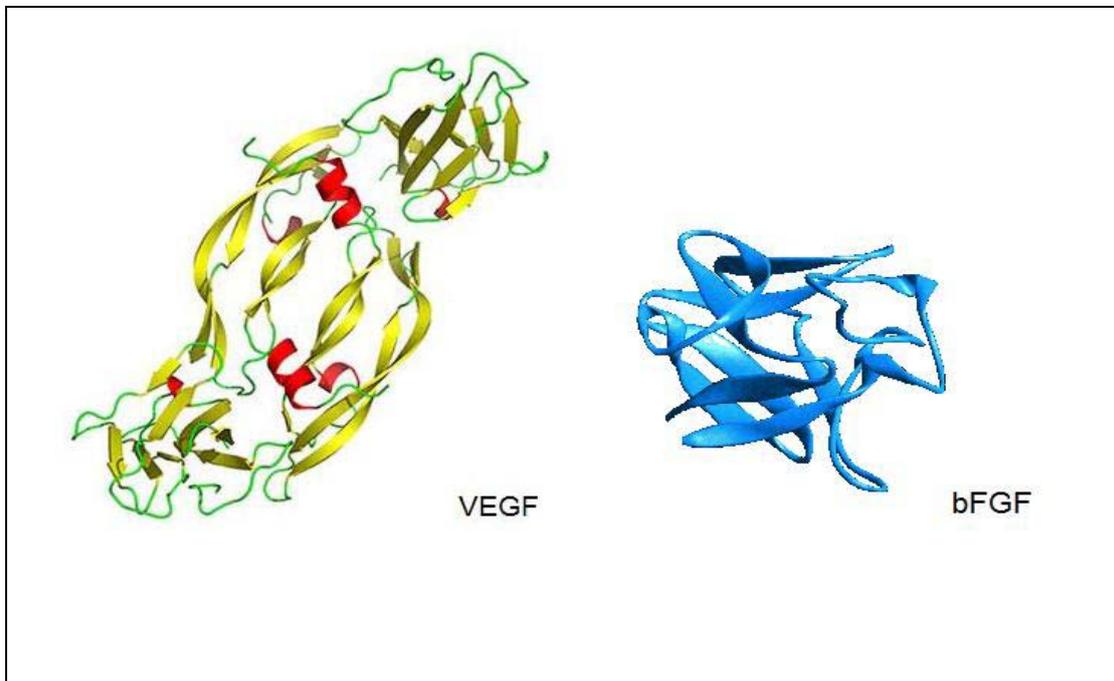


Abb. 2

Die Proteine VEGF und bFGF in ihrer molekularen Form dargestellt

(Quelle: www.3dchem.com/imagesofmolecules/1flt.jpg; www.bio.davidson.edu/.../Wheless/bFGF.jpg)

1.4 FRAGESTELLUNG

Das Überleben transplantierte Zellen erfordert eine frühzeitige nutritive Versorgung, die aufgrund des fehlenden vaskulären Netzwerkes einer bioartificialen Haut primär jedoch nicht gegeben ist. Erprobte Techniken zur Verbesserung von Angiogenese, Arteriogenese oder Vaskulogenese greifen auf die Gentechnologie und zell- und proteinbasierte Therapien zurück.

Der Einsatz von Wachstumsfaktoren zur Angiogeneseinduktion stellt einen vielversprechenden Ansatz dar. Ein Nachteil dieser proteinbasierten Therapien ist jedoch die kurze biologische Halbwertszeit der angewendeten Substanzen *in vivo*.

Ziel in den *in vitro* Versuchen war es, die Kinetik der Proteinfreisetzung zu untersuchen. Es stellte sich die Frage, ob sich durch ein Modell zur verlängerten Abgabe durch die Einbindung von VEGF¹⁶⁵ und bFGF in Fibrinkleber erzeugen lässt, welches fähig ist, Proteine für funktionelle Zwecke langsam abzugeben.

Untersucht wurde in den *in vivo* Versuchen das Modell aus den *in vitro* Versuchen. Die angiogenetischen Effekte der bioaktivierten dermalen Matrices sowie die klinischen Ergebnisse *in vivo* sollten analysiert werden.

Im Rahmen der Untersuchungen standen dabei die folgenden Fragen im Mittelpunkt:

1. Lässt sich ein „Slow release“ Modell durch Einbindung von VEGF¹⁶⁵ und bFGF in Fibrinkleber *in vitro* erzeugen?
2. Kann durch ein solches „Slow release“ Modell eine signifikante Angiogenese in einer bioartificialen dermalen Matrix *in vivo* generiert werden?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 IN VITRO EXPERIMENT

In den *in vitro* Versuchen haben wir untersucht, ob sich durch die Einbindung von VEGF¹⁶⁵ und bFGF in Fibrinkleber ein „Slow release“ Modell erzeugen lässt, welches fähig ist, Proteine für funktionelle Zwecke langsam abzugeben und wie die Kinetik der Proteinfreisetzung ist.

Zunächst ging es um die Entwicklung einer Einschätzung der Materialien, mit denen gearbeitet werden sollte. Hierbei haben wir uns mit der Struktur der kollagenen Matrix (Integra™, Integra Life Sciences, Plainsboro, N.J.) und den beiden Komponenten des Fibrinklebers (Tissucol™ Duo 2 ml Immuno; Baxter AG, Wien, Österreich; Once: Thrombinlösung; Ersta: Kleberproteinlösung) auseinandergesetzt.

Um die Fähigkeit und die Gesamtdauer der Proteinabgabe der Matrix in die PBS-Lösung ungefähr einschätzen zu können, wurde mit einer Methylenblau-Lösung, welche die Proteine der späteren Experimente symbolisieren sollte, gearbeitet. Hierzu wurde 15 µl Methylenblau auf die jeweils 6 zirkuläre 15 mm messende Kollagenkonstrukte gegeben und in 500 µl PBS-Lösung für 24 Stunden in einem 24-Well-Plate im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C aufbewahrt (**Abb. 3**).

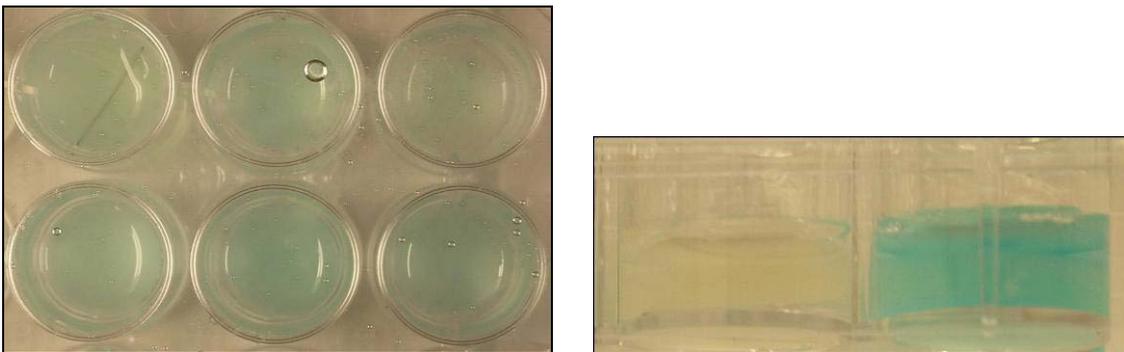


Abb. 3

Links (Ansicht von Oben): Verfärbung der PBS- Lösung durch Methylenblau nach 24 Stunden in einem 24-Well-Plate); rechts (Seitenansicht): Methylenblau enthaltende Matrix (rechts) im Vergleich zur Kontrollmatrix (PBS) (links)

Um Eigenschaften und Zusammenstellung des Fibrinklebers kennenzulernen, haben wir 3 kugelförmige Proben, bestehend aus den beiden Komponenten des Fibrinklebers, geformt. Es wurde hierbei eine nach der anderen Fibrinkleberkomponente gebraucht: 15 µl der

ersten Komponente (Thrombinlösung) wurde auf eine Petrischale mit Hilfe einer Eppendorfpipette gegeben. Anschließend wurden 15 µl der zweiten Komponente (Kleberproteinlösung) auf eine Petrischale gegeben. Wir haben 15 µl Methylblau in die zweite Komponente hineingearbeitet, indem das Methylblau auf den Tropfen der zweiten Komponente gegeben und danach insgesamt 30 µl dieser Vermengung auf die erste Komponente appliziert wurde. Danach wurden die kugelförmigen Proben des Fibrinklebers gebildet. Diese Proben wurden ebenfalls in 500 µl PBS-Lösung für 24 Stunden in einem 24-Well-Plate im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C aufbewahrt und anschließend nach einer Einlagerung über Nacht beobachtet (**Abb. 4a und b**).

Ebenfalls haben wir eingefärbte kugelförmige Proben in die Matrix platziert (zuvor wurde ein kleiner Defekt im Zentrum der Matrix gebildet) und die Farbabgabe nach einer Nacht beobachtet (**Abb. 5a und b**).

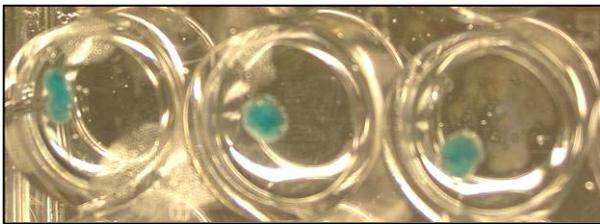


Abb. 4a
Kugelförmige Proben direkt nach der Verarbeitung mit Methylblau



Abb. 4b
Kugelförmige Proben nach 24 Stunden

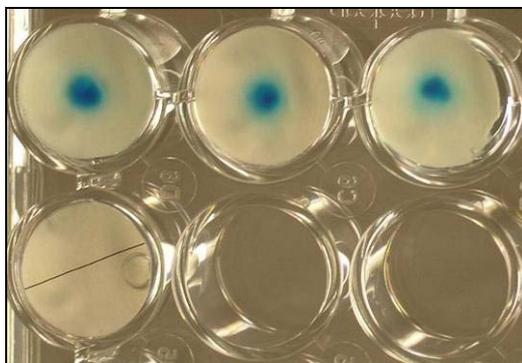


Abb. 5a
direkt nach der Integration der gefärbten Proben
in die Integra™Matrix

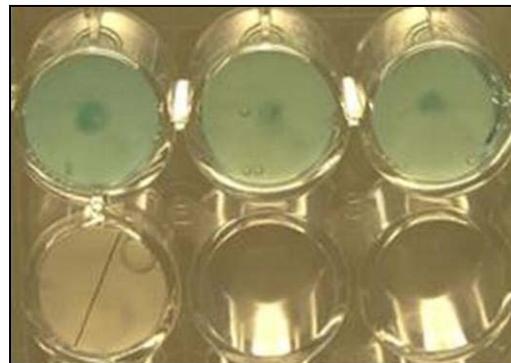


Abb. 5b
nach 24 Stunden

2.1.1 Versuchsmodell

In diesem Modell wurden zirkuläre 15 mm messende Matrices mit unterschiedlichen Protein- und Fibrinkleberkombinationen präpariert (siehe Gruppendesign und **Abb. 6a**). Die Matrices wurden in 1000 µl PBS-Lösung in einem 24-Well-Plate im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C aufbewahrt. Die Proteinabgabe in die überstehende Lösung wurde in festen Intervallen innerhalb von 2 Wochen mittels ELISA ermittelt.

2.1.2 Gruppendesign

Um die Abgabe der Wachstumsfaktoren zu bestimmen, haben wir zirkuläre 15 mm messende Integra™ Matrices vorbereitet. Sie wurden in Gruppen A - D eingeteilt. Eine Gruppe beinhaltete 3 Matrices (siehe **Tabelle 1**: Übersicht der Gruppen). Wir wollten die Proteinabgabe aus dem Fibrinkleber (Gruppe C) im Vergleich zur unmittelbaren Applikation in die Matrix (Gruppe D) bestimmen, um eine Aussage über die Kinetik der Proteinfreisetzung machen zu können, die später in den *in vivo* Versuchen Relevanz haben würde.

Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
PBS	FK	FK + WF	WF

Tabelle 1

Übersicht der Gruppen *in vitro* und *in vivo*: FK= Fibrinkleber; WF= Wachstumsfaktor

In Gruppe A haben wir die Matrices in 1000 µl PBS aufbewahrt (Kontrollgruppe).

Gruppe B wurde mit Fibrinkleberlösung (Once (12 µl), Ersta (12 µl)) behandelt. Zunächst wurden 12 µl der ersten Komponente (Once) mit einer Pipette auf die Matrix gebracht, danach wurden ebenfalls 12 µl der zweiten Komponente (Ersta) mit einer Pipette auf eine Petrischale gebracht. Anschließend wurden 12 µl PBS-Lösung mit einer Pipette auf die zweite Komponente gegeben und diese insgesamt 24 µl wurden nun auf das Gebiet der Matrix appliziert, in dem sich bereits die erste Komponente befand.

In Gruppe C verwendeten wir eine Kombination aus Fibrinkleber, VEGF¹⁶⁵ und bFGF (Wachstumsfaktoren (VEGF¹⁶⁵ (1µg) + bFGF (0,5 µg); zusammen 12 µl in gelöster Form) + Fibrinkleber ((Once (12 µl), Ersta (12 µl))). Hier wurden diesmal die gesamten 12 µl Wachstumsfaktorkombination mit der zweiten Fibrinkleberkomponente vermischt und anschließend auf die Matrix gebracht, auf der sich schon die erste Fibrinkleberkomponente befand.

Gruppe D beinhaltete ausschließlich die Wachstumsfaktorkombination und die PBS-Lösung (VEGF¹⁶⁵ (1 µg) + bFGF (0,5 µg)) + 288 µl PBS-Lösung; 288 µl PBS-Lösung, weil diese Menge zusammen mit der Lösung der beiden Wachstumsfaktoren genau 300 µl ergab und diese Menge aus praktischen Gründen einfacher anzuwenden war). Die Wachstumsfaktoren haben wir zuerst auf die Matrices gebracht, danach die 288 µl PBS-Lösung. Die Wachstumsfaktoren konnten sich so gleichmäßig in der Matrix verteilen. Es wurde nicht wie im oben beschriebenen Teil in den Gruppen B und C mit den kugelförmigen Fibrinproben gearbeitet. Die erste Komponente wurde mit einer Pipette auf ein bestimmtes Gebiet der Matrix gebracht. Die zweite Komponente wurde mit einer Pipette auf eine Petrischale gebracht, anschließend wurden die Proteine auf die zweite Fibrinkleberkomponente gegeben. Diese insgesamt 24 µl wurden auf das Gebiet der Matrix gegeben, in dem sich bereits die erste Komponente befand. Durch diese Einzelgabe ließ sich eine Verklumpung der beiden Komponenten vermeiden. So konnten die Proteine problemlos in das Konstrukt integriert werden, ohne dass die Matrix zusätzlich beschädigt werden musste. Als Beispielfoto siehe **Abb. 6a und b**.



Abb. 6a
eine zirkuläre 15mm messende
Integra™ Matrix (Übersichtsaufnahme)



Abb. 6b
Struktur der Integra™ Matrix mit
Fibrinkleber (sichtbar unten rechts) aus
mikroskopischer Sicht

2.1.3 *Integra™ Matrix*

Integra™ Artificial Skin Dermal Regeneration Template ist ein zweischichtiges Membransystem, das als biologischer Dermisersatz dient. Die dermale Ersatzschicht besteht aus einem porösen Fasergerüst aus kreuzvernetztem Rindersehnenkollagen und einem Glykosaminoglykan (Chondroitin-6-Sulfat) (siehe **Abb.**

6a, b und 7) [64,69]. Sie wird mit kontrollierter Porengröße hergestellt und hat eine verlangsamte, definierte Abbaurate. Die epidermale Ersatzschicht besteht aus einer dünnen Polysiloxanschicht (Silikon) zur Regulation des Feuchtigkeitsverlustes der Wunde.

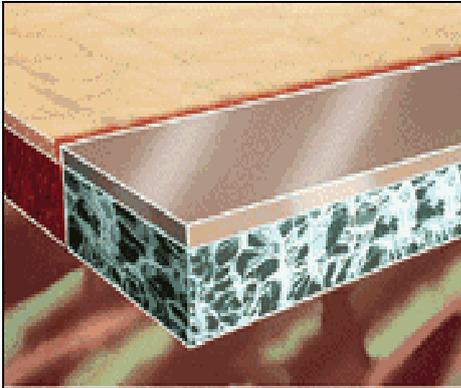


Abb. 7
Skizze der Struktur einer Integra™Matrix
(www.integra-ls.com/.../Integra%20DRT%20Demo.gif)

2.1.4 VEGF¹⁶⁵ und bFGF

VEGF ist ein homodimeres Glykoprotein (40-45 kD) (**Abb. 1**), welches die Proliferation und Migration der Endothelzellen stimuliert [18]. Inzwischen sind fünf verschiedene Subtypen (121, 145, 165, 189 und 206) bekannt, von denen die bekannteste und am häufigsten therapeutisch eingesetzte Isoform das VEGF¹⁶⁵ darstellt. Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich in ihrer Länge und in ihrer Fähigkeit, an Heparin bzw. Heparansulfat zu binden. VEGF wirkt *in vivo* und *in vitro* über die endothelialen Rezeptoren mitogen auf diese Zellen und entfaltet dadurch seine direkte angiogenetische Wirkung.

bFGF wird als Polypeptid von einer Vielzahl verschiedener Zellen synthetisiert und liegt in zwei verschiedenen Formen vor: als acidic FGF (aFGF) mit 16 kD und als basic FGF (bFGF) mit 18 kD (**Abb.1**). Im Gegensatz zu VEGF ist bFGF nicht allein spezifisch für Endothelzellen, sondern bindet an durchaus verschiedene Zelltypen wie zum Beispiel glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Myoblasten. bFGF bindet sich reversibel an heparinähnliche Moleküle und Heparinsulfatproteoglykane.

2.1.5 Fibrinkleber

Tissucol™ Fibrinkleber wird zur Blutstillung, Abdichtung, Gewebeklebung und Unterstützung der Wundheilung eingesetzt, wenn mit konventionellen Methoden kein gleichwertiger Erfolg erzielt werden kann.

Tissucol Duo Quick besteht aus zwei Komponenten: die erste Komponente (Once) besteht aus Thrombin. Die zweite Komponente besteht hauptsächlich aus einem hochkonzentrierten Fibrinogenkomplex und Plasmafibronektin, mit noch hinzugefügtem Faktor XIII und Plasminogen.

Die beiden Komponenten im Duploject (Doppelspritzenhalterung) eingelegten Fertigspritzen wurden vor den Experimenten in 1,5 ml Röhrchen umgefüllt, so dass sie einfacher mit der Eppendorfpipette entnommen werden konnten (siehe auch Beschreibung Gruppendesign).

2.1.6 Auswertung ELISA

Es wurden Proben von allen Gruppen in festen Intervallen genommen. Die Gesamtmenge von 1000 µl der überstehenden Lösung wurde abpipettiert und wieder durch 1000 µl neue PBS-Lösung alle 24 Stunden über 13 Tage lang hinweg ersetzt. Die gesammelten Proben wurden bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt. Nach Entnahme der letzten Probe wurde die Menge der Proteinabgabe mittels spezifischen bFGF und VEGF¹⁶⁵ ELISA Sätzen nach Anweisungen des Herstellers (Quantikine immunoassay kits nr. DFB 50 and DVE 00, R&D Systems Inc. Minneapolis, MN) analysiert (siehe **Abb. 8**): die Mikrotiterplatten wurden mit einem monoklonalen Antikörper (Maus) gegen die zu bestimmende Substanz der Proteine VEGF¹⁶⁵ und bFGF beschichtet. Die Platten wurden mit den Proben, Standards und der Nullprobe pipettiert und inkubiert. Die zu bestimmende Substanz hat sich an die Antikörper gebunden (Verkettung). Nach Inkubation und Waschen (gepufferte Surfactantlösung) wurde ein zweiter polyklonaler Antikörper hinzugegeben, welcher an ein Enzym (Meerrettichperoxidase (HRP)) gekoppelt war. Nach einer zweiten Inkubation und weiterem Waschen wurden die Mikrotiterplatten mit einer Chromogenlösung (Tetramethylbenzidin (TMB) mit Wasserstoffperoxid) beschichtet, die mit dem Enzym reagierte und eine Farbreaktion hervorrief. Durch Zugabe einer Säurelösung (2 N Schwefelsäure) wurde die Farbreaktion gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe eines ELISA Mikroplattenlesers (Sunrise Tecan)

quantifiziert. Die Absorption der Farbreaktion stellte sich direkt proportional zur Konzentration der zu bestimmenden Substanz in der Probe dar.

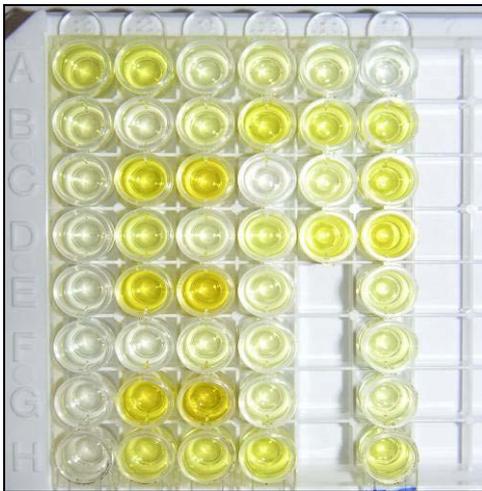


Abb. 8

Beispiel der Verwendung eines ELISA Satzes zur Ermittlung der Menge der Proteinabgabe in die Lösung (Mikrotiterplatte)

2.2 IN VIVO EXPERIMENT

Zur Untersuchung des Einflusses von VEGF¹⁶⁵ und bFGF auf die angiogenetischen Effekte *in vivo* wurde das Fibrin/Kollagen Konstrukt in 14 mm ziruklär messende Hautdefekte am Rücken von nu/nu-Mäusen integriert. Die Entnahme der implantattragenden Haut erfolgte bei jeweils der Hälfte der Tiere zwei (Versuchsreihe A) bzw. vier Wochen (Versuchsreihe B) postoperativ.

2.2.1 Tiermodell/ Tierversuchsantrag

Es wurde mit nu/nu-Mäusen im Alter von sechs bis acht Wochen gearbeitet. Ihr Gewicht betrug ca. 18-20 g (**Abb. 9a und b**). Alle Eingriffe, die an den Tieren vorgenommen wurden, erfolgten nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes und hatten die Zustimmung des Landesministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume I in Kiel unter der Nummer 27/n/06. In allen Experimenten, bei denen mit Integra™ Matrices als bioartifizieller Hautersatz gearbeitet wurde, dienten die nu/nu-Mäuse als Versuchstiere.



Abb. 9a
Nu/nu-Maus mit Kennzeichnung des zu entnehmenden Hautgebietes

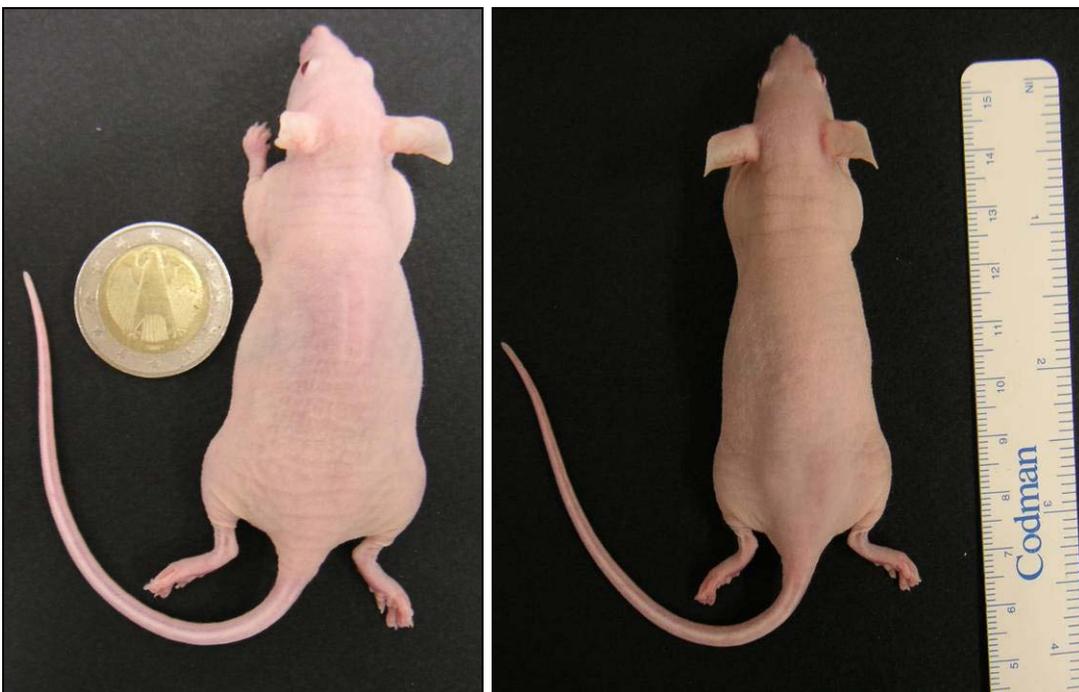


Abb. 9b
Nu/nu-Mäuse

2.2.2 Gruppendesign

Die Gruppeneinteilung hinsichtlich der Vorbereitung der Matrices erfolgte analog zu den in vitro Experimenten (siehe 2.1.2 und **Tabelle 1**). Es wurden je 24 Matrices implantiert. Pro Versuchsreihe haben wir mit 12 Tieren gearbeitet (3 Tiere pro Gruppe, das bedeutet 6 Matrices pro Gruppe). In Versuchsreihe A wurde das Zielgewebe nach zwei Wochen, in Versuchsreihe B nach vier Wochen entnommen.

Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
----------	----------	----------	----------

PBS	FK	FK + WF	WF
-----	----	---------	----

Tabelle 1

Übersicht der Gruppen in vitro und in vivo: FK= Fibrinkleber; WF= Wachstumsfaktor

2.2.3 Operationstechnik

Zunächst wurden die Tiere kurz vor ihrer Operation mit Ketamin (Ketamin 10%®, Pfizer; Karlsruhe, Germany, 0,0108 µg pro Gramm des Körpergewichtes) und Xylazin (Rompun®, Bayer; Leverkusen, Germany, 0,0024 µg pro Gramm des Körpergewichtes) durch eine interperitoneale Injektion anästhesiert. Das zu entnehmende Gebiet auf der Haut wurde farblich gekennzeichnet (**Abb. 9a**). Anschließend wurden zirkuläre ca. 14 mm messende Vollhautdefekte bilateral am Rücken einer jeden nu/nu-Maus gesetzt (**Abb. 9c**). Die ausgestanzten 15 mm zirkulär messenden Integra™ Matrices wurden in den Vollhautdefekt integriert. Die Matrices wurden spannungsfrei mit 8 resorbierbaren 4/0 Einzelknopfnähten (Serafit®, Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) fixiert (**Abb. 9d**). Nach der Operation folgte der Verband mit Mepitel® (Mölnlycke Health Care GmbH Erkrath, Deutschland) und Leukoplast® (BSN Medical, Hamburg, Deutschland). Zur Sicherstellung der Qualität des Verbandes wurde dieser in regelmäßigen Abständen kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Die Ernährung und Haltung erfolgte nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Die postoperative Überwachung der Mäuse in einem Einzelkäfig erfolgte in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck alle 24 Stunden. Die Tiere erhielten durchgehend Wasser und Haltungsfutter für Mäuse ad libitum.



Abb. 9c

ca. zirkulärer 14 mm messender Vollhautdefekt bilateral am Rücken der Nu/nu-Maus



Abb. 9d

Integration in den Vollhautdefekt der ausgestanzten zirkulär 15 mm messenden Integra™ Matrix

2.2.4 Materialgewinnung

Nach zwei Wochen in Versuchsreihe A und vier Wochen (siehe **Abb. 9e** als Beispiel für den Zustand einer Matrix nach vier Wochen) in Versuchsreihe B wurde das Zielgewebe der Haut entnommen (**Abb. 9f und g**). Vor Entnahme der Haut wurde jedes Tier mit einer Überdosis der für die Anästhesie genutzten Zusammenstellung von Ketamin und Xylazin getötet. Dem Zielgebiet, welches die in den Vollhautdefekt integrierte Integra™ Matrix darstellte, wurden die Fäden und die Silikonschicht entfernt. So konnte die Quantifizierung dieses Gewebes später unter optimalen Bedingungen stattfinden. Danach wurde die Haut - mit der Innenseite nach oben- in einer Petrischale ausgebreitet (**Abb. 9a**). Nun wurden noch störende Gewebereste (zum Beispiel Bindegewebe oder Fett), die das genaue Abfotografieren der neu entstandenen Blutgefäße in der Dermis hätten beeinträchtigen können, entfernt.



Abb. 9e

Zustand der Matrix nach 4 Wochen

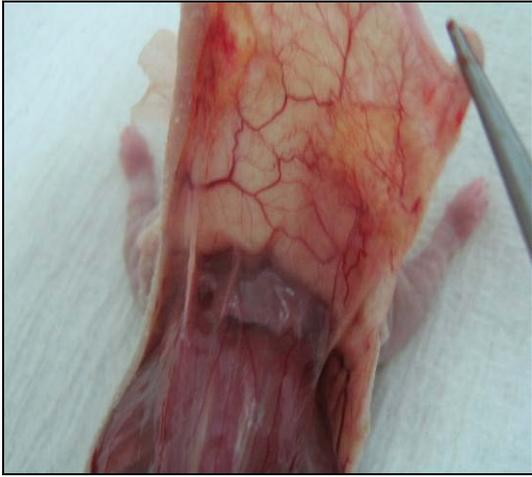


Abb. 9f
Entnahme des Zielgewebes



Abb. 9g
Ansicht der Innenseite der Matrix während der Entnahme des Zielgewebes

2.2.5 *Klinische Beobachtung*

Alle Matrixgebiete wurden täglich auf Autokannibalismus oder Matrixverlust aufgrund von Infektionen oder anderen Gründen kontrolliert. Trat tatsächlich ein Matrixverlust oder eine Kontraktur des Wundrandes oder der Matrix selbst auf, so mussten diese Tiere dann durch andere, neu zu operierende Tiere ersetzt werden.

2.2.6 *Segmentierung*

Um das Wachstum der neu entstandenen Blutgefäße in der Matrix zu quantifizieren, wurde das Zielgewebe mit der Hautinnenseite in der Petrischale nach oben hin platziert und auf einen Transilluminator gestellt (**Abb. 10a**). Ein Foto in TIFF (tagged image file format)-Qualität wurde aufgenommen (**Abb. 10b**), invertiert und segmentiert (**Abb. 10c-d**).



Abb. 10a

Das Zielgewebe wurde mit der Hautinnenseite in der Petrischale nach oben hin platziert und auf den Transilluminator gestellt. Es folgte eine Fotografie des Hautareals

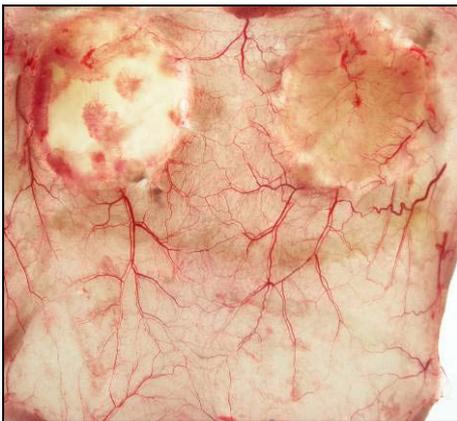


Abb. 10b

Das Zielgewebe in der Petrischale auf dem Transilluminator in TIFF-Qualität abfotografiert

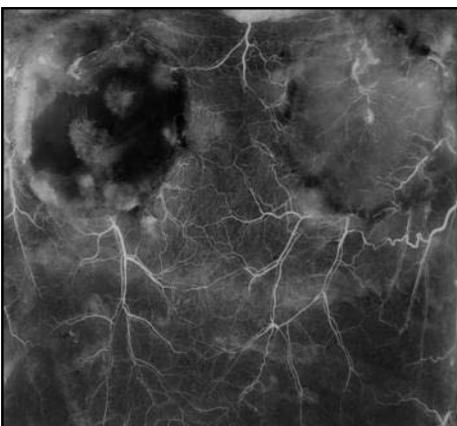


Abb. 10c

Das Foto mit dem VesSeg-Programm invertiert

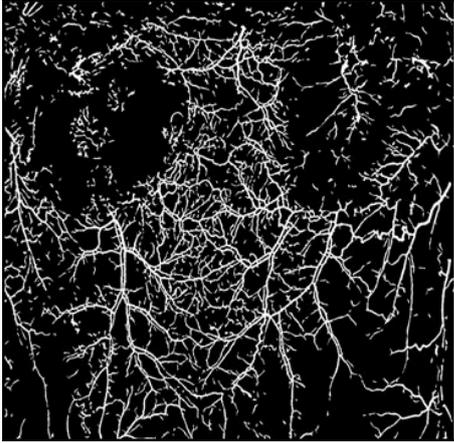


Abb. 10d

Das segmentierte Foto mit den auszuwertenden Gebieten

2.2.7 Auswertung

Mit Hilfe des VesSeg-Programmes (Vessel Segmentation) konnte die Anzahl der neu geformten Blutgefäße quantifiziert werden [42] (siehe **Abb. 10d**). Es wurden drei willkürliche Gebiete, die nicht operiert wurden, ausgewählt. Hieraus ergab sich eine Durchschnittsanzahl von Blutgefäßen, die als „normales“ Hautgebiet als Referenzwert für die zu berechnenden Blutgefäße aus den Matrixgebieten dienen. Die Prozentanzahl der neuen Blutgefäße aus den operierten Gebieten konnte so errechnet werden.

2.2.8 Histologie

Querschnitte von jeweils 4 Matrices einer jeden Gruppe beider Experimente wurden analysiert. Paraffinschnitte (5µm) wurden mit Hämotoxin/ Eosin und CD 31 gefärbt (**Abb. 14a und b**). Eine immunohistochemische CD31 und Hämotoxin/ Eosinfärbung wurde durchgeführt.

Die immunohistochemische CD31-Färbung wurde durch die Verwendung einer standardisierten Drei-Schritt Immunoperoxidasetechnik getätigt und Diaminobenzidin als Chemogen verwendet. Die 5 µm dicken Paraffinschnitte wurden 45 Minuten lang in einem Decloaker (PBS-Puffer, pH 9.5) vorbehandelt und dann für 25 Minuten mit dem primären polyklonalen Ziegenantikörper PECAM-1 inkubiert (Verdünnung 1:60; Klon M-20: Santa Cruz, CA, USA), gefolgt von einer Inkubation mit einem sekundären Antikörper (biotin-SP-conjugated Maus anti-Ziegen IgG; Dianova, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:50). Danach wurden die Schnitte für 15 Minuten mit horse-raddish peroxidase (HRP; Dako, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation für 10 Minuten mit

DAB (Dako), wurden die Schnitte mit Meyer's Hämotoxin gefärbt (Merck, Darmstadt, Deutschland).

2.3 STATISTIK

Die Tabellenkalkulation wurde mit Microsoft Excel für Windows durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) für Windows unter der Verwendung des zweiseitigen t-Tests. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen.

3. ERGEBNISSE

3.1 IN VITRO EXPERIMENT

3.1.1 Auswertung ELISA

Bei der ersten Messung der Wachstumsfaktorkonzentration nach 24 Stunden wurden 9,7% und 6,6% der ursprünglich angewendeten Menge von VEGF¹⁶⁵ in den Gruppen C und D detektiert (97,21 ng/ml \pm 13,45 und 66,37 ng/ml \pm 10,25). Die korrespondierenden Werte für bFGF waren 1,7% und 0,19% (8,53 ng/ml \pm 0,25 und 0,96 ng/ml \pm 0,21). In den Gruppen A und B ließ sich keine Proteinabgabe detektieren. In den Gruppen C und D erfolgte der Nachweis einer kontinuierlichen Freisetzung von bFGF und VEGF¹⁶⁵ über 13 Tage (**Abb. 11a und b**), jedoch fielen die Mengen der Proteine schnell. Schon nach 48 Stunden fiel die VEGF¹⁶⁵-Konzentration auf 48,71 ng/ml \pm 8,12 und 31,59 ng/ml \pm 4,51 in den Gruppen C und D zurück. Die korrespondierenden Werte für bFGF waren 0,98 ng/ml \pm 0,23 und 0,33 ng/ml \pm 0,07. Die VEGF¹⁶⁵-Konzentration lief nach 9 Tagen beinahe gegen Null in Gruppe C und in Gruppe D war dies nach 4 Tagen der Fall. Die bFGF-Konzentration fiel auf unter 0,05 ng/ml in Gruppe C nach 10 Tagen und in Gruppe D nach 6 Tagen. Nach 12 Tagen konnte noch eine signifikant höhere Freisetzung von bFGF in der Fibrinkleber enthaltenen Gruppe C als in Gruppe D ($p < 0,05$) festgestellt werden. Die VEGF¹⁶⁵-Freisetzung war nach 8 Tagen signifikant zurückgegangen ($p < 0,05$).

Die Einbindung der Wachstumsfaktoren in Fibrinkleber bewirkte eine signifikante Verlangsamung der Freisetzung und somit eine verlängerte Verfügbarkeit der Proteine ($p < 0,05$). Das bFGF-Protein im Vergleich mit dem VEGF¹⁶⁵-Protein wurde stärker und länger in der Matrix gehalten, was eine verlängerte Proteinabgabe in die PBS-Lösung bedeutete.

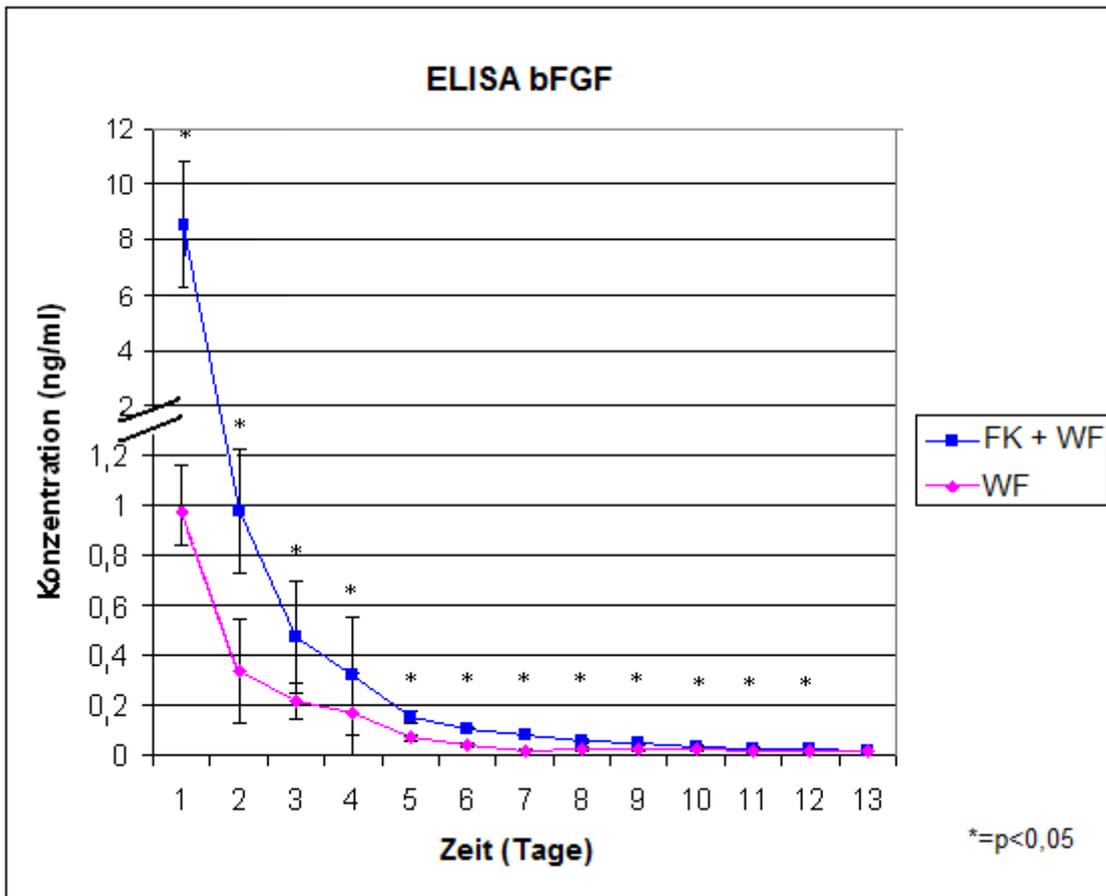


Abb. 11a

Abgabe von bFGF (a) und VEGF¹⁶⁵ (b) in vitro. In den Gruppen C und D konnte eine kontinuierliche Abgabe von bFGF (a) und VEGF¹⁶⁵ (b) detektiert werden. An den Tagen 1 bis 12 konnte ein signifikanter Unterschied in der Proteinabgabe zwischen den Gruppen C und D für bFGF festgestellt werden ($p < 0,05$) (a). An den Tagen 1,2,4,5,6 und 8 wurde ein signifikanter Unterschied in der Proteinabgabe zwischen den Gruppen C und D für VEGF¹⁶⁵ festgestellt ($p < 0,05$) (b). Im Allgemeinen war die bFGF-Freisetzung in den Gruppen C und D niedriger als es bei VEGF¹⁶⁵ der Fall war.

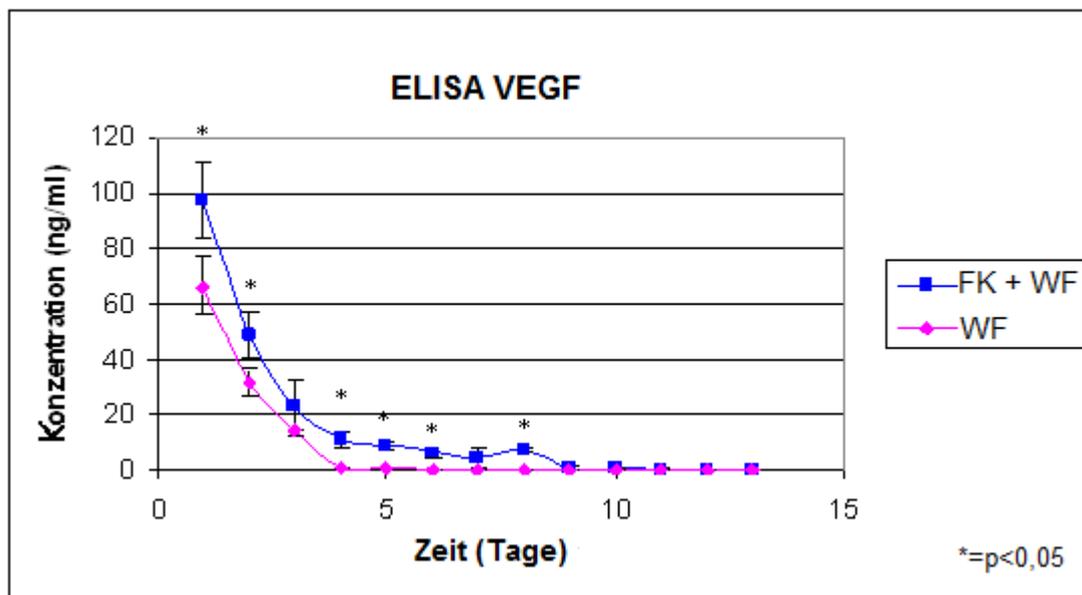


Abb. 11b

3.2 IN VIVO EXPERIMENT

3.2.1 Resultate Segmentierung

Neu geformte Blutgefäße wurden im Hautersatz als die Prozentzahl der Blutgefäße im umgebenden Gewebe spezifiziert.

Vergleiche erfolgten zur Gruppe A und Gruppe D, Gruppe B und C und Gruppe C und D (zwei und vier Wochen) (**Abb. 12**).

Nach 2 und 4 Wochen wies Gruppe A $17,5 \pm 1,3\%$ und $21,9 \pm 1,0\%$ und Gruppe B $22,8 \pm 1,9\%$ and $27,0 \pm 2,9\%$ neu gebildete Blutgefäße auf. Die korrespondierenden Werte für Gruppe C waren $55,7 \pm 2,9\%$ und $80,0 \pm 4,0\%$ und für Gruppe D $82,6 \pm 4,0\%$ und $62,3 \pm 4,0\%$.

Zu beiden Zeitpunkten führte die Anwendung von VEGF¹⁶⁵ und bFGF (Gruppe C und D) zu einer signifikant höheren Vaskularisierung im Hautersatz im Vergleich zu Gruppe A und B ($p < 0,001$). Unterschiede zwischen dem alleinigen Gebrauch von PBS oder Fibrinkleber (Gruppe A und B) waren nur signifikant für die Gruppe B nach zwei Wochen ($p < 0,05$), nicht jedoch nach vier Wochen ($p = 0,1$).

Während die Vaskularisierung höher in Gruppe D nach zwei Wochen war ($p < 0,05$), konnten mehr Blutgefäße nach vier Wochen in der Wachstumsfaktor mit Fibrinkleber kombinierten Gruppe C detektiert werden ($p < 0,001$). Das Verhältnis änderte sich also nach vier Wochen zu Gunsten der Gruppe C.

Bilder der unterschiedlichen Gruppen nach Entnahme des Zielgewebes nach zwei und vier Wochen werden in **Abbildung 13a und b** gezeigt. Die dunkelroten Verfärbungen, die teilweise in den Matrices zu erkennen sind, wurden durch Hämoglobin hervorgerufen (Einblutungen während der Gewebeentnahme). Sie wurden nicht vom VesSeg-Programm als Blutgefäße identifiziert. Das Programm erkennt selektiv nur longitudinale Strukturen, aber keine korpuskulären Formen als Blutgefäße.

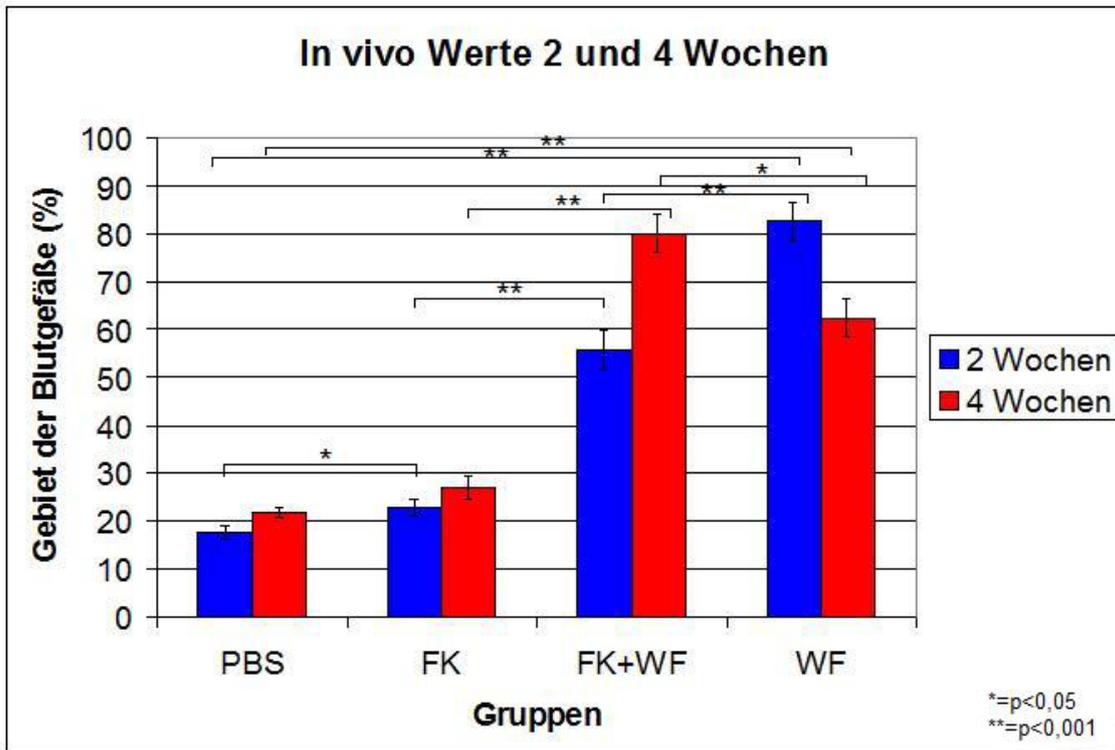


Abb. 12

Die Vaskularisierung der Matrices in vivo nach zwei und vier Wochen. Nach zwei Wochen wurden signifikant mehr Blutgefäße in den Gruppen C und D gefunden, im Vergleich zu den Gruppen A und B ($p < 0,001$). Signifikant mehr Blutgefäße traten in Gruppe D im Vergleich zu Gruppe C auf ($p < 0,001$). Nach vier Wochen wurden signifikant mehr Blutgefäße in den Gruppen C und D gesehen, im Vergleich zu den Gruppen A und B ($p < 0,001$). Signifikant mehr Blutgefäße wurden in Gruppe C im Vergleich zu Gruppe D detektiert ($p < 0,05$).

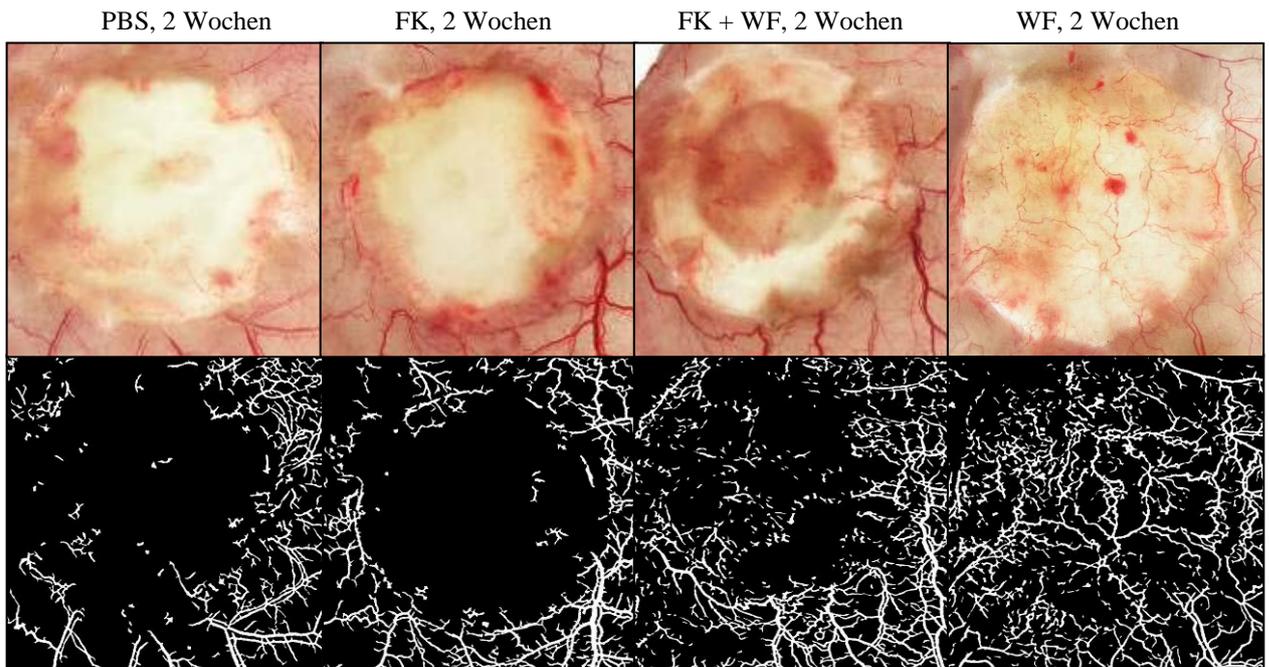


Abb. 13a

Beispielbilder der unterschiedlichen Gruppen nach Entnahme des Zielgewebes nach zwei und vier Wochen. Die dunkelroten Einfärbungen der Matrices wurden durch Hämoglobin hervorgerufen (Einblutung während der Gewebeentnahme). Sie wurden nicht vom VesSeg-Programm als Blutgefäße interpretiert. Das Programm erkennt selektiv longitudinale Strukturen, jedoch keine korpuskulären Formen als Blutgefäße.

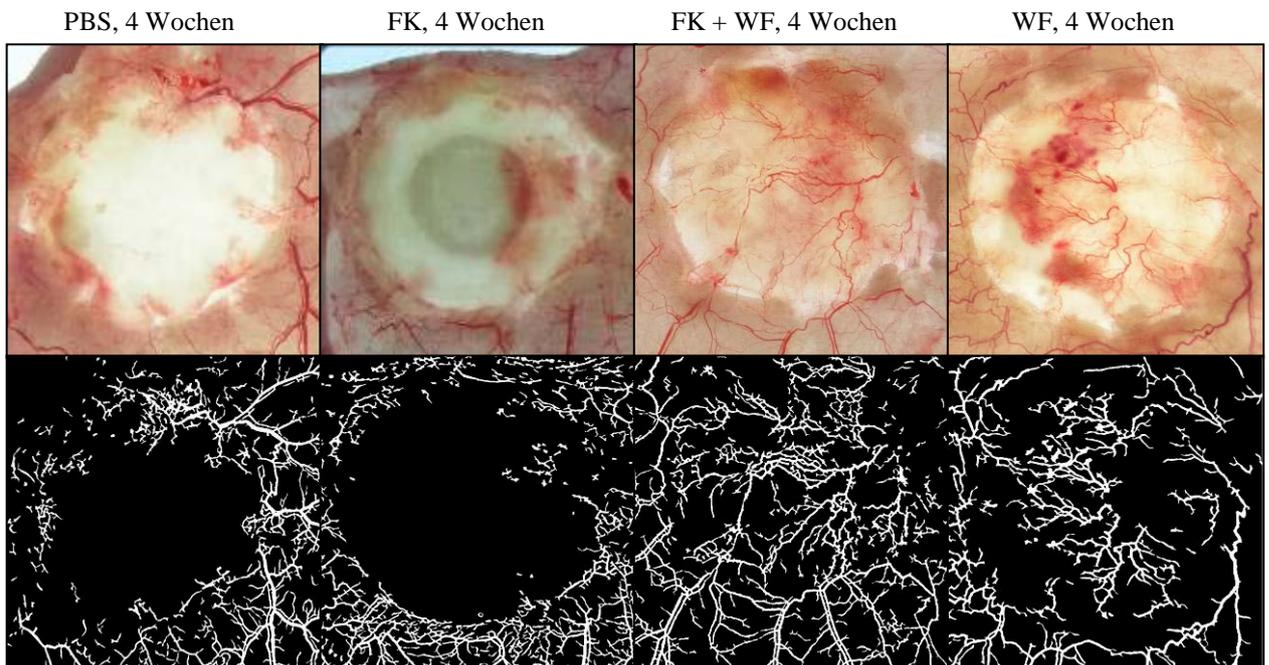


Abb. 13b

3.2.2 Histologie

Querschnitte von jeweils 4 Matrices einer jeden Gruppe beider Experimente wurden analysiert. Paraffinschnitte (5µm) wurden mit Hämotoxin/ Eosin und CD 31 gefärbt. Eine immunohistochemische CD31 und Hämotoxin/ Eosinfärbung wurde durchgeführt. Die Antikörper, die für die Färbung verwendet wurden, sind gegen CD31 gerichtet, welche von allen Endothelzellen stark exprimiert werden und geeignet sind, die Angiogenese zu beurteilen.

Gut definierte Blutgefäße wurden in allen Gruppen gefunden, es schien jedoch so, dass mehr Blutgefäße in den Gruppen, die mit Wachstumsfaktoren behandelt wurden, gefunden wurden (sowohl nach 2 als auch nach 4 Wochen). Eine Quantifizierung der neu gebildeten Blutgefäße fand nicht statt. Die Schnitte repräsentieren nur einen kleinen Ausschnitt der gesamten Matrix und variieren außerdem noch innerhalb der jeweiligen Probe. Repräsentative Aufnahmen der Histologien werden in **Abb. 14a und b** gezeigt.

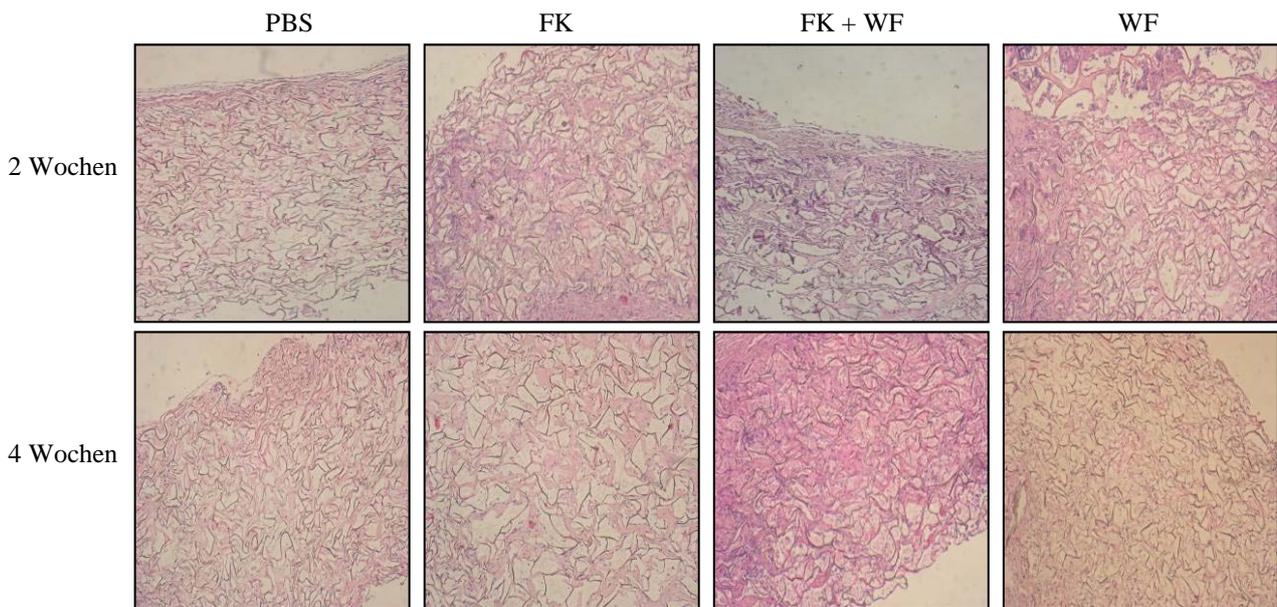


Abb. 14a

Repräsentative Bilder der Histologieschnitte sind zu sehen. Färbung: Hämotoxin und Eosin; 100-fache Vergrößerung (a) Die Kollagenstruktur der Integra™ Matrix ist hier sehr gut zu erkennen.

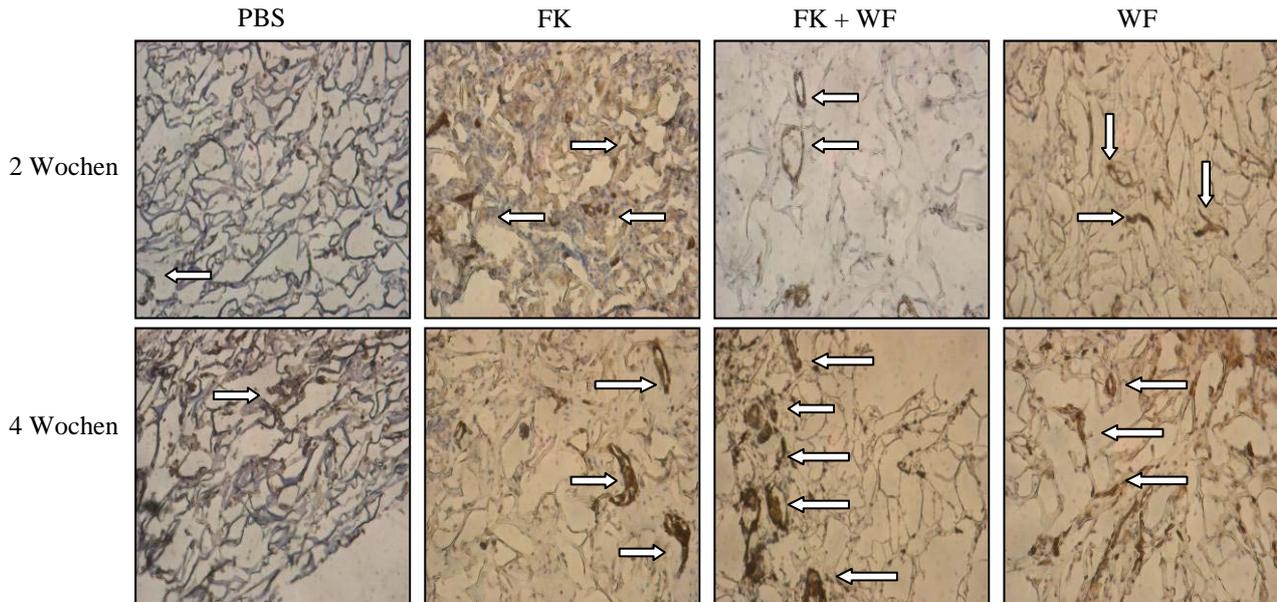


Abb. 14b

CD 31 Färbung; 200-fache Vergrößerung (b). Auch hier ist die Kollagenstruktur der Integra™ Matrix gut zu erkennen. Gut definierte Blutgefäße wurden in allen Gruppen gefunden, besonders in den Gruppen C und D nach zwei und vier Wochen. Die Blutgefäße sind in Abb. 14b mit weißen Pfeilen markiert.

3.2.3 Klinische Beobachtung

In diesem Experiment ging es nicht um die Auswertung der Matrixverluste aufgrund eines Infektes oder Kontrakturen der Wunde in bestimmten Gruppen, sondern um die Quantifizierung der Angiogenese in den Zielgebieten der unterschiedlichen Gruppen. Es wurden ausschließlich die Zielgebiete, die keine Kontrakturen oder Matrixverluste erlitten, ausgewertet. Nur ein intaktes Zielgebiet war die Voraussetzung für eine Quantifizierung. Vor einer jeden Hautentnahme wurde das Zielgebiet standardisiert fotografiert.

4. DISKUSSION

Diese Arbeit betont den Nutzen biodegradierbarer Träger als Medium für die lokale und kontrollierte Bereitstellung von angiogenetischen Proteinen wie VEGF¹⁶⁵ und bFGF.

Eine Anzahl von spezifischen Faktoren sind dafür bekannt, die Angiogenese zu stimulieren oder zu inhibieren. Hierzu zählen zum Beispiel „vascular growth factors“, inflammatorische Zytokine, Adhesionmoleküle und Stickoxide.

Eine genaue Regulierung dieser Faktoren ist für eine effiziente Neovaskularisation wichtig. Verschiedene biologische Aktivitäten sind in den unterschiedlichen Phasen, von der Initiierung bis zur Maturation der Angiogenese notwendig [18]. Einige Wachstumsfaktorfamilien und Zytokine, die in der Lage sind, eine physiologische Blutgefäßformation zu induzieren, sind bereits bekannt. In dieser Studie können frühere Forschungsergebnisse, die zeigten, dass die Angiogenese durch einige Wachstumsfaktoren wie VEGF¹⁶⁵ und bFGF erweitert werden kann, bestätigt werden [34].

Wachstumsfaktoren sind bioaktive Proteine, die wichtige Rollen in der Regulierung des Wachstums und der Differenzierung spezifischer Zelltypen und als Zell-Zell signalisierende Messenger in dem komplexen Prozess der Wundgenesung spielen [31,51]. Einige dieser Wachstumsfaktoren, einschließlich VEGF und bFGF, sind in die Regulierung der Formation neuer Blutgefäße durch die Angiogenese eingeschlossen [67]. VEGF und FGF entfalten ihre Wirkung direkt an den Endothelzellen.

VEGF beinhaltet unterschiedliche biologische Aktivitäten. Es erhöht die mikrovaskuläre Permeabilität, übt mitogene Effekte auf endotheliale Zellen aus, stimuliert die Proliferation und Migration der Endothelzellen, induziert die Expression interstitieller Kollagenase und treibt die Magrophagenmigration an.

VEGF ist ein Schlüsselmediator der Angiogenese wie auch ein potentes Mitogen für endotheliale Zellen und induziert eine Migration der endothelialen Zellen und ein sogenanntes „sprouting“ bei einer Hochregulation einiger endothelialen Integrin Rezeptoren [16].

Andererseits ist VEGF dafür bekannt, bei alleiniger Gabe nur instabile Gefäßstrukturen („leaky vessels“) zu induzieren [9]. Frühere Studien haben gezeigt, dass VEGF¹⁶⁵ eine temporäre Angiogenese innerhalb weniger Tage induzieren kann [44].

VEGF ist ein homodimeres Glykoprotein (40-45 kD), welches die Proliferation und Migration der Endothelzellen stimuliert [18]. Es entfaltet seine angiogenetische Wirkung, indem es über die endothelialen Rezeptoren auf Zellen wirkt und letztendlich den Vorgang der Angiogenese stabilisiert. VEGF wirkt *in vivo* und *in vitro* über die endothelialen Rezeptoren mitogen [52]. VEGF wird in zeitlicher und räumlicher Korrelation mit physiologischen Ereignissen während der Angiogenese exprimiert [30,52].

Es bindet sich mit einer hohen Affinität selektiv an die Tyrosinkinase-Rezeptoren von Endothelzellen und wird sowohl parakrin von Makrophagen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und anderen Zellen als auch autokrin von Endothelzellen selbst synthetisiert [43].

VEGF existiert in fünf Isoformen (121, 145, 165, 189 und 206), von denen die bekannteste und am häufigsten therapeutisch eingesetzte Isoform VEGF¹⁶⁵ ist. Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich in ihrer Länge und in ihrer Fähigkeit, an Heparin bzw. Heparansulfat zu binden. Durch diese Bindung sind sie in freier Form vorhanden, es bleibt aber auch eine signifikante Fraktion an Zelloberfläche und Extrazellulärmatrix gebunden. VEGF¹⁶⁵ ist eine frei im Plasma gelöste Form, kann aber auch an Heparin binden, während VEGF¹⁸⁹ und VEGF²⁰⁶ eine hohe Affinität zu Heparin besitzen und meist an heparinhaltige Proteoglykane der extrazellulären Matrix gebunden sind. Die Interaktion von VEGF mit heparinähnlichen Molekülen der Extrazellulärmatrix ist für eine Bindung an den Rezeptor notwendig. Es sind vier transmembrannöse Rezeptortypen auf Endothelzellen für VEGF (1 bis 4) bekannt, die alle der Tyrosinaserezeptorfamilie angehören [19,20,38,49,53]. Die kürzeste Form mit einer Länge von 121 Aminosäuren bindet weder an Heparin noch an die extrazelluläre Matrix. VEGF¹²¹ und VEGF¹⁶⁵ sind lösliche Proteine, die beide ins Medium sezerniert werden. Daneben kommt noch die Isoform VEGF¹⁴⁵ vor, die eine weniger starke Affinität zu Heparin zeigt [48,63].

bFGF, ein anderer, gut studierter angiogenetische Faktor, kann diverse biologische Effekte an vielen Zelltypen, einschließlich endothelialen Zellen, hervorrufen und ist oft in klinischen Studien zur Induzierung der Angiogenese verwendet worden. bFGF wurde schon in unterschiedliche Polymere, wie zum Beispiel Gelatine, Collagen, Chitosan und

PLA hineingearbeitet. bFGF bindet sich reversibel an heparinähnliche Moleküle und Heparinsulfatproteoglykane. Dieses kann für eine erhöhte Bindungskapazität von bFGF an polymere „Slow release“ Systeme genutzt werden, was dann in einer kontrollierteren und unterstützten Abgabe von bFGF und einer Verstärkung der Angiogenese resultiert [6].

bFGF kann an Gefäßen die Proliferation aller drei Gefäßzellarten (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) stimulieren. Es wurde 1974 zum ersten Mal isoliert [24]. Es wird als Polypeptid von einer Vielzahl verschiedener Zellen synthetisiert und liegt in zwei verschiedenen Formen vor: als acidic FGF (aFGF) mit 16 kD und als basic FGF (bFGF) mit 18 kD. Im Gegensatz zu VEGF ist FGF nicht allein spezifisch für Endothelzellen, sondern bindet sich auch an verschiedene Zelltypen wie zum Beispiel glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Myoblasten. Durch die unterstützende Funktion bei der Degradierung von Kapillarmembranen, bei der Migration und Proliferation von Endothelzellen und durch die Produktion von Plasminogen-Aktivator spielt es eine wichtige Rolle in der Angiogenese. bFGF zeigt eine hohe Affinität zu Heparin und hat zwei Domänen für die Bindung an das in der extrazellulären Matrix vorkommende Glycosaminoglycan [24]. Dabei wirkt Heparin als Stabilisator für das bFGF- Protein. Schon nach einmaliger Gabe bewirkt bFGF innerhalb von fünf bis zehn Tagen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Angiogenese im Zielgebiet [43].

Diese angiogenetische Potenz von bFGF steht wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Produktion von Proteasen durch bFGF, welche eine partielle Desintegration der Basalmembran im Muttergefäß als ersten Schritt beim Aussprossen von Endothelzellen bewirken und zudem eine chemotaktische und mitogene Wirkung auf Endothelzellen haben. Außerdem scheint bFGF die Expression von alpha- versus beta-Integrinkomplexen in menschlichen Endothelzellen zu modulieren, was einen Hinweis für die zusätzliche indirekte angiogenetische Wirkung von bFGF gibt.

Bei den FGF-Rezeptoren handelt es sich um spezifische Zelloberflächenrezeptoren der Tyrosinkinasefamilie mit extrazellulärer Ligandenbindungsstelle [14]. Es existieren vier Hauptgruppen, FGFR-1 bis FGFR-4, sowie weitere Formen [5].

Das Vorhandensein synergistischer Effekte von VEGF und bFGF, um eine vollentwickelte Angiogenese zu induzieren, wurde von mehreren Autoren beschrieben [2,7,14,28,33,50].

Pepper et al. konnten einen synergistischen Effekt von VEGF und bFGF *in vitro* zeigen. Sie behandelten BME-Zellen (bovine microvascular endothelial cells) in einem

Kollagengel, welches humanes VEGF¹⁶⁵ und bFGF enthielt. Bei gleichzeitiger Anwendung beider Wachstumsfaktoren wurde eine angiogene Antwort induziert, die umfangreicher war, und welche mit einer höheren Geschwindigkeit auftrat, verglichen mit der Einzelfaktorgabe [50].

Es konnte nicht nur *in vitro* diese synergistische Wirkung von VEGF und bFGF auf die Angiogenese nachgewiesen werden, sondern auch *in vivo* Versuche zeigten vergleichbare Ergebnisse. In einem Kaninchenmodell mit unilateraler Hinterlaufischämie untersuchten Asahara et al. die Kombination von VEGF und bFGF. Zehn Tage nach Induktion der Ischämie wurden jeweils VEGF oder bFGF, beziehungsweise eine Kombination aus VEGF und bFGF über einen Katheter in die A. iliaca interna injiziert. Nach 10 beziehungsweise 30 Tagen wurde festgestellt, dass eine Kombinationstherapie einen signifikant größeren und schnelleren Aufbau einer Kollateralzirkulation stimulierte als VEGF oder bFGF alleine, welches in einer stärkeren hämodynamischen Verbesserung resultierte. Die kombinierte Gabe von VEGF und bFGF wirkte also synergistisch [2].

In einem weiteren *in vivo* Versuch von Cao et al. [7] gab es Hinweise auf einen wirkungssteigernden Einfluss durch die kombinierte Expression von VEGF und bFGF auf eine stabile Angiogenese. Mäusen wurde entweder bFGF und VEGF oder bFGF zusammen mit VEGF in Korneamikropockets (Matrigel®) eingebracht. Die Angiogenese fiel bei kombinierter Gabe der beiden Wachstumsfaktoren stärker aus als bei einer Einzelgabe der Faktoren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der entstandene Gefäßplexus in der Kombinationstherapie, im Gegensatz zu den Einzelfaktorversuchen, zu einem gut definierten vaskulären Netzwerk wurde, welches ebenfalls entscheidend länger bestehen blieb als die durch Einzelfaktoren induzierten Gefäße. In einem anderen Versuch von Cao et al. nahm durch die Kombinationstherapie der beiden Faktoren die Gefäßlekkage durch Reduktion der Gefäßfenestration ab [8]. Diese Daten wurden ebenfalls von Kondoh et al. bestätigt, die einen signifikanten Anstieg der Dichte von glatten Gefäßmuskelzellen in einem Kaninchenmodell mit Hinterlaufischämie gefunden haben [33]. Von der Kombination von VEGF und bFGF wurde berichtet, dass diese potente synergistische Effekte auf die neovaskuläre Ausbildung unter experimentellen Umständen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* haben [28]. Es ist bekannt, dass bFGF eine VEGF-Expression in Gefäßendothelzellen induziert, was einen Teil des Synergismus von VEGF und bFGF erklären könnte [14].

Die Entwicklung neuer therapeutischer Annährungen, die zum Ziel haben, dass der Körper seine natürlichen Mechanismen für das vaskularisierte Gewebewachstum ausnutzt, wird therapeutische Angiogenese genannt. Es ist eines der aktivsten Gebiete im Tissue Engineering geworden.

Es wurden Versuche unternommen, Wachstumsfaktoren direkt anzuwenden oder DNA für solche Faktoren zu enkodieren [4], es ist jedoch unbekannt, ob diese Faktoren aufgrund ihrer kurzen biologischen Halbwertszeit *in vivo* lang genug im Zielgewebe blieben um effektiv wirken zu können [6,45,57].

Ein prolongierter Effekt der proteinbasierten Therapie wird für die Induktion stabiler Kapillärstrukturen gebraucht. Deshalb wurden biodegradierbare Träger entwickelt. Sie können die Wiederherstellung von Struktur und Funktion geschädigter oder nicht funktionierender Gewebe erleichtern und können angiogenetische Signalproteine über einen längeren Zeitraum von ein bis zwei Wochen freisetzen [43]. Ist die Konzentration der Faktoren kontrolliert, ist die lokale Dauer und die räumliche Verteilung ein Schlüssel zu ihrer Zweckmäßigkeit und Effektivität. Um sich dieser Herausforderung widmen zu können, wurden kontrollierte Trägersysteme entwickelt, die Wachstumsfaktoren in polymere Biomaterialien einbauen können, um die Zeit der Gewebeexposition zu verlängern und die Wachstumsfaktorstabilität zu handhaben [16]. Diese Träger können Polymerfestkörper aus Polyester oder Polyanhydriten sein, bei denen inkorporierte Signalproteine weniger durch Diffusion in die Umgebung, sondern mehr durch Hydrolyse des Festkörpers selbst freigesetzt werden [43]. Die Träger wurden beispielsweise von Garcia-Esteo et al., F, Gimeno et al. und Luty et al. verwendet [22,23,41].

In einem diabetischen Rattenmodell untersuchten Gimeno et al. den Wundheilungsprozess von diabetischen und gesunden Ratten. Hierbei wurden polymere biodegradierbare Träger, die hGH (human growth hormone) enthielten, in einen Haundefekt am Rücken der Tiere integriert. Bei den Tieren, bei denen das Polymer-hGH System verwendet wurde, schloss sich die Haut schneller, die Keratinisierung und Fibrose der Haut traten schneller auf. Die Verwendung dieses biodegradierbaren Trägers in Kombination mit hGH hatte einen günstigen Effekt auf die Wundheilung in diabetischen Ratten [23].

Die zweite Form der biodegradierbaren Träger sind Hydrogele, welche als dreidimensionale Polymernetzwerke reines Wasser aufnehmen können und eine kontinuierliche Diffusion von inkorporierten Signalstoffen aus dem Polymerverband

erlauben [13,32,70]. Doi et al. verwendeten ein Hydrogel als Träger für bFGF in einem Kaninchenmodell mit Hinterlaufischämie, um die Angiogenese und Gewebepfusion zu untersuchen. Hierzu wurde den Tieren die rechte A. femoralis entnommen. Nach zwei Wochen wurden die Tiere eingeteilt: keine Behandlung, intramuskuläre Injektion von ausschließlich Hydrogel oder Injektion von Hydrogel in Kombination mit bFGF. Vier Wochen später konnte mit Hilfe von Angiographie, Doppler-Messung und histologischer Auswertung gezeigt werden, dass der mediale Oberschenkelmuskel des ischämischen Hinterlaufes in der Gruppe, in der das Hydrogel in Kombination mit bFGF verwendet wurde, eine bessere Gewebepfusion, mehr Arteriolen und eine höhere allgemeine Gefäßdichte aufwies.

Biodegradierbare Träger können als „Slow release“ System für angiogenetische Proteine dienen. Ein häufig verwendeter biodegradierbarer Träger ist das sogenannte Integra™ Artificial Skin Dermal Regeneration Template. Es ist ein zweischichtiges Membransystem. Die dermale Ersatzschicht besteht aus einem porösen Fasergerüst aus kreuzvernetztem Rindersehnenkollagen und einem Glykosaminoglykan (Chondroitin-6-Sulfat) (siehe **Abb. 6a, b und 7**) [64,69]. Die epidermale Ersatzschicht besteht aus einer dünnen Polysiloxanschicht (Silikon) zur Regulation des Feuchtigkeitsverlustes der Wunde. Eine Verwendung eines derartigen dermalen Ersatzes wurde erstmalig von Yannas und Burke 1981 beschrieben. Die Integra™ Matrix findet sowohl klinisch [13,21,47,68] als auch experimentell [13,36] große Anwendung. Ein Grund, warum wir die Integra™ Matrix verwendeten, war unter anderem die große klinische Erfahrung, die bereits mit diesem biodegradierbaren Träger gemacht wurde. Weitere Gründe sind auf die Kollagenstruktur des Trägers zurückzuführen: die verwendeten Proteine konnten kontrollierter in das Zielgewebe abgegeben werden und die neu entstandenen Gefäße konnten sich gut in die Kollagenstruktur einfügen.

Grundsätzlich müssen bei diesen Verfahren natürlich die carrierspezifischen lokalen inflammatorischen und damit auch angiogenetischen Effekte nach Implantation *in vivo* berücksichtigt werden [43]. Ein vielversprechender Ansatz, die angiogenetische Leistung zu verbessern, geschieht durch die Verwendung von Biomaterialien, welche die sequenzierte Lieferung von Wachstumsfaktoren erlauben [15].

Biodegradierbare Träger werden sowohl in zellbasierten Therapien als auch in azellulären Therapien verwendet. In azellulären Therapien induzieren Materialien Einwuchs und Differenzierung der Zellen von gesunden Residualgeweben *in situ* [40].

Im Allgemeinen ist der Gebrauch von azellulären biodegradierbaren Trägern, die die Matrixvaskularisation unterstützen, unter verschiedenen Gesichtspunkten von Vorteil; zum Beispiel als Matrices für die Zellinfiltration, um Regeneration und Remodellierung *in vivo* zu induzieren, oder als Träger für transplantierte Zellen, die in den Gewebedefekt transplantiert werden.

Jedoch ist das Arbeiten mit zellbasierten Therapien oft mit Schwierigkeiten verbunden, wie zum Beispiel der Auflösung der Zellen oder Pathogentransmission. Für die klinische Verwendung haben Protein- oder matrixbasierte Therapien den Vorteil, auf zelluläre Komponenten verzichten zu können. Der Gebrauch solcher Protein- oder matrixbasierten Therapien wird durch das deutsche Medizinproduktegesetz gestattet. Auf diese Weise kann eine ausführliche Begutachtung, die für erweiterte zellbasierte Therapien gemäß dem neuen Gewebegesetz erforderlich ist, umgangen werden.

Die Fähigkeit des Fibrinagglomerats, das Wachstum neuer Blutgefäße zu stimulieren und zu unterstützen, ist äußerst gut dokumentiert und spielt eine wichtige Rolle in der Wiederherstellung der Blutversorgung in verletzten Gebieten. Ein Fibrinnetzwerk ist entscheidend für eine effektive Wundheilung und es ist biodegradierbar durch Gewebefibrinolyse [67].

Da Fibrin langsam aufgelöst wird, kann es als Träger in Form von unterschiedlichen Mitteln benutzt werden, die helfen können, Wunden zu heilen und neues Gefäßwachstum zu fördern, oder um Antibiotika und andere therapeutische Mittel einzuspeichern und langsam abzugeben [54,71].

Zusätzlich verhält sich Fibrin wie ein natürliches Reservoir für die Bindung und die Abgabe bestimmter Wachstumsfaktoren wie VEGF¹⁶⁵ und bFGF [32]. Die Verwendung fibrinbasierter Biomaterialien in Wundheilungstherapien beruht auf der Tatsache, dass physiologische Fibrinagglomerate eine wichtige provisorische Matrix bei normaler Gewebereparatur darstellen.

In unseren *in vitro* Experimenten konnte beobachtet werden, dass Proteine in die Kollagenstruktur der Integra™ Matrix inkorporiert werden können. Es war möglich, ein Modell für den „Slow release“ von Proteinen durch die Kombination von VEGF¹⁶⁵, bFGF und Fibrinkleber zu produzieren. Die Inkorporation der Wachstumsfaktoren in den Fibrinkleber resultierte in einer verlangsamten Abgabe der Wachstumsfaktoren, was durch

eine signifikant höhere Konzentration der Wachstumsfaktoren über mehrere Tage in Gruppe C im Vergleich zu Gruppe D ($p < 0,05$) repräsentiert wurde (**Abb. 11a und b**).

Die Matrices in den Gruppen C und D enthielten initial 1 μg VEGF¹⁶⁵ und 0,5 μg bFGF. Nur kleine Mengen der angewendeten Proteine wurden in der Probe (in den 1000 μl PBS), vor allem im Falle von bFGF, detektiert. Eine schnelle, komplette Proteindiffusion in die Probe hinein sollte einen ersten Hochpunkt in der Wachstumsfaktorkonzentration verursachen. Jedoch würde die Menge der Proteine, die unter physiologischen Umständen bei 37°C degradiert, bevor eine Probe für die erste Messung nach 24 Stunden genommen wurde, nicht in den Werten auftreten. Da Proteinmessungen nur alle 24 Stunden ausgeführt wurden, könnte eine kontinuierliche Degradierung beider Proteine verantwortlich für die allgemein reduzierte Konzentration zu Zeiten der Probenentnahme –und Verarbeitung sein. Die Werte könnten nur die Proteinfreisetzung eines deutlich kürzeren Zeitraumes als die letzten 24 Stunden repräsentieren. Um endgültig diese Frage beantworten zu können, wäre es notwendig gewesen, die gesamte Proteinmenge am Ende des Experimentes innerhalb der Matrix zu messen, beziehungsweise kürzere Entnahmeintervalle zu wählen. Eine andere Erklärung für die niedrig zu detektierenden Wachstumsfaktorkonzentrationen könnte eine Interaktion der Wachstumsfaktoren mit Kollagen oder Fibrinkleber sein. Bei dem 24-Stunden Zeitpunkt wurden 9,7% und 6,6% der initial angewendeten Menge von VEGF¹⁶⁵ in der Probe in den Gruppen C und D detektiert. Die korrespondierenden Werte für bFGF waren 1,7% und 0,19%. bFGF unterging anscheinend einer schnelleren Degradierung oder es zeigte eine vielleicht irreversible Bindung zum Fibrin oder Kollagen. Mit Degradierung ist in diesem Fall der Zerfall der Proteine gemeint. Der Zerfall beruht auf der Halbwertszeit oder der Stabilität des Proteins bei einer Temperatur von 37°C. Die Proteine sind bis zu zwölf Monate bei -20°C bis -70°C haltbar. Nach Anbruch und wiederholter Anwendung bei 2°C -8°C sind sie einen Monat und bei -20°C bis -70°C drei Monate ohne nachweisbaren Verlust der Aktivität haltbar. Die Kühlkette sollte hierbei so wenig möglich unterbrochen werden.

Um die Annahme einer stärkeren Bindung zum Fibrin oder Kollagen von bFGF zu unterstützen, wäre eine Immunohistochemie des gesamten dermalen Kollagensatzes wünschenswert. Jedoch konnte eine Detektierung aufgrund starker kollateraler Anfärbung der Kollagenmatrix und aufgrund von Kreuzreaktionen mit Nager- VEGF¹⁶⁵ und bFGF *in vivo* nicht durchgeführt werden.

Dennoch korrespondieren die höheren Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im Fibrinkleber, in Gruppe C im Vergleich zu Gruppe D, zu den *in vivo* Befunden einer besseren, länger anhaltenden Vaskularisierung in Gruppe C nach 4 Wochen.

In den *in vivo* Experimenten konnte beobachtet werden, dass die Gabe von VEGF¹⁶⁵ und bFGF mit oder ohne Einfügen in den Fibrinkleber zu einer signifikant und schnelleren Neovaskularisierung der bioartifiziellen dermalen Kollagenträger führte (**Abb. 13, 14a,b**). Die Einfügung in den Fibrinkleber führte initial zu weniger angiogenetischen Effekten im Vergleich zu der freien Proteininjektion in das Kollagen. Dieser Effekt zeigt sich durch eine höhere Anzahl von Blutgefäßen in Gruppe D (WF). Jedoch änderte sich dieses Verhältnis nach 4 Wochen, was in einer höheren Blutgefäßdichte in Gruppe C führte, welche Fibrinkleber in Kombination mit den Wachstumsfaktoren enthielt.

Dieser Wechsel wurde möglicherweise durch die verlangsamte Abgabe der Wachstumsfaktoren im „Slow release“ System, welches durch den Fibrinkleber entstanden ist, verursacht. Ein schneller Fluss der Proteine in das umgebende Gewebe in Gruppe D resultiert wahrscheinlich in einem Anstieg der Neovaskularisierung in einem frühen Stadium. Jedoch kann eine erhöhte, stabile und lang anhaltende Vaskularisierung nur durch die kontinuierliche Wachstumsfaktorversorgung wie in Gruppe C hervorgerufen werden. Wie bereits erwähnt, wurde bFGF für einen längeren Zeitraum in der Matrix gehalten als VEGF¹⁶⁵.

Dieses könnte zum folgendem biologischem Effekt beigetragen haben: VEGF ist verantwortlich für das sogenannte „vessel sprouting“ und den Einwuchs der Gefäße in die Matrix. Der Anteil, der vom bFGF in der Matrix übriggeblieben ist, ist verantwortlich für die Stabilisierung der Blutgefäße [16]. Das könnte ein weiterer Grund sein, warum mehr Blutgefäße in der Gruppe C nach 4 Wochen detektiert wurden.

Dank einer neu entwickelten Segmentierungstechnik, einem Computerprogramm genannt „VesSeg“, entwickelt von Condurache und Aach [42], war die Voraussetzung gegeben, im gesamten Matrixgebiet die Vaskularisierung in den Gruppen A bis D zu quantifizieren (**Abb. 10b-d, 13a,b**). Das Programm erkennt selektiv longitudinale Strukturen als Blutgefäße. Nach Abstimmung der elektronischen Photographie des Gewebes wurde die Gefäßquantifizierung beinahe automatisch fertiggestellt. Unsere Gruppe wendete diese Technik erstmalig für die Evaluierung von Blutgefäßdichten an und konnte somit eine Gesamtaussage zur Matrixvaskularisierung geben. Im Allgemeinen ist die Segmentierung der Neovaskularisierung des Zielgewebes repräsentativer als die Mikrogefäßdichte, die

bisher in Histologien gezeigt wurde [61,66]. Eine Histologie ist immer nur eine selektive Aufnahme der Vaskularisation im jeweiligen Schnittmuster, während die Segmentierungstechnik das gesamte Zielgewebe zeigt. Andere Methoden, um die Vaskularisierung eines Gewebes darzustellen und zu quantifizieren, sind unter anderem die Radioaktive Markierung [39], die Doppler-Sonographie [1] oder eine Auswertung mit Hilfe einer Angiographie [65]. In früheren Experimenten verwendeten wir ebenfalls die Technik der Angiographie mit der anschließenden Auswertung neu entstandener Blutgefäße mit Hilfe eines Computerprogramms [25]. Da jedoch durch unsere neue Technik auf unkompliziertere und sicherere Weise eine Gesamtaussage zur Matrixvaskularisierung getätigt werden konnte, fiel die Wahl auf diese Art der Quantifizierung der Neovaskularisierung vom Zielgewebe.

In unseren Histologien wurden in allen Gruppen gut definierte Blutgefäße gefunden, es schien jedoch so, dass mehr Blutgefäße in den Gruppen, die mit Wachstumsfaktoren behandelt wurden, erkennbar waren (sowohl nach zwei als auch nach vier Wochen). Die Antikörper, die für die Färbung verwendet wurden, sind gegen CD31 gerichtet, welche von allen Endothelzellen stark exprimiert werden und geeignet sind, die Angiogenese zu beurteilen. Darum waren keine weiteren Immunhistologien zwingend notwendig. Eine Quantifizierung der neu gebildeten Blutgefäße fand aus oben genannten Gründen nicht statt. Die Schnitte repräsentieren nur einen kleinen Ausschnitt der gesamten Matrix und variieren außerdem stark innerhalb der jeweiligen Probe. Repräsentative Aufnahmen der Histologien werden in **Abb. 14a und b** gezeigt.

Trotz des Wissens um den Gebrauch dermalen Regenerationsträger in Hautdefekten, um eine Vaskularisierung zu induzieren, bleibt immer noch die Frage, wie eine stabile Struktur sich neu entwickelnder Blutgefäße garantiert werden soll. In anderen, bis jetzt unpublizierten Experimenten konnte eine stabile Struktur für sich neu entwickelnde Blutgefäße über einen Zeitraum länger als 6 Monate in einem zellbasierten Hautersatzträger nach Zelltransfektion mit DNA-Sequenzen, die VEGF¹⁶⁵ und bFGF kodieren, erreicht werden [58].

Eine Entwicklung von Blutgefäßen nach Gabe von Wachstumsfaktoren in Kombination mit Fibrinkleber scheint effektiver in der Entwicklung einer patenten und stabilen

Vaskulatur zu sein als die alleinige Gabe von Wachstumsfaktoren. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass VEGF¹⁶⁵ und bFGF stärker in den Fibrinkonstrukten gehalten wurden und somit gleichzeitig langsamer abgegeben wurden. Es ist das erste Mal, dass dieses Modell für die Unterstützung der Neovaskularisierung in einem künstlichen dermalen Ersatz angewendet wurde. Diese Art eines „Slow release“ Systems könnte ebenfalls gewinnversprechend für den Ersatz von anderen Proteinen sein, wie zum Beispiel Chemokine wie SDF-1 (stromal cell-derived factor) oder (HIF-1)-alpha (Hypoxia-inducible factor 1).

In unseren Experimenten konnte ein „Slow release“ System für VEGF¹⁶⁵ und bFGF durch die Inkorporation in ein sich langsam degradierendes Fibrinkonstrukt, welches in einen bioartifiziellen dermalen Hautersatz platziert wurde, entwickelt werden. Die verlängerte Abgabe der Proteine scheint gewinnbringend für die vaskuläre dermale Regeneration zu sein. Dieser Ansatz ist ein vielversprechendes System für einen großen Bereich von Funktionen in der weiteren Forschung im Bereich des Tissue Engineering.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Nachteil der proteinbasierten Therapie ist die kurze biologische Halbwertszeit der angewendeten Substanzen *in vivo*. So ist von Interesse, die Kinetik der Proteinfreisetzung *in vitro* zu bestimmen und die angiogenetischen Effekte der verschiedenen bioaktivierten dermalen Matrices sowie die klinischen Ergebnisse *in vivo* zu analysieren. Im Rahmen der Untersuchungen standen dabei die folgenden Fragen im Mittelpunkt:

1. Läßt sich ein „Slow release“ Modell durch Einbindung von VEGF¹⁶⁵ und bFGF in Fibrinkleber *in vitro* erzeugen?
2. Kann durch ein solches „Slow release“ Modell eine signifikante Angiogenese in einer bioartificialen dermalen Matrix *in vivo* generiert werden?

In diesem Modell wurden zirkuläre 15 mm messende Kollagenmatrices (Integra™, Integra LifeSciences) mit unterschiedlichen Protein und Fibrinkleberkombinationen präpariert.

Hierzu wurde *in vitro* ein flüssiges Fibrin/Kollagen Konstrukt, welches VEGF¹⁶⁵ und bFGF beinhaltet, in eine bioartificiale Matrix integriert und die folgende Proteinfreigabe detektiert. Die Untersuchungen erfolgten an den kollagenen Matrices unter Bildung von insgesamt 4 Gruppen mit je 3 Matrices (Gruppe A= Kontrollgruppe (PBS), Gruppe B= Fibrinkleber, Gruppe C= VEGF¹⁶⁵/bFGF + Fibrinkleber und Gruppe D= VEGF¹⁶⁵/bFGF). Die Proteinabgabe in die überstehende Lösung wurde in festen Intervallen innerhalb der ersten 13 Tage mittels ELISA ermittelt.

In vivo wurde das Fibrin/Kollagen Konstrukt in zirkuläre 15 mm messende Hautdefekte am Rücken von nu/nu-Mäusen integriert. In den unveränderten Gruppen A-D wurden je 12 Matrices implantiert. Die Entnahme der implantattragenden Haut erfolgte bei jeweils der Hälfte der Tiere zwei beziehungsweise vier Wochen postoperativ.

In den *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich durch Einbindung von VEGF¹⁶⁵ und bFGF in Fibrinkleber ein „Slow release“ Modell erzeugen lässt, welches fähig ist, Proteine für funktionelle Zwecke langsam abzugeben. Die Einbindung der Wachstumsfaktoren in Fibrinkleber bewirkte eine signifikante Verlangsamung der Freisetzung und somit eine verlängerte Verfügbarkeit der Proteine ($p < 0,05$).

In den *in vivo* Versuchen hat sich gezeigt, dass Fibrin und Kollagen in der Lage sind, Wachstumsfaktoren verlangsamt abzugeben und dadurch längerfristig signifikant mehr Blutgefäße in der Matrix zu induzieren und dass die alleinige Gabe von Wachstumsfaktoren in Kollagen zu einer beschleunigten Freigabe führt, die wiederum eine

initial stärkere Gefäßausbildung bewirkt. Während somit nach zwei Wochen noch eine höhere Gefäßdichte in Gruppe D ($p < 0,001$) zu erkennen war, änderte sich dieses Verhältnis nach vier Wochen zu Gunsten der Gruppe C ($p < 0,05$).

In diesen Experimenten konnte ein „Slow release“ System für VEGF¹⁶⁵ und bFGF entwickelt werden durch die Inkorporation in einen sich langsam degradierenden Fibrinkonstrukt, welches in einen bioartifiziellen dermalen Hautersatz platziert wurde. Die verlängerte Abgabe der Proteine war gewinnbringend für die vaskuläre dermale Regeneration. Dieser Ansatz empfiehlt sich für einen großen Bereich von Funktionen in weiterer Forschung im Bereich des Tissue Engineering, wenn es gilt, Matrices früher und dauerhafter zu vaskularisieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adler RS, Bell DS, Bamber JC, Moskovic E, Thomas JM: Evaluation of soft-tissue masses using segmented color Doppler velocity images: preliminary observations *AJR Am J Roentgenol*; 172: 781-788 (1999)
2. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM: Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*; 92: II365-II371 (1995)
3. Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, Forrest CR, Addison PD, Moses MA, Levine RH, Pang CY: Vasodilator effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor in skin vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 286: H946-H954 (2004)
4. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM: Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg*; 21: 314-324 (1995)
5. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB: Biological roles of fibroblast growth factor-2 *Endocr Rev*; 18: 26-45 (1997)
6. Boonthekul T, Mooney DJ: Protein-based signaling systems in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*; 14: 559-565 (2003)
7. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, Cao Y: Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med*; 9: 604-613 (2003)
8. Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J: Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res*; 94: 664-670 (2004)
9. Carmeliet P: VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer *Oncology*; 69 Suppl 3: 4-10 (2005)
10. Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*; 6: 389-395 (2000)
11. Carmeliet P: Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*; 9: 653-660 (2003)
12. Conway EM, Collen D, Carmeliet P: Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*; 49: 507-521 (2001)
13. Dantzer E, Queruel P, Salinier L, Palmier B, Quinot JF: Dermal regeneration template for deep hand burns: clinical utility for both early grafting and

reconstructive surgery
Br J Plast Surg; 56: 764-774 (2003)

14. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, Cattini PA: Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium
Cardiovasc Res; 57: 8-19 (2003)
15. Doi K, Ikeda T, Marui A, Kushibiki T, Arai Y, Hirose K, Soga Y, Iwakura A, Ueyama K, Yamahara K, Itoh H, Nishimura K, Tabata Y, Komeda M: Enhanced angiogenesis by gelatin hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor in rabbit model of hind limb ischemia
Heart Vessels; 22: 104-108 (2007)
16. Elcin YM, Dixit V, Gitnick G: Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing
Artif Organs; 25: 558-565 (2001)
17. Engler DA: Use of vascular endothelial growth factor for therapeutic angiogenesis.
Circulation; 94: 1496-1498 (1996)
18. Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ: Clinician guide to angiogenesis
Circulation; 108: 2613-2618 (2003)
19. Ferrara N, Kerbel RS: Angiogenesis as a therapeutic target. Nature; 438: 967-974 (2005)
20. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML: Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium
Nature; 376: 66-70 (1995)
21. Frame JD, Still J, Lakhel-LeCoadou A, Carstens MH, Lorenz C, Orlet H, Spence R, Berger AC, Dantzer E, Burd A: Use of dermal regeneration template in contracture release procedures: a multicenter evaluation
Plast Reconstr Surg; 113: 1330-1338 (2004)
22. Garcia-Esteo F, Pascual G, Gallardo A, San-Roman J, Bujan J, Bellon JM: A biodegradable copolymer for the slow release of growth hormone expedites scarring in diabetic rats
J Biomed Mater Res B Appl Biomater; 81: 291-304 (2007)
23. Gimeno MJ, Garcia-Esteo F, Garcia-Honduvilla N, San RJ, Bellon JM, Bujan J: A novel controlled drug-delivery system for growth hormone applied to healing skin wounds in diabetic rats
J Biomater Sci Polym Ed; 14: 821-835 (2003)
24. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G: Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. Endocr Rev; 8: 95-114 (1987)
25. Grzybowski S, Bucsky B, Stockelhuber BM, Aach T, Condurache A, Mailander P, Machens HG: [A microangiography technique to quantify fasciocutaneous blood

vessels in small laboratory animals]
Handchir Mikrochir Plast Chir; 37: 403-407 (2005)

26. Hayward PG, Alison WE, Jr., Carp SS, Hui PS, Robson MC: Local infiltration of an angiogenic growth factor does not stimulate the delay phenomenon. *Br J Plast Surg*; 44: 526-529 (1991)
27. Hockel M, Burke JF: Angiotropin treatment prevents flap necrosis and enhances dermal regeneration in rabbits
Arch Surg; 124: 693-698 (1989)
28. Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T, Ouchi Y, Miyazono K, Miyazawa K: VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *J Cell Sci*; 118: 3759-3768 (2005)
29. Khan A, Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, Kontos C, Zhong A, Forrest CR, Pang CY: Acute local subcutaneous VEGF165 injection for augmentation of skin flap viability: efficacy and mechanism
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol; 287: R1219-R1229 (2004)
30. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo
Nature; 362: 841-844 (1993)
31. Kim WJ: Cellular signaling in tissue regeneration
Yonsei Med J; 41: 692-703 (2000)
32. Kipshidze N, Chekanov V, Chawla P, Shankar LR, Gosset JB, Kumar K, Hammen D, Gordon J, Keelan MH: Angiogenesis in a patient with ischemic limb induced by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor and fibrin platform
Tex Heart Inst J; 27: 196-200 (2000)
33. Kondoh K, Koyama H, Miyata T, Takato T, Hamada H, Shigematsu H: Conduction performance of collateral vessels induced by vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Res*; 61: 132-142 (2004)
34. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R, van H, V: Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity
J Cell Biol; 132: 1177-1188 (1996)
35. Kopp CW, Steiner S, Minar E: Therapeutische Angiogenese bei peripher-arterieller Verschlusskrankheit. *J Kardiologie*; 11: 79-83 (2004)
36. Kremer M, Lang E, Berger AC: Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix(Integra artificial skin)
Br J Plast Surg; 53: 459-465 (2000)

37. Kurz H, Burri PH, Djonov VG: Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci*; 18: 65-70 (2003)
38. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI: Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4
Proc Natl Acad Sci U S A; 93: 1988-1992 (1996)
39. Li S, Dobrucki LW, Sinusas AJ, Liu YH: A new method for SPECT quantification of targeted radiotracers uptake in the myocardium
2. Med Image Comput Comput Assist Interv Int Conf Med Image Comput Comput Assist Interv; 8: 684-691 (2005)
40. Lutolf MP, Hubbell JA: Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering
Nat Biotechnol; 23: 47-55 (2005)
41. Luttly GA, Liu SH, Prendergast RA: Angiogenic lymphokines of activated T-cell origin
Invest Ophthalmol Vis Sci; 24: 1595-1601 (1983)
42. Machens HG, Grzybowski S, Bucsky B, Spanholtz T, Niedworok C, Maichle A, Stockelhuber B, Condurache A, Liu F, Egana JT, Kaun M, Mailander P, Aach T: A technique to detect and to quantify fasciocutaneous blood vessels in small laboratory animals *ex vivo*
J Surg Res; 131: 91-96 (2006)
43. Machens HG, Mailander P: [Mechanisms and therapeutic strategies for the induction of angiogenesis in plastic surgery]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*; 37: 383-395 (2005)
44. Machens HG, Salehi J, Weich H, Munch S, Siemers F, Krapohl BD, Herter KH, Kruger S, Reichert B, Berger A, Vogt P, Mailander P: Angiogenic effects of injected VEGF165 and sVEGFR-1 (sFLT-1) in a rat flap model. *J Surg Res*; 111: 136-142 (2003)
45. Masuoka K, Ishihara M, Asazuma T, Hattori H, Matsui T, Takase B, Kanatani Y, Fujita M, Saito Y, Yura H, Fujikawa K, Nemoto K: The interaction of chitosan with fibroblast growth factor-2 and its protection from inactivation. *Biomaterials*; 26: 3277-3284 (2005)
46. McNamara DA, Harmey JH, Walsh TN, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ: Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br J Surg*; 85: 1044-1055 (1998)
47. Muangman P, Deubner H, Honari S, Heimbach DM, Engrav LH, Klein MB, Gibran NS: Correlation of clinical outcome of integra application with microbiologic and pathological biopsies
J Trauma; 61: 1212-1217 (2006)

48. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors
FASEB J; 13: 9-22 (1999)
49. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von EG, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U: Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells
Proc Natl Acad Sci U S A; 93: 2576-2581 (1996)
50. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R: Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro
Biochem Biophys Res Commun; 189: 824-831 (1992)
51. Pierce GF, Mustoe TA: Pharmacologic enhancement of wound healing. Annu Rev Med; 46: 467-481 (1995)
52. Plate KH, Warnke PC: Vascular endothelial growth factor
J Neurooncol; 35: 365-372 (1997)
53. Risau W, Flamme I: Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol; 11: 73-91 (1995)
54. Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA: Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix
J Control Release; 69: 149-158 (2000)
55. Shou M, Thirumurti V, Rajanayagam S, Lazarous DF, Hodge E, Stiber JA, Pettiford M, Elliott E, Shah SM, Unger EF: Effect of basic fibroblast growth factor on myocardial angiogenesis in dogs with mature collateral vessels. J Am Coll Cardiol; 29: 1102-1106 (1997)
56. Siemionow M, Arslan E: Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers
Microsurgery; 24: 468-475 (2004)
57. Silva EA, Mooney DJ: Spatiotemporal control of vascular endothelial growth factor delivery from injectable hydrogels enhances angiogenesis
J Thromb Haemost; 5: 590-598 (2007)
58. Spanholtz T.: Synergistische therapeutische Effekte von bFGF und VEGF165 nach Transplantation isogener adenoviral transfizierter Fibroblasten im ischämischen Lappenmodell der Ratte
3. Chirurgisches Forum 2004 für experimentelle und klinische Forschung; 33: 421-423 (2004)
59. Supp DM, Boyce ST: Overexpression of vascular endothelial growth factor accelerates early vascularization and improves healing of genetically modified cultured skin substitutes
J Burn Care Rehabil; 23: 10-20 (2002)

60. Supp DM, Wilson-Landy K, Boyce ST: Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice *FASEB J*; 16: 797-804 (2002)
61. Tarta C, da Silva, V, Teixeira CR, Prolla JC, Meurer L, Neto CC, Tanaka S: Digital image analysis and stereology of angiogenesis in polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas *Anal Quant Cytol Histol*; 26: 201-206 (2004)
62. Thompson JA, Anderson KD, DiPietro JM, Zwiebel JA, Zametta M, Anderson WF, Maciag T: Site-directed neovessel formation in vivo *Science*; 241: 1349-1352 (1988)
63. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Nakamura M: Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer*; 77: 998-1002 (1998)
64. Tompkins RG, Hilton JF, Burke JF, Schoenfeld DA, Hegarty MT, Bondoc CC, Quinby WC, Jr., Behringer GE, Ackroyd FW: Increased survival after massive thermal injuries in adults: preliminary report using artificial skin. *Crit Care Med*; 17: 734-740 (1989)
65. van Vliet M, van Dijke CF, Wielopolski PA, ten Hagen TL, Veenland JF, Preda A, Loeve AJ, Eggermont AM, Krestin GP: MR angiography of tumor-related vasculature: from the clinic to the micro-environment *Radiographics*; 25 Suppl 1: S85-S97 (2005)
66. Walles T, Herden T, Haverich A, Mertsching H: Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival *Biomaterials*; 24: 1233-1239 (2003)
67. Wong C, Inman E, Spaethe R, Helgersson S: Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors *Thromb Haemost*; 89: 573-582 (2003)
68. Wood FM, Stoner ML, Fowler BV, Fear MW: The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra((R)) dermal regeneration template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: A one-step process *Burns* (2007)
69. Yannas IV, Burke JF: Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res*; 14: 65-81 (1980)
70. Zisch AH, Lutolf MP, Hubbell JA: Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors *Cardiovasc Pathol*; 12: 295-310 (2003)
71. Zisch AH, Schenk U, Schense JC, Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA: Covalently conjugated VEGF--fibrin matrices for endothelialization *J Control Release*; 72: 101-113 (2001)

ANHANG

ERGEBNISTABELLEN

In vitro Ergebnisse VEGF (ng/ml)		
	FK + WF	WF
Tag 1	101,82	62,18
	82,06	58,88
	107,76	78,06
Tag 2	40,76	26,47
	48,35	33,29
	57,00	35,00
Tag 3	16,76	15,71
	19,88	13,76
	33,35	12,47
Tag 4	9,47	0,95
	14,06	0,71
	9,71	1,48
Tag 5	8,59	0,32
	8,06	0,28
	10,35	0,71
Tag 6	5,53	0,14
	5,41	0,13
	8,94	0,26
Tag 7	6,35	0,08
	7,65	0,09
	0,59	0,20
Tag 8	6,94	0,10
	7,35	0,10
	8,41	0,12
Tag 9	1,19	0,09
	0,30	0,11
	0,69	0,12
Tag 10	0,63	0,09
	0,20	0,11
	0,41	0,12
Tag 11	0,17	0,09
	0,21	0,10
	0,69	0,09
Tag 12	0,30	0,09
	0,08	0,07
	0,24	0,13
Tag 13	0,05	0,07
	0,10	0,07
	0,26	0,11

Tab. Ia In vitro Ergebnisse von VEGF¹⁶⁵ für die Gruppen C und D (ng/ml)

In vitro Ergebnisse bFGF (ng/ml)		
	FK + WF	WF
Tag 1	11,32	1,16
	8,29	0,97
	5,97	0,74
Tag 2	0,74	0,29
	1,00	0,42
	1,19	0,29
Tag 3	0,32	0,06
	0,74	0,39
	0,35	0,19
Tag 4	0,34	0,17
	0,31	0,15
	0,29	0,17
Tag 5	0,15	0,08
	0,15	0,07
	0,16	0,07
Tag 6	0,10	0,05
	0,11	0,04
	0,11	0,03
Tag 7	0,09	0,01
	0,08	0,02
	0,08	0,02
Tag 8	0,06	0,02
	0,06	0,03
	0,05	0,02
Tag 9	0,04	0,02
	0,05	0,03
	0,05	0,02
Tag 10	0,03	0,02
	0,04	0,02
	0,03	0,02
Tag 11	0,03	0,01
	0,03	0,01
	0,03	0,02
Tag 12	0,03	0,02
	0,03	0,02
	0,03	0,02
Tag 13	0,02	0,01
	0,02	0,01
	0,02	0,02

Tab. Ib In vitro Ergebnisse von bFGF für die Gruppen C und D (ng/ml)

In vivo Werte 2 Wochen (Gebiet der Blutgefäße (%))			
PBS	FK	FK + WF	WF
19,68	22,18	42,08	63,56
22,10	31,92	56,88	86,55
16,66	20,89	61,01	85,40
13,46	22,03	59,51	80,81
18,83	18,44	60,73	89,52
14,42	21,58	53,88	89,68

Tab. IIa

In vivo Werte nach 2 Wochen in den Gruppen A,B,C und D
(Gebiet der neuen Blutgefäße in %)

In vivo Werte 4 Wochen (Gebiet der Blutgefäße (%))			
PBS	FK	FK + WF	WF
20,11	24,00	62,96	70,63
20,77	28,67	72,89	74,62
19,85	34,39	81,49	59,50
24,94	31,45	74,77	61,50
24,70	20,48	88,95	50,34
20,84	22,98	99,20	57,21

Tab. IIb

In vivo Werte nach 4 Wochen in den Gruppen A,B,C und D
(Gebiet der neuen Blutgefäße in %)

STATISTIK

T-Test

bFGF		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	FKWF1	8,5269	3	2,68525	1,55033
	WF1	,9570	3	,20988	,12118
Pair 2	FKWF2	,9785	3	,22657	,13081
	WF2	,3333	3	,07450	,04301
Pair 3	FKWF3	,4731	3	,23336	,13473
	WF3	,2151	3	,16236	,09374
Pair 4	FKWF4	,3143	3	,02356	,01360
	WF4	,1644	3	,01254	,00724
Pair 5	FKWF5	,1499	3	,00725	,00419
	WF5	,0706	3	,00641	,00370
Pair 6	FKWF6	,1068	3	,00223	,00129
	WF6	,0414	3	,00679	,00392
Pair 7	FKWF7	,0795	3	,00541	,00312
	WF7	,0199	3	,00764	,00441
Pair 8	FKWF8	,0564	3	,00483	,00279
	WF8	,0236	3	,00378	,00218
Pair 9	FKWF9	,0454	3	,00164	,00094
	WF9	,0226	3	,00347	,00200
Pair 10	FKWF10	,0349	3	,00169	,00097
	WF10	,0207	3	,00107	,00062
Pair 11	FKWF11	,0263	3	,00135	,00078
	WF11	,0149	3	,00215	,00124
Pair 12	FKWF12	,0255	3	,00041	,00024
	WF12	,0170	3	,00074	,00043
Pair 13	FKWF13	,0188	3	,00021	,00012
	WF13	,0135	3	,00238	,00137

Tab. III
Paired Samples Statistics bFGF in vitro

bFGF		N	Correlation	Sig.
Pair 1	FKWF1 & WF1	3	,993	,077
Pair 2	FKWF2 & WF2	3	,082	,948
Pair 3	FKWF3 & WF3	3	,943	,216
Pair 4	FKWF4 & WF4	3	,217	,861
Pair 5	FKWF5 & WF5	3	-,582	,605
Pair 6	FKWF6 & WF6	3	-,961	,179
Pair 7	FKWF7 & WF7	3	-,996	,055
Pair 8	FKWF8 & WF8	3	,796	,414
Pair 9	FKWF9 & WF9	3	-,483	,679
Pair 10	FKWF10 & WF10	3	-,741	,469
Pair 11	FKWF11 & WF11	3	-,730	,479
Pair 12	FKWF12 & WF12	3	-,971	,154
Pair 13	FKWF13 & WF13	3	-,434	,715

Tab. IV
Paired Samples Correlations bFGF in vitro

bFGF		Paired Differences					t			df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference						
					Upper	Lower					
Pair 1	FKWF1 - WF1	7,56989	2,47702	1,43011	1,41664	13,72315	5,293	2	,034		
Pair 2	FKWF2 - WF2	,64516	,23262	,13430	,06731	1,22301	4,804	2	,041		
Pair 3	FKWF3 - WF3	,25806	,09677	,05587	,01766	,49846	4,619	2	,044		
Pair 4	FKWF4 - WF4	,14988	,02417	,01396	,08984	,20992	10,740	2	,009		
Pair 5	FKWF5 - WF5	,07929	,01216	,00702	,04908	,10949	11,295	2	,008		
Pair 6	FKWF6 - WF6	,06536	,00895	,00517	,04312	,08759	12,648	2	,006		
Pair 7	FKWF7 - WF7	,05964	,01303	,00753	,02726	,09202	7,925	2	,016		
Pair 8	FKWF8 - WF8	,03286	,00292	,00169	,02560	,04012	19,468	2	,003		
Pair 9	FKWF9 - WF9	,02274	,00449	,00259	,01157	,03390	8,764	2	,013		
Pair 10	FKWF10 - WF10	,01417	,00258	,00149	,00775	,02058	9,497	2	,011		
Pair 11	FKWF11 - WF11	,01143	,00327	,00189	,00330	,01956	6,047	2	,026		
Pair 12	FKWF12 - WF12	,00845	,00115	,00066	,00560	,01130	12,752	2	,006		
Pair 13	FKWF13 - WF13	,00536	,00247	,00143	-,00079	,01150	3,750	2	,064		

Tab. V
Paired Samples Test bFGF in vitro

VEGF		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	FKWF1	97,2157	3	13,45817	7,77008
	WF1	66,3725	3	10,25376	5,92001
Pair 2	FKWF2	48,7059	3	8,12340	4,69005
	WF2	31,5882	3	4,51334	2,60578
Pair 3	FKWF3	23,3333	3	8,81614	5,09000
	WF3	13,9804	3	1,62840	,94015
Pair 4	FKWF4	11,0784	3	2,58378	1,49174
	WF4	1,0443	3	,39303	,22691
Pair 5	FKWF5	9,0000	3	1,20121	,69352
	WF5	,4404	3	,23688	,13676
Pair 6	FKWF6	6,6275	3	2,00461	1,15736
	WF6	,1753	3	,07083	,04089
Pair 7	FKWF7	4,8627	3	3,75796	2,16966
	WF7	,1253	3	,06727	,03884
Pair 8	FKWF8	7,5686	3	,75865	,43801
	WF8	,1067	3	,00958	,00553
Pair 9	FKWF9	,7273	3	,44705	,25810
	WF9	,1076	3	,01566	,00904
Pair 10	FKWF10	,4127	3	,21245	,12266
	WF10	,1098	3	,01334	,00770
Pair 11	FKWF11	,3547	3	,29000	,16743
	WF11	,0957	3	,00565	,00326
Pair 12	FKWF12	,2041	3	,11168	,06448
	WF12	,0984	3	,02871	,01658
Pair 13	FKWF13	,1369	3	,10784	,06226
	WF13	,0814	3	,02229	,01287

Tab. VI
Paired Samples Statistics VEGF in vitro

VEGF		N	Correlation	Sig.
Pair 1	FKWF1 & WF1	3	,788	,422
Pair 2	FKWF2 & WF2	3	,932	,236
Pair 3	FKWF3 & WF3	3	-,896	,293
Pair 4	FKWF4 & WF4	3	-,709	,498
Pair 5	FKWF5 & WF5	3	,991	,088
Pair 6	FKWF6 & WF6	3	1,000	,005
Pair 7	FKWF7 & WF7	3	-,980	,127
Pair 8	FKWF8 & WF8	3	,989	,097
Pair 9	FKWF9 & WF9	3	-,478	,683
Pair 10	FKWF10 & WF10	3	-,769	,441
Pair 11	FKWF11 & WF11	3	-,084	,947
Pair 12	FKWF12 & WF12	3	,613	,580
Pair 13	FKWF13 & WF13	3	,991	,087

Tab.VII
Paired Samples Correlations VEGF in vitro

VEGF		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Upper	Lower	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	FKWF1 - WF1	30,84314	8,29398	4,78853	10,23975	51,44652	6,441	2	,023
Pair 2	FKWF2 - WF2	17,11765	4,24549	2,45114	6,57125	27,66404	6,984	2	,020
Pair 3	FKWF3 - WF3	9,35294	10,30017	5,94680	-16,23409	34,93997	1,573	2	,256
Pair 4	FKWF4 - WF4	10,03412	2,87588	1,66039	2,89004	17,17820	6,043	2	,026
Pair 5	FKWF5 - WF5	8,55961	,96712	,55837	6,15715	10,96206	15,330	2	,004
Pair 6	FKWF6 - WF6	6,45216	1,93379	1,11647	1,64837	11,25595	5,779	2	,029
Pair 7	FKWF7 - WF7	4,73745	3,82392	2,20774	-4,76169	14,23659	2,146	2	,165
Pair 8	FKWF8 - WF8	7,46196	,74918	,43254	5,60090	9,32302	17,252	2	,003
Pair 9	FKWF9 - WF9	,61961	,45474	,26254	-,51003	1,74924	2,360	2	,142
Pair 10	FKWF10 - WF10	,30294	,22288	,12868	-,25072	,85660	2,354	2	,143
Pair 11	FKWF11 - WF11	,25902	,29053	,16774	-,46270	,98074	1,544	2	,263
Pair 12	FKWF12 - WF12	,10569	,09677	,05587	-,13471	,34608	1,892	2	,199
Pair 13	FKWF13 - WF13	,05549	,08581	,04954	-,15767	,26866	1,120	2	,379

Tab. VIII
Paired Samples Test VEGF in vitro

2 weeks		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	PBS	17,5250	6	3,29215	1,34401
	GF	82,5867	6	9,87097	4,02981
Pair 2	PBS	17,5250	6	3,29215	1,34401
	PBSFG	22,8400	6	4,65378	1,89990
Pair 3	PBSFG	22,8400	6	4,65378	1,89990
	FGGF	55,6817	6	7,18638	2,93383
Pair 4	PBSFG	22,8400	6	4,65378	1,89990
	GF	82,5867	6	9,87097	4,02981
Pair 5	FGGF	55,6817	6	7,18638	2,93383
	GF	82,5867	6	9,87097	4,02981

Tab. IX
Paired Samples Statistics 2 Wochen in vivo

2 weeks		N	Correlation	Sig.
Pair 1	PBS & GF	6	-,191	,717
Pair 2	PBS & PBSFG	6	,565	,243
Pair 3	PBSFG & FGGF	6	-,081	,878
Pair 4	PBSFG & GF	6	,022	,967
Pair 5	FGGF & GF	6	,829	,041

Tab. X
Paired Samples Correlations 2 Wochen in vivo

2 weeks		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Upper	Lower	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	PBS - GF	-65,06167	10,98624	4,48512	-76,59102	-53,53231	-14,506	5	,000
Pair 2	PBS - PBSFG	-5,31500	3,89724	1,59104	-9,40491	-1,22509	-3,341	5	,021
Pair 3	PBSFG - FGGF	-32,84167	8,87311	3,62243	-42,15342	-23,52991	-9,066	5	,000
Pair 4	PBSFG - GF	-59,74667	10,81999	4,41724	-71,10155	-48,39178	-13,526	5	,000
Pair 5	FGGF - GF	-26,90500	5,61233	2,29122	-32,79478	-21,01522	-11,743	5	,000

Tab. XI
Paired Samples Test 2 Wochen in vivo

4 weeks		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	PBS	21,8683	6	2,31874	,94662
	GF	62,3000	6	8,92862	3,64509
Pair 2	PBS	21,8683	6	2,31874	,94662
	PBSFG	26,9950	6	5,38283	2,19753
Pair 3	PBSFG	26,9950	6	5,38283	2,19753
	FGGF	80,0433	6	12,80014	5,22564
Pair 4	PBSFG	26,9950	6	5,38283	2,19753
	GF	62,3000	6	8,92862	3,64509
Pair 5	FGGF	80,0433	6	12,80014	5,22564
	GF	62,3000	6	8,92862	3,64509

Tab. XII
Paired Samples Statistics 4 Wochen in vivo

4 weeks		N	Correlation	Sig.
Pair 1	PBS & GF	6	-,518	,293
Pair 2	PBS & PBSFG	6	-,194	,712
Pair 3	PBSFG & FGGF	6	-,315	,543
Pair 4	PBSFG & GF	6	,290	,577
Pair 5	FGGF & GF	6	-,760	,079

Tab. XIII
Paired Samples Correlations 4 Wochen in vivo

4 weeks		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Upper	Lower	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	PBS - GF	-40,43167	10,32199	4,21394	-51,26393	-29,59940	-9,595	5	,000
Pair 2	PBS - PBSFG	-5,12667	6,26140	2,55621	-11,69760	1,44427	-2,006	5	,101
Pair 3	PBSFG - FGGF	-53,04833	15,37009	6,27481	-69,17825	-36,91842	-8,454	5	,000
Pair 4	PBSFG - GF	-35,30500	8,98808	3,66937	-44,73742	-25,87258	-9,622	5	,000
Pair 5	FGGF - GF	17,74333	20,42749	8,33949	-3,69400	39,18067	2,128	5	,087

Tab. XIV
Paired Samples Test 4 Wochen in vivo

DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. med. H.-G. Machens**, Leitender Oberarzt der Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Intensivstation für Schwerbrandverletzte des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Lübeck) für die Überlassung des Themas und die Unterstützung und Betreuung der Dissertationsarbeit.

Herrn **Univ.-Prof. Dr. med. P. Mailänder**, Leiter der Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Intensivstation für Schwerbrandverletzte des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Lübeck) danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung promovieren zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Dr. med. J.A. Lohmeyer** aus der Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Intensivstation für Schwerbrandverletzte des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Lübeck) für die operative Einarbeitung sowie die persönliche Betreuung in der Erstellung meiner Dissertationsschrift.

Mein großer Dank gilt auch **Herrn T.J. Egana**, wissenschaftlicher Mitarbeiter der klinischen Forschung der Plastischen Chirurgie des Campus Lübeck für die hervorragende Einarbeitung, die fortlaufende Unterstützung bei den Laborarbeiten und dem Thema der Dissertationsarbeit.

Frau **Dr. med. S. Liu**, wissenschaftliche Mitarbeiterin der Plastischen Chirurgie des Campus Lübeck für die Unterstützung in der Versuchstierbetreuung.

Herrn **Dr. -Ing. A. Condurache**, Mitarbeiter des Instituts für Signalverarbeitung und Prozessrechentechnik des Campus Lübeck für die Entwicklung und Bereitstellung des Computerprogrammes „VesSeg“.

Herrn **PD Dr. med. S. Krüger** vom Institut für Pathologie des Campus Lübeck für die die Fertigstellung der histologischen Färbungen.

Herrn **Dr. med. vet. R. Noel** und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung in der Versuchstierhaltung.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für die liebevolle Unterstützung, mit der sie mich während meines Studiums begleitet hat.

LEBENS LAUF

INSA WILCKE

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtstag, -ort: 15.08.1981 in Leer
Eltern: Dr. med. Alexander Wilcke, Facharzt für Allgemeinmedizin
Hannelore Wilcke, Realschullehrerin
Geschwister: Janna Wilcke
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

1988 - 2001 Schulausbildung in Leer
06 - 2001 Abitur am Ubbo-Emmius-Gymnasium in Leer
07 - 09/2001 Sprachkurs in den Niederlanden
09 - 12/2001 Praktikum im Kreiskrankenhaus Leer im Rahmen des
Medizinstudiums
01 - 06/2002 Vorbereitungskurse für das Medizinstudium in den
Niederlanden

STUDIUM

09/2002 - 08/2008 Medizinstudium an der Rijksuniversiteit Groningen,
Niederlande

08/2006 - 07/2008 Praktischer Studienabschnitt

08 - 12/2006 Innere Medizin/ Kardiologie/ Pulmonologie/
Gastroenterologie (Martini Ziekenhuis Groningen)

12/2006 - 03/2007 Neurologie/ Psychiatrie/ Dermatologie
(Martini Ziekenhuis Groningen)

04 - 08/2007 Chirurgie/ Plastische Chirurgie/ Orthopädie/ HNO
(Martini Ziekenhuis Groningen)

09-12/2007 Urologie/ Pädiatrie/ Gynäkologie
(Klinikum Oldenburg, Oldenburg (Niedersachsen))

12/2007-04/2008 Allgemeinmedizin/ Notfallmedizin/ Soziale Medizin/
Geriatric/ Augenheilkunde
(Martini Ziekenhuis Groningen)

04-07/2008 Dermatologie
(Klinik und Poliklinik für Dermatologie und
Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität
München)

08/2008 Approbation als Ärztin

PREISE, STIPENDIEN

- 01 - 08/2006 EU Forschungsaufenthalt an der Universität zu Lübeck (Plastische Chirurgie) mit dem Erasmus-Programm (experimentelle Untersuchungen für die Dissertation)
- 11/2006 Förderpreis der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der peripheren Nerven und Gefäße (DAM) in Höhe von 1000 €
- 04-07/2008 Marco-Polo-Stipendium für das Wahl-PJ in der Dermatologie an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

FREMDSPRACHEN

Englisch, Niederländisch, Französisch

ORIGINALARBEITEN

- 1) Wilcke I, Lohmeyer JA, Liu S, Condurache A, Krüger S, Mailänder P, Machens HG; „VEGF¹⁶⁵ and bFGF protein-based therapy in a slow release system to improve angiogenesis in a bioartificial dermal substitute in vitro and in vivo” Langenbecks Arch Surg (2007) 392:305–314

VORTRÄGE

- 1) Wilcke I, Egana T, Lohmeyer JA, Liu S, Thome D, Mailänder P, Machens HG; „VEGF¹⁶⁵ and bFGF protein based therapy in a slow release system to improve angiogenesis in a bioartificial dermal substitute in vitro and in vivo”. European conference of scientists and Plastic Surgeons (ECSAPS) 21-23.09.2006, London
Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery (2007) 60(4): S12
- 2) Liu S, Egana T, Wilcke I, Lohmeyer J, Thome D, Bodo E, Lu Z, Krüger S, Mailänder P, Machens HG; „Restructuring skin equivalents with human hair follicle ORCS and fibroblasts”. European conference of scientists and Plastic Surgeons (ECSAPS) 21-23.09.2006, London
Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery (2007) 60(4): S12-S13
- 3) Liu S, Egana T, Wilcke I, Lohmeyer J, Thome D, Bodo E, Lu Z, Krüger S, Machens HG; „Restructuring skin equivalents with human hair follicle ORSC and fibroblasts”. 1st Congress of the German Society for Stem Cell Research 03-04.11.2006, Cologne
- 4) Wilcke I, Egana T, Lohmeyer JA, Liu S, Thome D, Condurache A, Mailänder P, Machens HG; „Steuerung der gezielten Freisetzung von bFGF/VEGF¹⁶⁵ in einer kollagenen Matrix durch Konstruktion eines „Slow release” Systems in vitro”. 28. Jahrestagung der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der peripheren Nerven und Gefäße (DAM), 16.–18.11.2006, Lübeck-Travemünde, Förderpreis der DAM (1000 €)
- 5) Wilcke I, Egana T, Lohmeyer JA, Liu S, Thome D, Condurache A, Mailänder P, Machens HG; „Die Steuerung der gezielten Freisetzung von VEGF¹⁶⁵ und bFGF in einer kollagenen Matrix durch Konstruktion eines „Slow release” Systems in vitro und in vivo. 124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH) 01.-04.05.2007; München
- 6) Liu S, Bucszy B, Egana T, Wilcke I, Lohmeyer J, Bodo E, Krüger S, Lu Z, Machens HG;

„Restructuring skin equivalents with human outer root sheath cells and fibroblasts“. 124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH) 01.-04.05.2007; München

POSTER

- 1) Wilcke I, Egana T, Lohmeyer JA, Liu S, Thome D, Mailänder P, Machens HG; „Steuerung der gezielten Freisetzung von bFGF/VEGF¹⁶⁵ in einer kollagenen Matrix durch Konstruktion eines „Slow release“ Systems in vitro“. DGPRÄC 29.09–02.10.2006; Aachen; Plast. Chir. 6 (Suppl. 1):77–78

Lübeck, Oktober 2008

ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die der Universität zu Lübeck zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Steuerung der gezielten Freisetzung von VEGF¹⁶⁵ und bFGF in einer kollagenen Matrix durch Konstruktion eines „Slow release“ Systems in vitro und in vivo“

in der Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Intensivereinheit für Schwerbrandverletzte

unter der Betreuung von Prof. Dr. H.G. Machens und Dr. J.A. Lohmeyer

ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe nicht vorher oder gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder die Dissertation vorgelegt. Ich habe mich keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen.

Die Tierversuche, die in dieser Dissertation durchgeführt wurden, wurden am 28.03.2006 beim Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft in Kiel beantragt und am 04.05.2006 genehmigt (Aktenzeichen: 27/n/06).

Ich widerspreche der Zulassung von Zuhörerinnen oder Zuhörern bei der mündlichen Prüfung nicht.

Lübeck, den 22.10.2008