

Immunregulation der Wundheilung

M. Schäffer, H.-D. Becker

Abteilung für Allgemeine Chirurgie und Poliklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. med. Horst-Dieter Becker)

EINLEITUNG

Wundheilungsstörungen nach chirurgischen Eingriffen und chronische, nicht heilende Wunden treten gehäuft bei immunkompromittierten Patienten mit Tumorleiden, Sepsis oder Diabetes mellitus sowie nach einem Polytrauma oder einer Organtransplantation auf. An speziellen Lokalisationen, wie beispielsweise an der unteren Extremität, bilden zudem lokale Faktoren, wie arterielle und venöse Zirkulationsstörungen, die Grundlage chronischer Wunden. Die komplexen und zum Teil sehr unterschiedlichen Regulationsmechanismen bei den dabei auftretenden Wundheilungsstörungen sind nur unzureichend bekannt, die Therapiekonzepte daher empirisch und unspezifisch.

Das Immunsystem besitzt bei der Wundheilung eine zentrale Bedeutung. Immunkompetente Zellen interagieren mit den mesenchymalen Zellen des neuen Granulationsgewebes und steuern so ein komplexes Netzwerk aus Zellen, Extrazellulärmatrix und zellulären Mediatoren (Abb. 1). Die geordnete zeitliche und räumliche Abfolge der verschiedenen Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse der beteiligten Zellsysteme führt zu einer normalen Heilung. Exo- und endogene Einflüsse können zu einem Ungleichgewicht der regulierenden Faktoren und nachfolgend zu einer Störung der Heilung führen. Hieraus abgeleitete Therapiekonzepte bestimmen die jüngsten Ansätze zur Behandlung von Wundheilungsstörungen.

PHASEN DER NORMALEN WUNDHEILUNG

Aus didaktischen Gründen kann die Wundheilung in drei sich überlappende Phasen eingeteilt werden:

- ▶ Entzündung,
- ▶ Proliferation und
- ▶ Modulation.

Entzündungsphase

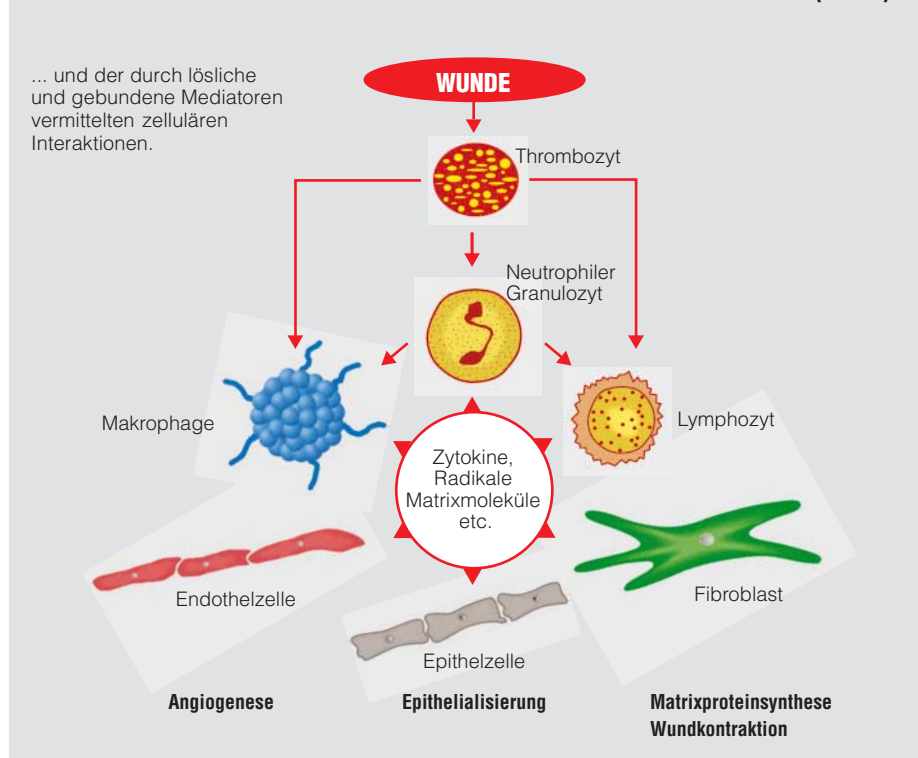
Die Aktivierung der Gerinnungs- und Komplementkaskade sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen aus Thrombozyten stehen am Anfang der Entzündungsphase. Wachstumsfaktoren, vor allem Epidermal Growth Factor (EGF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) und Transforming Growth Factor- β (TGF- β), wirken chemotaktisch auf nachfolgend einwandernde Zellen der Wundheilung.

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen, die aktiv in die Wunde einwandern. Das Zusammenwirken von P-Selektin, E-Selektin und anderen Adhäsionsmolekülen – ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1), ELAM-1 (Endothel-Leukozytenadhäsionsmolekül-1) – auf der Endothelzelloberfläche mit verschiedenen Oberflächenglykoproteinen und Integrinrezeptoren auf der Granulozytenoberfläche – LFA-1 (Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen-1), Mac-1 – führt zur Endothelzelladhäsion und Extravasation der Granulozyten.

Unterstützt durch die von Entzündungsmediatoren vermittelte Vasodilatation mit konsekutiver Strömungsverlangsamung und erhöhter Kapillarpermeabilität kommt es nun entlang der Konzentrationsgradienten chemotaktischer Substanzen zur Granulozytenmigration in die Wunde. Nach 48 Stunden erreicht die Konzentration der Granulozyten in dermalen Wunden ihre höchste Konzentration (Abb. 2). Ihre Aufgabe besteht in der unspezifischen Immunabwehr gegen Bakterien und im Wunddébridement. In sterilen Wunden mit geringem Gewebedefekt scheinen Granulozyten jedoch keine wesentliche Bedeutung für die Heilung zu besitzen.

Wundmakrophagen, die sich vornehmlich aus im Blut zirkulierenden Monozyten differenzieren, erscheinen ab dem 2. Tag in der Wunde und stellen die größte Zellfraktion zwischen dem 3. und 5. Tag der Heilung. Bereits Untersuchungen Anfang der 70er Jahre

SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER WUNDHEILUNGSKASKADE (ABB. 1)



haben die zentrale Bedeutung der Makrophagen für die normale Wundheilung gezeigt. Während Makrophagen in der Frühphase polymorphkernige Granulozyten als Wundphagozyten ablösen, kommt ihnen im weiteren Verlauf durch die Freisetzung löslicher Mediatoren eine wichtige Bedeutung bei der Bildung des Granulationsgewebes zu.

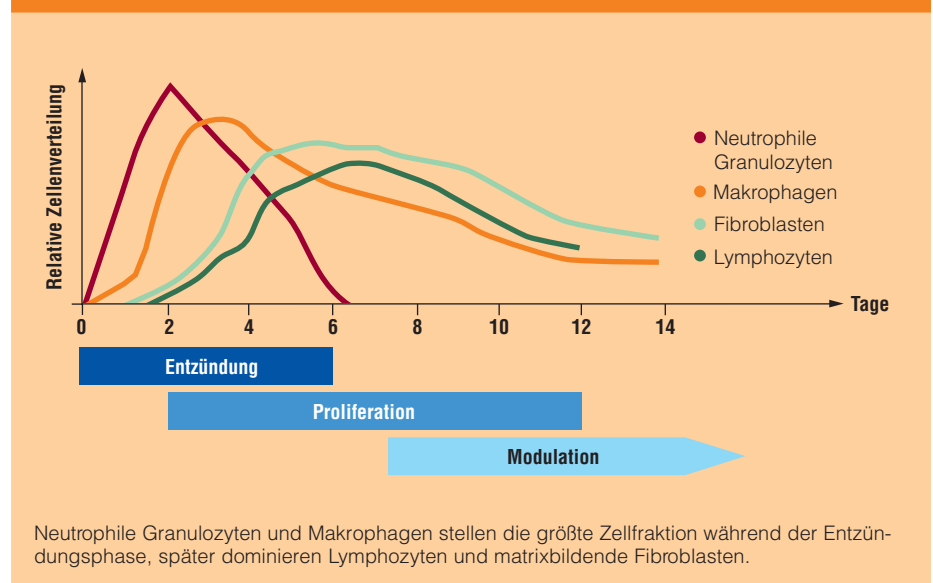
Lymphozyten erscheinen in Wunden in signifikanten Zahlen um den 5. Tag und erreichen am 7. Tag der Heilung ihre größte Konzentration. Während der späten Entzündungs- und frühen Proliferationsphase modulieren verschiedene Subtypen von T-Lymphozyten die Bildung der Extrazellulärmatrix. Im Gegensatz zu Granulozyten sind Makrophagen und Lymphozyten unentbehrlich für eine normale Heilung.

Proliferationsphase

Die Infiltration der Wunde mit Entzündungszellen überschneidet sich mit der Proliferationsphase der Heilung, die durch die Bildung des Granulationsgewebes gekennzeichnet ist. Granulationsgewebe besteht aus einem losen Netzwerk Extrazellulärmatrix bildender Fibroblasten, Entzündungszellen und Endothelzellen. Fibroblasten, die in höchster Konzentration um den 7. Tag in der Wunde anzutreffen sind, werden aus dem angrenzenden Bindegewebe durch Wachstumsfaktoren zur Chemotaxis, Proliferation und synthetischen Aktivität stimuliert. Neben den Wachstumsfaktoren spielen auch andere Faktoren, wie das Adhäsionsmolekül ICAM-1 oder Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Fibroblasten.

Mit der Abnahme von Entzündungszellen in der Wunde werden Wachstumsmediatoren zunehmend von anderen Zellen synthetisiert, wie Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten. Fibroblasten synthetisieren IGF-1, basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), TGF- β , PDGF, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Keratinocyte Growth Factor (KGF). Endothelzellen produzieren TGF- β , bFGF, PDGF, VEGF und Keratinozyten synthetisieren VEGF, EGF, TGF- β und TGF- α . Die Bildung neuer Gefäße durch einwandernde Endothelzellen steht unter dem Einfluß lokaler Faktoren wie Hypoxie und Laktat und wird durch ein komplexes Zusammenspiel Angiogenese

SEQUENZ DER WUNDZELLEN IM VERLAUF DER HEILUNG (ABB. 2)



stimulierender (z. B. VEGF oder FGF) und hemmender (z. B. Angiostatin) Faktoren reguliert.

Wundmodulation

Die Phase der Wundmodulation, die bis zu einem Jahr dauert, beginnt um den 7. Tag und umfasst die Strukturierung der Extrazellulärmatrix. Anfängliches Fibrin, später auch das von aktivierten Makrophagen gebildete Fibronectin und Thrombospondin-1 sowie andere (Glyco-) Proteine (z. B. SPARC – secreted protein acidic and rich in cysteine) werden nach und nach durch Kollagen ersetzt. Während zunächst Typ-III-Kollagen in der Wunde dominiert, besteht die reife Wunde, ebenso wie die normale Haut, zu 90% aus Typ-I-Kollagen. Die Verdickung, Ausrichtung entlang der Belastungsrichtung und Quervernetzung der Kollagenbündel korrelieren mit der zunehmenden Festigkeit der Wunde, die maximal 80% der normalen Haut beträgt. Bestandteile der Extrazellulärmatrix bilden jedoch nicht nur ein passives Gerüst für einwachsende Zellen, sondern modulieren selbst nachfolgende Schritte der Heilung. So führt die Hemmung der Thrombospondin-1-Synthese in Wunden durch die lokale Applikation von Antisense-Thrombospondin-1 Oligomeren zu einer verzögerten Heilung. Dies unterstreicht die wichtige Bedeutung der Wechselwirkungen zwischen Extrazellulärmatrix und Wundzellen bei der Heilung. Zell-Matrix-Interaktionen werden zum Teil durch die Expression

transmembranöser Zellrezeptoren, sogenannter Integrine, reguliert, die ihrerseits wieder unter dem Einfluss von Zytokinen stehen.

MAKROPHAGEN

Makrophagen werden von Chemokinen und anderen Lockstoffen, die von mesenchymalen Zellen, Lymphozyten und bereits aktivierten Makrophagen synthetisiert werden, angelockt. Zu den verschiedenen Lockstoffen gehören das Macrophage Inflammatory Protein -1 und -2 (MIP-1, MIP-2), Macrophage Chemoattractant and Activating Factor (MCAF) oder auch das Zytokin Gro. Ähnlich wie bei der Rekrutierung von Granulozyten und Lymphozyten scheint auch die Aktivierung des Endotheliums mit konsekutiver Expression von Selektinen und anderen Adhäsionsmolekülen bei der anhaltenden Einwanderung von Makrophagen in die Wunde eine wichtige Rolle zu spielen. So zeigen genetisch veränderte Mäuse, denen die von aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten gebildeten Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin fehlen, eine verzögerte Wundheilung und eine verminderte Einwanderung von Makrophagen und Granulozyten in die Wunde.

Die Aktivierung der Makrophagen in der Wunde führt zu einer erhöhten Sekretion von Zytokinen (Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α), Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF, VEGF, bFGF) und anderen Entzündungsmediatoren, wie z. B.

Stickstoffmonoxid, sowie zu einer verstärkten Phagozytoseaktivität. Je nach aktivierendem Agens kommt es zu einem unterschiedlichen phänotypischen Profil der stimulierten Zelle. Initial werden Makrophagen durch thrombozytäre Wachstumsfaktoren, wie z. B. TGF- β oder Platelet-Activating-Factor (PAF), und/oder Erreger in der Wunde aktiviert. Erreger können dabei eine Zytokininduktion über die gleichen Rezeptoren induzieren, die auch der Erregeraufnahme dienen. Im weiteren Verlauf der Heilung werden Makrophagen durch Zytokine bereits stimulierter Makrophagen und durch Bestandteile der Extrazellulärmatrix wie z. B. das Fibronectin aktiviert.

Aktiviert Makrophagen besitzen eine Schlüsselstelle bei der initialen Infektabwehr, dem Débridement avitaler Gewebsanteile sowie der durch lösliche Mediatoren vermittelten Stimulation der Matrixsynthese und Angiogenese. Die Synthese des Angiogenesefaktors VEGF durch Makrophagen scheint im Verlauf der Heilung vor allem durch die Laktatanreicherung in Wunden und weniger durch die lokale Hypoxie stimuliert zu sein. Dies erklärt auch den scheinbaren Widerspruch, dass die Angiogenese zwar durch Hypoxie initiiert wird, eine gute Angiogenese aber von einer ausreichenden Oxygenierung abhängig ist. Die Hypoxie selbst ist nur zum Teil für die Laktatanreicherung in Wunden verantwortlich. Wundmakrophagen und Fibroblasten produzieren selbst unter ausreichender Sauerstoffversorgung über den Weg der aeroben Glykolyse größere Mengen Laktat und bedingen so anhaltend hohe (5 bis 15 mM) Laktatspiegel in Wunden.

In vivo ist die zentrale Bedeutung der Makrophagen bei der Wundheilung in verschiedenen Experimenten belegt worden. So führt die Stimulation der Makrophagenfunktion durch systemisch verabreichtes Glucan zu einer erhöhten mechanischen Festigkeit und einem vermehrten Kollagengehalt von Wunden. Auch die Injektion von Makrophagen in experimentelle Wunden verbessert die Heilung. Durch eine systemische Behandlung mit einem monoklonalen Anti-Makrophagenantikörper und eine lokale Applikation von Antimakrophagenserum kommt es entsprechend zu einer Hemmung der dermalen Heilung.

LYMPHOZYTEN

Nach einer Verletzung üben Lymphozyten eine Kardinalfunktion bei der Regulation lokaler und systemischer Immunreaktionen aus. In dermalen Wunden erscheinen T-Lymphozyten später als andere Entzündungszellen und erreichen um den 7. Tag ihre größte Konzentration. B-Lymphozyten scheinen keine wesentlichen Funktionen bei der Wundheilung zu übernehmen.

Die Migration in die Wunde, Aktivierung und Effektorfunktion von Lymphozyten ist abhängig von Zelladhäsionsmolekülen. So ermöglicht die Interaktion von dem auf allen Lymphozyten exprimierten Integrin LFA-1 mit Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, z. B. ICAM-1 und ICAM-2, die Migration von Lymphozyten durch Gefäßwände. Adhäsionsmoleküle stehen ihrerseits wieder unter dem Einfluß von in Lymphozyten synthetisierten Zytokinen, wie IL-1, Interferon (IFN)- γ oder TNF- α , so dass positive Rückkopplungsmechanismen aktivierter Lymphozyten möglich sind.

Direkte Hinweise auf die Bedeutung der T-Lymphozyten bei der Wundheilung sind durch in vivo Studien an Mäusen gewonnen worden, in denen durch eine Antikörper induzierte, etwa 75%ige Depletion der Gesamt-T-Zellpopulation in Wunden eine Hemmung der Heilung hervorgerufen wurde. Eine selektive Hemmung der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen führt zu einer verbesserten Heilung und spricht damit für einen negativen Effekt der CD8⁺ Zellen auf die Wundheilung. Die Hemmung der CD4⁺-T-Zellen zeigt keine Wirkung auf die Heilung, was auf eine bislang nicht näher charakterisierte T-Zellsubpopulation deutet, die eine stimulierende Wirkung auf die Wundheilung besitzt.

Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen an athymischen Nacktmäusen, die ein verändertes T-Zellsystem aufweisen. Durch T-Zellrekonstitution mit Milzlymphozyten kann die vermehrte Kollagenbildung und mechanische Wundfestigkeit dieser Tieren wieder rückgängig gemacht werden. Auch dies spricht für das Vorhandensein der oben beschriebenen, auf die Wundheilung hemmend wirkende (CD8⁺)-T-Zellsubpopulation.

Weitere Hinweise auf die Bedeutung von T-Lymphozyten auf die Wundheilung wurden in Studien mit lymphotropen und lympholytischen Substanzen

gewonnen. Substanzen und Wirkstoffe, die nach in vivo Verabreichung zu einer Stimulation von Lymphozyten führen, wie rekombinantes, humanes Wachstumshormon, Vitamin A oder Arginin erhöhen die mechanische Festigkeit und den Kollagengehalt experimenteller Wunden. Im Gegensatz hierzu führen Steroide mit einem lympholytischen Effekt zu einer Hemmung der Heilung.

Eine Thymektomie bei Tieren führt zu einer fehlenden Reifung von CD8⁺-T-Zellen und zu einer verbesserten Wundheilung. Dieser Effekt kann durch eine Thymusimplantation rückgängig gemacht werden. Die Behandlung mit Thymushormonen hemmt die Wundheilung und unterstreicht den hemmenden Einfluss des Thymus auf die Wundheilung.

Klinisch findet man in chronischen, nicht heilenden venösen Ulcera ein im Vergleich zu heilenden Wunden verringertes Verhältnis an CD4/CD8 positiven Zellen. Dies untermauert die Bedeutung eines normalen Gleichgewichts hemmender und stimulierender T-Zellsubpopulationen bei der normalen Heilung.

ZYTOKINE UND WACHSTUMSFAKTOREN

Der Einfluss von immunkompetenten Zellen auf die Wundheilung ist zum Teil durch die Wirkung ihrer löslichen Mediatoren bestimmt. Die Terminologie dieser Mediatoren ist, zum Teil historisch bedingt, verwirrend. So besteht entgegen ursprünglicher Annahmen keine klare Trennung dieser heterogenen Gruppe von Proteinen und Polypeptiden in „entzündliche“ Zytokine und „wachstumsmodulierende“ Wachstumsfaktoren bzw. eine Zuordnung in Monokine (von aktivierten Makrophagen produziert) oder Lymphokine (von aktivierten Lymphozyten produziert). Es handelt sich vielmehr um eine Gruppe löslicher Mediatoren, die je nach Konzentration, Zielzelle und simultaner Aktivität weiterer Mediatoren unterschiedliche Wirkungen hervorrufen. Dabei können gleiche Botenstoffe von verschiedenen Zelltypen synthetisiert werden (Tab. 1).

In-vitro-Untersuchungen haben stimulierende und hemmende Mediatoren praktisch aller Zellfunktionen matrixbildender Fibroblasten gezeigt. Lässt sich die Wirkung einzelner Mediatoren im definierten Milieu der Zellkultur genau beschreiben, so bleibt

ZYTOKINE UND WACHSTUMSFAKTOREN IN DER WUNDHEILUNG (TAB. 1)

Zytokin	Quelle	Wirkung
Interleukin-1 (IL-1)	Neutrophile Makrophagen Lymphozyten Fibroblasten Endothelzellen Keratinocyten	stimuliert Leukozytenchemotaxis stimuliert Makrophagenaktivität stimuliert Fibroblastenproliferation stimuliert Endothelzelladhäsionsmolekülexpression stimuliert Keratinocytenmigration
Interleukin-2 (IL-2)	Lymphozyten	stimuliert T-Zellwachstum und T-Helferzellaktivität
Interleukin-4 (IL-4)	Lymphozyten	stimuliert Neutrophile stimuliert T-Zellproliferation stimuliert und hemmt Makrophagenaktivität stimuliert Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese stimuliert Endothelzell-Leukozytenadhäsion
Interleukin-6 (IL-6)	Neutrophile Makrophagen Lymphozyten Fibroblasten Endothelzellen Keratinocyten	stimuliert T-Lymphozyten hemmt Fibroblastenproliferation
Interleukin-8 (IL-8)	Makrophagen Lymphozyten Fibroblasten Endothelzellen Keratinocyten	stimuliert Neutrophile stimuliert Makrophagenmigration hemmt Endothelzell-Leukozytenadhäsion
Interleukin-10 (IL-10)	Makrophagen Lymphozyten Keratinocyten	hemmt Zytokinfreisetzung von Typ 1 T- Lymphozyten und Makrophagen
Interferon-g (IFN- γ)	Lymphozyten	stimuliert Makrophagenaktivität stimuliert und hemmt Fibroblastenproliferation hemmt Kollagenproduktion und -Crosslinking hemmt Endothelzellproliferation stimuliert Lymphozytenadhäsion an Endothelzellen
Tumor necrosis factor-a (TNF- α)	Neutrophile Makrophagen Lymphozyten	stimuliert Neutrophile und Makrophagen hemmt Endothelzellproliferation stimuliert Fibroblastenproliferation hemmt Kollagensynthese
Tumor necrosis factor b (TNF- β)	Neutrophile Makrophagen Lymphozyten	stimuliert Fibroblastenproliferation stimuliert Kollagensynthese
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Thrombozyten Makrophagen Fibroblasten Endothelzellen	stimuliert Neutrophilen-, Makrophagen- und Fibroblastenchemotaxis stimuliert Fibroblastenproliferation stimuliert Kollagensynthese
Transforming growth factor β (TGF- β)	Thrombozyten Makrophagen Lymphozyten Fibroblasten Endothelzellen Keratinocyten	hemmt T-Zell- und Makrophagenaktivierung aktiviert Neutrophile Granulozyten stimuliert Fibroblastenmigration stimuliert Kollagensynthese hemmt Endothelzellproliferation
Transforming growth factor α (TGF- α)	Thrombozyten Makrophagen Keratinocyten	stimuliert Kollagensynthese stimuliert Endothelzellproliferation
Epidermal growth factor (EGF)	Makrophagen Keratinocyten	stimuliert Fibroblasten-, Endothelzell- und Epithelzellproliferation
Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)	Fibroblasten	stimuliert Fibroblastenproliferation stimuliert Kollagensynthese
basic Fibroblast growth factor (bFGF)	Makrophagen Lymphozyten Fibroblasten Endothelzellen	stimuliert Fibroblastenproliferation stimuliert Kollagensynthese stimuliert Endothelzell- und Epithelzellproliferation
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Makrophagen Fibroblasten Endothelzellen Keratinocyten	stimuliert Endothelzellproliferation und Kollagenaseproduktion

ihre Wirkung in vivo häufig unklar. Unterschiedliche Untersuchungsbedingungen und die Komplexität der Reparaturvorgänge lassen jedoch viele Fragen hinsichtlich ihrer genauen Bedeutung in vivo offen.

Klinische Studien

Klinische Studien zur Bedeutung und therapeutischen Anwendung von Wachstumsfaktoren wurden in erster Linie an chronischen, nicht heilenden Wunden durchgeführt. Pathophysiologisch liegt dem Therapiekonzept der lokalen Wachstumsfaktorapplikation ein relativer Mangel an Wachstumsfaktoren, z. B. PDGF, ihre Inaktivierung durch Proteasen oder Einlagerung in Fibrinmanschetten in der Wunde zugrunde. So konnten Cooper et al. zeigen, dass die Konzentrationen von PDGF, bFGF, EGF und TGF- β in chronischen Wunden im Vergleich zu akuten Wunden vermindert sind. Der Nachweis einer entsprechenden PDGF-Rezeptorexpression und eine Verbesserung der Heilung durch die lokale Gabe von verschiedenen Wachstumsfaktoren (PDGF, bFGF, TGF- β -1) in Modellen der gestörten Heilung untermauern das therapeutische Konzept der Mediatorsubstitution. Ungelöst sind nach wie vor Fragen der optimalen Wachstumsfaktorkonzentrationen, Dosierungsintervalle und verwendeten Vehikel. So benützten Puolakkainen et al. vier verschiedene Trägersubstanzen bei der Applikation von TGF- β -1 und zeigten je nach Vehikel eine signifikant unterschiedliche Freisetzung und biologische Wirksamkeit von TGF- β -1.

Seit 1986, als erstmalig von einem positiven Effekt lokal applizierter, autologer thrombozytärer Wachstumsfaktoren auf die Heilung chronischer Wunden beim Menschen berichtet wurde, sind eine Vielzahl klinischer Studien mit rekombinanten und autologen, thrombozytären Faktoren durchgeführt worden. Während einige Autoren von einer signifikanten Verbesserung der Heilung, z. B. mit PDGF bei Dekubitalulcera bzw. EGF bei Spalthautentnahmestellen, berichten, konnten andere keinen eindeutigen Effekt nachweisen (bFGF bei neuropathischen, diabetischen Fußulcera und IL-1 β bei Dekubitalulcera).

Multizenterstudien reevaluieren gegenwärtig die therapeutischen Möglichkeiten der Anwendung verschiede-

ner Wachstumsfaktoren, wie z. B. PDGF-BB oder TGF- β -3, zur Lokalbehandlung bei chronischen, nicht heilenden Wunden. Die häufig widersprüchlichen Ergebnisse der unterschiedlichen Studien sind zum Teil auf eine bislang nur geringe Berücksichtigung der unterschiedlichen pathophysiologischen Ursachen nicht heilender Wunden, der heterogenen Patientenspopulationen und der pharmakologischen Problemstellungen zurückzuführen. Eine Beurteilung der Wertigkeit der einzelnen Faktoren ist anhand der vorliegenden Studien nur schwer möglich. In den verschiedenen Studien finden sich unterschiedliche Patientenkollektive, Dosierungen und galenische Zubereitungen der verschiedenen Wachstumsfaktoren. Zudem weisen die unterschiedlichen Faktoren verschiedene Eigenschaften bei der Stimulation des Granulationsgewebes bzw. der Epithelialisierung auf. Während EGF entsprechend seines Wirkungsprofils eher bei Wunden, die primär durch Epithelialisierung heilen (z. B. venöse Ulcera, Spalthautentnahmestellen), seine potentielle Anwendung findet, werden bFGF, TGF- β oder PDGF primär an Wunden untersucht, die vornehmlich durch Granulationsgewebebildung (z. B. tiefe Dekubital- und diabetische Fußulcera) heilen.

Trotz noch bestehender offener Fragen, z. B. hinsichtlich Dosierung, Dosierungsintervall und galenischer Zubereitung ist PDGF-BB als erster und bislang einziger Wachstumsfaktor in den USA seit Ende 1997 für die topische Behandlung neuropathischer, diabetischer Fußulcera zugelassen. Bei einer bislang fehlenden Standardisierung der lokalen Behandlung dieser Ulcera kann aufgrund der gegenwärtigen Datenlage jedoch nur innerhalb kontrollierter klinischer Studien die Anwendung von PDGF-BB und anderer lokal applizierter Wachstumsfaktoren empfohlen werden.

MATRIXMETALLOPROTEINASEN

Die normale Wundheilung erfordert ein Gleichgewicht synthetisierender und abbauender Mechanismen. Matrix abbauende Enzyme sind Proteasen, unter denen die Matrixmetalloproteinasen (MMP) die wichtigste Bedeutung bei der Wundheilung haben. Zur Familie der Matrixmetalloproteinasen gehören Kollagenasen, Gelatinasen, Stro-

melysine und Membran-Typ MMPs. Sie sind notwendig beim initialen Wunddebridement und während des kontinuierlichen Matrixumsatzes während der Proliferations- und Modulationsphase der Heilung. Kontrollierte Fragmentation von Basalmembranen und Extrazellulärmatrixkomponenten entfernt Matrixbarrieren gegenüber der Zellmigration und ermöglicht so elementare Vorgänge der Entzündungsreaktion, Angiogenese und Epithelialisierung. Die Regulation geschieht auf der Ebene der Transkription und posttranslational. Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie EGF, PDGF, TGF- β , IL-1 und TNF- α , können die Synthese und Freisetzung einzelner oder mehrerer dieser Proteinasen modulieren. Neben der proteolytischen Aktivierung der sezernierten Proteasenproenzyme unterliegen Metalloproteinasen zudem der Regulation durch spezifische Gewebsinhibitoren (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, TIMP). Matrixmetalloproteinasen weisen eine Substratspezifität auf. So degradieren MMP-1 (interstitielle Kollagenase oder Kollagenase-1), MMP-8 (neutrophile Kollagenase oder Kollagenase-2) und MMP-13 (Kollagenase-3) vor allem fibrilläres Kollagen Typ I, II und III, wohingegen z. B. MMP-2 (Gelatinase A) vor allem auf Kollagen Typ IV wirkt.

MMP-Expression kann zu verschiedenen Zeitpunkten der Wundheilung in Entzündungszellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten nachgewiesen werden. In akuten und chronischen Wunden können MMP-2 und MMP-9 (Gelatinase B) schon innerhalb der ersten 48 Stunden nachgewiesen werden, während MMP-13 nur in chronischen Wunden und in akuten Wunden jenseits des 7. Tages gefunden wird. Trotz einzelner widersprüchlicher Untersuchungsergebnisse scheinen experimentell wie klinisch eine Verzögerung oder Hemmung der Heilung mit einer erhöhten und verlängerten MMP-Expression zu korrelieren. Entsprechend konnte in chronischen Wunden eine im Vergleich zu akuten Wunden erhöhte Expression von MMP-2 und MMP-9 sowie eine verminderte Aktivität TIMP-1 dokumentiert werden. In MMP-9 knock out Mäusen kommt es zu einer schnelleren Reepithelialisierung nach einem experimentellen Corneadefekt. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die systemische Behand-

lung mit einem synthetischen, unspezifischen Metalloproteinaseinhibitor bei Ratten zu einer Erhöhung der mechanischen Wundfestigkeit führt.

Diese Untersuchungen dokumentieren die Bedeutung der Matrixmetalloproteinase bei der Regulation der Wundheilung. In Wunden mit einer verzögerten Heilung scheint ein Überschuss an Matrixmetalloproteinase und ein Mangel ihrer Inhibitoren vorzuliegen. Klinische Studien zu einer möglichen therapeutischen Modulation dieses Ungleichgewichts liegen jedoch bislang nicht vor.

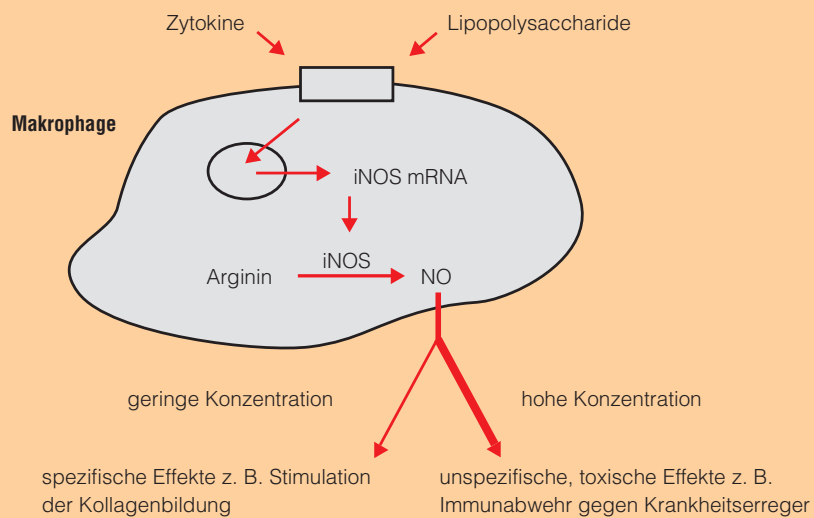
STICKSTOFFMONOXID

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebige freies Radikal mit biologischer Mediatorfunktion, das in einem NO-Synthase (NOS) abhängigen enzymatischen Prozess aus Sauerstoff und der Aminosäure Arginin entsteht. In Wunden wird NO von Makrophagen und Fibroblasten synthetisiert. Untersuchungen in vitro zeigen, dass die Kollagensynthese von Wundfibroblasten durch die kompetitive Hemmung ihrer spontanen NO-Synthese vermindert und durch die Zugabe NO freisetzender Substanzen gesteigert wird. In anderen Zellsystemen wurden hemmende Effekte der NO-Induktion oder -Freisetzung auf die Kollagensynthese gezeigt. Die dabei verwendeten NO-Konzentrationen waren jedoch deutlich höher, so dass toxische Effekte nicht ausgeschlossen werden können.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Bedeutung der NO-Bildung in Hinblick auf die Regulation der extrazellulären Matrixbildung möglicherweise von Zellsystem zu Zellsystem unterschiedlich ist. Auch scheint die gebildete NO-Menge einen entscheidenden Einfluss auf die Protein- und Kollagensynthese der Zielzelle zu haben. Geringe NO-Konzentrationen bewirken möglicherweise einen spezifischen, regulierenden Effekt, wohingegen hohe NO-Konzentrationen einen unspezifischen, wahrscheinlich toxischen Effekt auf die jeweiligen Zielzellen ausüben.

In vivo führt die systemische Hemmung der NO-Synthese in Wunden zu einer verminderten Kollagenbildung und mechanischen Festigkeit von Wunden. Entsprechend zeigen transgene iNOS (induzierbare NOS) knock out Mäuse, denen das Gen zur Synthese der induzierbaren NO-Synthase fehlt,

SYNTHESE VON NO IN MAKROPHAGEN (ABB. 4)



Nach Stimulation durch Zytokine (z. B. IFN- γ , TNF- α) und/oder Erregerbestandteile (Lipopolysaccharide) kommt es zur Induktion der sogenannten iNOS in Makrophagen. Aus der Aminosäure Arginin gebildetes NO diffundiert zu benachbarten Zellen. Geringe NO-Konzentrationen bewirken einen spezifischen, regulierenden Effekt, wohingegen hohe NO-Konzentrationen einen unspezifischen, toxischen Effekt auf die jeweiligen Zielzellen ausüben. Die durch die induzierbare NO-Synthase gebildeten NO-Mengen sind etwa um 1000fach größer als die durch die konstitutiven Isoformen (endothelial constitutive NOS, neuronal constitutive NOS) gebildeten Mengen.

eine verlangsamte Heilung offener Wunden. In Modellen der gestörten Heilung, wie Diabetes mellitus oder unter immunsuppressiver Therapie, ist die NO-Synthase in Wunden beeinträchtigt. Diese Untersuchungen legen nahe, dass Stickstoffmonoxid eine zentrale Bedeutung bei der Kollagenbildung während der Wundheilung besitzt.

Therapeutisch kann durch die systemische Verabreichung von Molsidomin, einer NO freisetzenden Substanz, die gestörte Heilung diabetischer Tiere teilweise wieder normalisiert werden. Andere Untersuchungen zeigen, dass durch einen lokalen Transfer des iNOS Gens eine Verbesserung der Heilung erzielt werden kann. Auch in humanen Wunden konnte kürzlich immunhistochemisch die Expression der iNOS nachgewiesen werden.

Die funktionelle Bedeutung der NO Synthese in humanen Wunden ist aber bislang unklar. Bei der Behandlung der chronischen Analfissur, der neben der eigentlichen chronischen Wunde pathophysiologisch vor allem ein erhöhter Sphinctertonus zugrunde liegt, scheint die Therapie mit NO freisetzenden Glycerinsalben einen positiven Effekt auf die Heilung zu besitzen. Klinische Er-

fahrungen bei der Behandlung anderer Wunden liegen bislang nicht vor. Inwieweit eine Modulation der NO-Physiologie möglicherweise Bedeutung für die Behandlung nicht heilender Wunden beim Menschen gewinnen wird, muss daher gegenwärtig unbeantwortet bleiben.

NEUROPEPTIDE

Neurogene Stimuli spielen bei Entzündungs- und Reparaturvorgängen eine wichtige Rolle. Das periphere Nervensystem übermittelt dabei nicht nur sensorische und motorische Informationen, sondern hat einen wesentlichen Einfluss auf die Funktion immunkompetenter Entzündungszellen, Endothel-, Epithel- und Bindegewebszellen. Eine Vielzahl dieser Interaktionen werden von Neuropeptiden vermittelt, die als Hormone, Neurotransmitter oder als parakrine Faktoren wirken können. Nach Verletzung kommt es in Abhängigkeit vom Ausmaß der Läsion zu einem Auswachsen benachbarter Nervenfasern. Substanz P, die vor allem aus afferenten Nerven stammt, stimuliert in vitro Keratinozyten, Fibroblasten und glatte Muskelzellen. Ähnliche in vitro Effekte sind von den Neuropeptiden Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) und Calci-

tonin Gene-Related Peptide (CGRP) beschrieben worden. In vivo stimulieren Substanz P, CGRP und VIP die Angiogenese und unterstützen so direkt die Wundheilung.

Schon vor mehr als 70 Jahren wurde der Zusammenhang zwischen der Schädigung des peripheren Nervensystems und der Entstehung chronischer Wunden erkannt. Experimentell zeigt sich in denervierter Haut eine schlechtere Heilung mit Verminderung der mechanischen Wundfestigkeit und Kollagenbildung. Ähnlich kommt es nach Capsaicin-induzierter Depletion von Neuropeptiden zu einer schlechteren dermalen Heilung. Umgekehrt führt die lokale Behandlung mit Substanz P und CGRP zu einer besseren Wundheilung im Tiermodell. Klinische Studien zur therapeutischen Anwendung von Neuropeptiden bei nicht heilenden Wunden stehen bislang aus, so dass die klinische Bedeutung unbeantwortet bleibt.

IMMUNSUPPRESSION UND WUNDHEILUNG

Immunsuppression führt zu Wundheilungsstörungen. Ursachen einer Immunsuppression sind vielfältig und können Folge eines Traumas oder einer Infektion, aber auch einer endokrinen Störung oder medikamenteninduziert sein. Bei ausgedehnten Verletzungen scheint die Wunde dabei selbst die Quelle immunsuppressiver Faktoren zu sein. Durch ein Ungleichgewicht protektiver und schädigender Mediatoren (Zytokine, Prostaglandine, Stickstoffmonoxid, etc.) und Phänotypveränderung immunkompetenter Immunzellen kommt es zu einer Hemmung der normalen Heilung. Eine verminderte Immunfunktion beeinträchtigt jedoch nicht nur die Heilungskaskade, sondern führt über eine geschwächte Immunabwehr zu einer erhöhten Infektanfälligkeit mit konsekutiver Heilungverschlechterung und Freisetzung neuer Entzündungsmediatoren. Diese Spirale der „Verletzung – Immunsuppression – Infektanfälligkeit – Verstärkung der Immunsuppression“ ist Grundlage schwerer systemischer Entzündungsvorgänge mit nachfolgendem Organversagen.

Neben dieser reaktiven Immunsuppression hat die medikamenteninduzierte Form der Immunsuppression und ihr Einfluss auf die Heilung eine große klinische Bedeutung. Außer Cor-

ticosteroide treten im Rahmen der Transplantationschirurgie zunehmend moderne Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A oder Tacrolimus, in den Vordergrund.

Corticosteroide binden an einen spezifischen intrazytoplasmatischen Rezeptor und vermitteln nach Translokation des Steroidkomplexes zum Zellkern ihre Wirkung am Genom der Zielzelle. Verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen haben eine dosisabhängige Hemmung der Heilung nach Corticosteroidgabe während der perioperativen und frühen Entzündungsphase der Heilung gezeigt. Corticosteroidgaben jenseits des zweiten postoperativen Tages oder eine präoperative Gabe mit einem dreitägigen freien Intervall vor der Operation führen jedoch zu keiner Beeinträchtigung der Heilung.

Histologisch kommt es nach Corticosteroidgabe zu einer verminderten Entzündungsreaktion aller Immunzellen mit nachfolgender Suppression der Matrix-, Angiogenese-, und Epithelbildung. Dexamethason interferiert mit der TGF- β induzierten Kollagensynthese in Fibroblasten und scheint dabei einen direkten Einfluss auf die Kollagenbildung durch eine posttranskriptionelle Regulation der Pro(α)-Kollagen-mRNA zu nehmen. Experimentell kann durch die Gabe von Vitamin A, anabolen Steroiden, wie z. B. Testosteron, oder den Wachstumsfaktoren bFGF und TGF- β der negative Effekt der Corticosteroide auf die Wundheilung teilweise oder ganz aufgehoben werden.

Auch in klinischen Studien konnte der schädigende Einfluss der Corticosteroide auf die Heilung dokumentiert werden. So führt die Behandlung mit Corticosteroiden nach abdominal- und gefäßchirurgischen Eingriffen zu signifikant vermehrten Wundheilungsstörungen. Die Dauer der Corticosteroidbehandlung (< 1 Woche oder > 1 Woche) scheint dabei keinen Einfluss auf die Inzidenz von Wundheilungsstörungen zu haben. In anderen Untersuchungen wurden nur beim Vorliegen weiterer Risikofaktoren, wie z. B. einer lokalen Wundinfektion oder Diabetes mellitus, vermehrt Wundkomplikationen, in einigen Studien sogar kein erhöhtes Risiko einer komplizierten Heilung unter Steroidmedikation beschrieben. Allerdings sind die Fallzahlen teilweise sehr gering, so dass die Aussagen einzelner

Untersuchungen nur sehr schwer zu interpretieren sind. Prospektive, kontrollierte klinische Untersuchungen zum Einfluss von Steroiden auf die Wundheilung liegen nicht vor.

Cyclosporin A und Tacrolimus hemmen über intrazelluläre Bindungsproteine (Cyclophillin bzw. FK-Bindungsprotein) die calciumabhängige Aktivierung der Phosphatase Calcineurin. Hierauf kommt es durch fehlende De-phosphorylierung des Nuklearfaktors der aktivierten T-Zellen (NF-AT) zu einer Hemmung der IL-2 Synthese mit nachfolgender Immunsuppression.

Tierexperimentelle Untersuchungen haben eine hemmende Wirkung von Cyclosporin A und Tacrolimus auf die Wundheilung gezeigt. Dieser Effekt tritt jedoch erst bei Dosierungen auf, die um mehr als das 10fache über der zu einer Abstoßungsbehandlung beim Tier minimal notwendigen Dosierung liegen. Spezielle Untersuchungen zum Einfluss dieser Substanzen auf die Wundheilung beim Menschen liegen nicht vor. Andererseits werden Cyclosporin A und Tacrolimus meist in Kombination mit Corticosteroiden gegeben, so dass eine isolierte Beurteilung schwierig ist. Hinsichtlich der Häufigkeit von Wundheilungsstörungen scheint aber zwischen Cyclosporin A und Tacrolimus bei leber- und nieren-transplantierten Patienten kein Unterschied zu bestehen.

DIABETES MELLITUS UND WUNDHEILUNG

Experimentell kommt es bei der Wundheilung unter diabetischen Stoffwechselbedingungen zu einer gestörten Heilung primär und sekundär heilender Wunden. Hierbei zeigten sich eine verminderte Bildung des Granulationsgewebes sowie eine reduzierte mechanische Festigkeit von Inzisionswunden. Dieses Defizit kann durch frühzeitige Insulingaben teilweise oder ganz wieder ausgeglichen werden. Histologisch findet man eine gestörte Epithelialisierung, Neovaskularisation und Granulationsbildung, die in der Entzündungsphase der Heilung mit einer verminderten IL-6 Anreicherung im Wundsekret einhergehen. Auch die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β und IGF-1 sowie NO sind in tierexperimentellen, diabetischen Wunden vermindert.

Aus diabetischen Ulcera isolierte Fibroblasten zeigen eine verminderte Proliferations- und Kollagensynthese-

rate. Eine erhöhte Infektanfälligkeit diabetischer Wunden wird im Zusammenhang mit der seit langem bekannten verminderten Phagozytosefähigkeit von Makrophagen und Granulozyten diskutiert. Ob diese gestörte Phagozytosefähigkeit und der veränderte Kollagenmetabolismus lediglich auf erhöhte Glucosekonzentrationen zurückzuführen sind oder ob verschiedene metabolische Veränderungen (wie z. B. der Polyol- und Proteinkinase C-Diacylglycerol Stoffwechselweg) sekundär zu einer Störung der Reparaturmechanismen führen, wird kontrovers diskutiert. Ebenso unklar ist, ob die bekanntermaßen kompromittierte humorale und zelluläre Immunität bei Diabetikern eine Bedeutung bei der Wundheilung hat.

Therapeutisch führen bei experimentellen, diabetischen Wunden die lokale Applikation von EGF, PDGF, FGF und die systemische Gabe von Molsidomin, einer NO freisetzenden Substanz, zu einer partiellen oder vollständigen Normalisierung der gestörten Heilung. Bei der Applikation von bFGF konnte gezeigt werden, dass es hierbei zu einer vermehrten Stimulation von Entzündungszellen mit konsekutiver Erhöhung der TGF- β -Expression kommt. Auch die systemische Verabreichung von synthetischem, humanem Wachstumshormon oder Arginin führen experimentell zu einer Verbesserung der Wundheilung diabetischer Tiere. Der beim Wachstumshormon und Arginin zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unklar. Diskutiert werden neben einer Erhöhung der lokalen IGF-1- bzw. Stickstoffmonoxidkonzentrationen auch eine unspezifische Stimulation des Immunsystems.

Ergebnisse klinischer Untersuchungen zur Bedeutung des Diabetes mellitus als Risikofaktor einer Wundheilungsstörung bei primär heilenden Wunden sind widersprüchlich. Während einige Studien keinen Effekt beschreiben, ist in anderen Untersuchungen das Vorhandensein eines Diabetes mellitus in der univariaten Analyse ein Risikofaktor für vermehrte Wundkomplikationen. Diese Zahlen wurden an verschiedenen Patientenkollektiven nach Abdominal- und peripheren Gefäßeingriffen sowie nach Nierentransplantationen erhoben. Die Fallzahlen sind allerdings gering, so dass kleine Unterschiede nur schwer erfasst werden können. Beim gleichzeitigen Vorliegen

weiterer Risikofaktoren, wie z. B. lokale Infektion oder Steroidmedikation, wurden auch in anderen Studien vermehrt Wundkomplikationen beobachtet, so dass ein erhöhtes Risiko einer gestörten Wundheilung bei diabetischen Patienten beim Vorhandensein weiterer kompromittierender Faktoren angenommen werden kann.

Ätiologisch kommt dem Diabetes mellitus eine besondere Bedeutung bei der Entstehung schlecht heilender Wunden am Fuß zu (Diabetisches Fußsyndrom). Pathogenetisch unterscheidet man beim diabetischen Fußsyndrom den neuropathischen vom ischämischen Typ. Liegen beide Komponenten vor, spricht man vom Mischtyp. Beim neuropathischen Typ kommt es vor allem an druckexponierten Stellen des Fußes zu schmerzlosen Ulcera. Der ischämische Typ führt meist, ähnlich wie beim Vorliegen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit ohne Diabetes mellitus, zu akralen Nekrosen. Ob sich chronische Wunden diabetischer Genese immunologisch von chronischen Wunden anderer Genese, z. B. Dekubitalulcera oder venösen Ulcera, unterscheiden, wird kontrovers diskutiert. Gemeinsam ist diesen chronischen Wunden meist ein persistierender entzündlicher Stimulus (z. B. wiederholtes Trauma, Ischämie und/oder bakterielle Kontamination). Dies führt zu einer anhaltenden Expression entzündlicher Zytokine (TNF- α , IL- β) und Bildung von Matrixmetalloproteinasen (z. B. MMP-9) unter gleichzeitiger Verminderung von Matrixmetalloproteinasen Inhibitoren (TIMP-1) und einzelner Wachstumsfaktoren, wie PDGF. Dieses Ungleichgewicht stimulierender und inhibierender Faktoren scheint entscheidend für eine mangelnde Heilung zu sein.

Therapeutisch stehen beim Diabetischen Fußsyndrom die Infektsanierung und Druckentlastung und im Falle einer ischämischen Läsion die Revaskularisierung gemeinsam mit einer feuchten Wundbehandlung im Vordergrund des Behandlungskonzepts. Basierend auf diesen Behandlungsprinzipien wurden in Kenntnis eines nachgewiesenen lokalen Mangels an PDGF-BB verschiedene klinische Studien zur Lokalanwendung des humanen, rekombinanten PDGF-BB an neuropathischen, diabetischen Ulcera durchgeführt. Neben einzelnen nicht randomisierten

Studien konnte in drei von vier prospektiven, randomisierten und kontrollierten Multizenterstudien ein positiver Effekt gegenüber der Standardtherapie („good ulcer care“) beobachtet werden. In einer Metaanalyse von mehr als 1000 Patienten wird der Vorteil in einer Verbesserung der Heilungsrate unter kontrollierten Bedingungen um etwa 10% gesehen.

Ob auch noch weitere Faktoren, wie z. B. VEGF, das bei experimentellen, ischämischen Wunden zu einer Heilungsverbesserung führt, eine klinische Anwendung bei der Therapie von Wundheilungsstörungen finden, werden künftige Untersuchungen zeigen.

SCHLUSSFOLGERUNG

Komplexe immunologische Vorgänge prägen die verschiedenen Phasen der Wundheilung. Systemisch und lokal wirkende immunkompromittierende Faktoren verschiedener Ursache führen zu einem Ungleichgewicht aktivierender und hemmender Wundfaktoren und beeinträchtigen die normale Heilung. Immuntherapeutische Ansätze zur Modulation der Heilung sind Gegenstand experimenteller und klinischer Studien. Die Applikation einzelner Faktoren scheint dabei unter Berücksichtigung standardisierter Behandlungsverfahren eine Verbesserung der Wundheilung bei Patienten mit einer komplizierten Heilung zu ermöglichen. Eine Verbesserung der gegenwärtigen Behandlungsmöglichkeiten einer gestörten Heilung erfordert eine konsequente Umsetzung bewährter Therapiekonzepte, die Berücksichtigung der komplexen immunologischen, infektiologischen und pharmakologischen Verhältnisse sowie die Therapie der jeweiligen Grunderkrankung.

Für die Autoren:

*Dr. Michael Schäffer
Abt. für Allgemeine Chirurgie und Poliklinik, Chirurgische Universitätsklinik
Hoppe-Seyler-Str. 3
72076 Tübingen*

Literatur bei der Redaktion

Originalarbeit erschienen in „Der Chirurg“ 70. Jahrgang, Heft 8, August 1999; © Springer Verlag Berlin Heidelberg 1999