

**Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar**

Direktor: Prof. Dr. Tim Pohlemann

**Korreliert das Wachstums- und
Differenzierungsverhalten von humanen
Wundfibroblasten in vitro mit der Heilungstendenz
einer Wunde?**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2012

vorgelegt von:

Florian Schwarz

geboren am 27. November 1982

in Gießen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Zusammenfassung	1
Summary	3
2. Einleitung	5
2.1 Der Weichteilschaden	5
2.2 Wundheilung	6
2.2.1 Definition und Ätiologie	6
2.2.2 Physiologie der Wundheilung	7
2.3 Störungen der Wundheilung und Rolle der Zytokine	9
2.4 In-vitro-Co-Kultur-Wund-Modell im Vergleich	11
2.5 Fragestellungen	12
3. Material und Methoden	13
3.1 Zellkultur	13
3.1.1 Überblick	13
3.1.2 Wundfibroblasten	13
3.1.2.1 Patienten-Kollektiv	13
3.1.2.2 Gewebe-Entnahme und Zellisolierung	15
3.1.3 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	17
3.1.4 Versuchsdurchführung	19
3.1.5 In-vitro-Hypoxie	20
3.2 Immunfluoreszenzfärbung	23
3.2.1 Grundprinzip der Immunfärbung	23
3.2.2 Färbeprotokoll	23
3.2.3 Primärantikörper	25
3.2.3.1 Von-Willebrand-Faktor	25
3.2.3.2 α -Smooth-Muscle-Actin	26
3.2.3.3 Ki67	28
3.2.4 Interleukin-8-Immunoassay	29
3.2.4.1 Prinzip	29
3.2.4.2 Quantifizierung von Interleukin-8	29
3.3 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	30
3.3.1 Aufbau des Fluoreszenzmikroskops	30
3.3.2 Auswertung	31

3.4 Statistische Auswertung	33
4. Ergebnisse	34
4.1 Spaltschluss	34
4.1.1 Chronische Wunden	34
4.1.1.1 Mono-Kultur	34
4.1.1.2 Co-Kultur	34
4.1.1.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	35
4.1.2 Gut granulierende Wunden.....	36
4.1.2.1 Mono-Kultur	36
4.1.2.2 Co-Kultur	36
4.1.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	37
4.1.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden	38
4.2 Zelldichte	40
4.2.1 Chronische Wunden	40
4.2.1.1 Mono-Kultur	40
4.2.1.2 Co-Kultur	40
4.2.1.3 Vergleich Mono vs. Kultur-Co-Kultur	41
4.2.2 Gut granulierende Wunden.....	42
4.2.2.1 Mono-Kultur	42
4.2.2.2 Co-Kultur	42
4.2.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	43
4.2.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden	44
4.2.4 Zelldichte in der Gruppe der Raucher	46
4.2.4.1 Mono-Kultur	46
4.2.4.2 Co-Kultur	46
4.2.4.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	47
4.2.5 Zelldichte in der Gruppe der Nichtraucher	48
4.2.5.1 Mono-Kultur	48
4.2.5.2 Co-Kultur	48
4.2.5.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	49
4.2.6 Vergleich Raucher vs. Nichtraucher.....	50
4.3 Proliferationsmarker MIB	52
4.3.1 Fibroblasten: chronische Wunden.....	52
4.3.1.1 Mono-Kultur	52
4.3.1.2 Co-Kultur	52
4.3.1.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	53
4.3.2 Fibroblasten: gut granulierende Wunden	54
4.3.2.1 Mono-Kultur	54
4.3.2.2.Co-Kultur	54

4.3.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	55
4.3.3 Fibroblasten: Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden.....	56
4.3.4 HDMEC	58
4.3.4.1 Chronischen Wunden	58
4.3.4.2 Gut granulierende Wunden.....	58
4.3.4.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden	59
4.4 Generationszeit der Fibroblasten in Normoxie	60
4.4.1 Chronische Wunden	60
4.4.1.1 Mono-Kultur	60
4.4.1.2 Co-Kultur	60
4.4.1.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	61
4.4.2 Gut granulierende Wunden.....	62
4.4.2.1 Mono-Kultur	62
4.4.2.2 Co-Kultur	62
4.4.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	63
4.4.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden	64
4.5 Myofibroblasten-Anteil	66
4.5.1 Chronische Wunden	66
4.5.1.1 Mono-Kultur	66
4.5.1.2 Co-Kultur	66
4.5.1.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	67
4.5.2 Gut granulierende Wunden.....	68
4.5.2.1 Mono-Kultur	68
4.5.2.2 Co-Kultur	68
4.5.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	69
4.5.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden	70
4.6 Endothelzell-Anteil.....	72
4.6.1 Chronische Wunden	72
4.6.2 Gut granulierende Wunden.....	72
4.6.3 Vergleich Endothelzell-Anteil chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden .	73
4.7 Interleukin-8-Konzentration.....	74
4.7.1 Chronische Wunden	74
4.7.1.1 Mono-Kultur	74
4.7.1.2 Co-Kultur	74
4.7.1.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	75
4.7.2 Gut granulierende Wunden.....	76
4.7.2.1 Mono-Kultur	76
4.7.2.2 Co-Kultur	76
4.7.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur	77
4.7.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden	78

5. Diskussion	80
6. Anhang	92
6.1 Geräte	92
6.2 Materialien	93
6.2.1 Verbrauchsmaterialien	93
6.2.2 Vorbereitung der Objektträger für die Zellkultur	95
6.3 Verbrauchslösungen	96
6.4 Literaturverzeichnis	97
6.5 Publikationen	104
6.6 Danksagung	105
6.7 Lebenslauf	106

Abkürzungsverzeichnis

Abbildung	Abb.
α -Smooth-Muscle-Actin	α -SMA
Chronische Wunde	cW
Colony Stimulating Factor	CSF
Dimethylsulfoxid	DMSO
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	ELISA
Extrazelluläre Matrix	ECM
Fibroblast Growth Factor	FGF
Gesamtzellzahl	GZ
Goat-anti-mouse	GAM
Goat-anti-rabbit	GAR
Granulocyte-Colony Stimulating Factor	G-CSF
Gut granulierende Wunde	gG
Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	HDMEC
Humane Umbilicalvenen Endothelzellen	HUVEC
Hypoxie induzierter Faktor-1	HIF-1
Kaliumchlorid	KCl
Keratinocyte Growth Factor	KGF
Ki67-Antigen	Ki67
Lateinisch	lat.
MIB-1-Antikörper (Molecular Immunology Borstel number 1)	MIB
Minuten	min
Myofibroblasten	MF
Normale humane dermale Fibroblasten	NHDF
Passage	P
Platelet-Activating Factor	PAF
Platelet-Derived Growth Factor	PDGF
Phosphat Buffered Saline	PBS
Sekunden	sec
Stickstoffmonoxid	NO
Stunden	h
Tabelle	Tab.
Tumor Necrosis Factor	TNF
Transforming Growth Factor	TGF
Umdrehungen/Minute	U/min
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF
Von-Willebrand-Faktor	vWF
Wundfibroblasten	WF

1. Zusammenfassung

Die humane Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der aus dem Zusammenspiel von verschiedenen Zelltypen und Botenstoffen besteht. Zu den wichtigsten an der Wundheilung beteiligten Zellen gehören Fibroblasten, ihre differenzierte Form, die Myofibroblasten und Endothelzellen. Myofibroblasten werden durch proinflammatorische Zytokine aktiviert und tragen durch die Bildung von Wachstumsfaktoren und Matrixproteinen und durch ihre Kontraktilität zum Wundheilungsprozess bei. Daneben wird ihr Beitrag zur Angiogenese in der Literatur diskutiert.

Um eine adäquate Wundheilung zu gewährleisten, ist eine koordinierte Regulation des Zusammenspiels von Fibroblasten, Myofibroblasten und Endothelzellen unabdingbar. Da die direkte Zellinteraktion zwischen diesen Zelltypen bisher nur wenig untersucht ist, wurde in vorherigen Arbeiten ein In-vitro-Wundheilungsassay (co-culture scratch-wound migration assay = CCSWMA), bestehend aus humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, normalen humanen dermalen Fibroblasten und Myofibroblasten etabliert.

In der aktuellen Arbeit wurde dieser Assay nun weiterentwickelt: Der vorher untersuchte Typ des normalen Fibroblasten wurde durch den Zelltyp des humanen dermalen Wundfibroblasten ersetzt, der zuvor aus Patientenbiopsien isoliert wurde. Diese Zellen wurden aus chronischen und gut granulierenden Wunden gewonnen.

Es wurde überprüft, ob sich prinzipiell eine Korrelation der klinischen Heilungstendenz einer Wunde mit dem Verhalten der Wundfibroblasten in vitro herstellen lässt.

Dieses Verhalten wurde unter dem Einfluss eines unterschiedlichen Sauerstoffangebots (Normoxie, Hypoxie, Reoxygenierung) durch die Parameter Proliferation (Zellzahl, Proliferationsmarker MIB, Generationszeit), Migration und Myofibroblasten-Differenzierungsrate (MFDR) charakterisiert. Zusätzlich wurde die Konzentration des an der Wundheilung beteiligten Zytokins Interleukin-8 (IL-8) im Zellkulturüberstand bestimmt. Dabei konnte sowohl das Verhalten der Fibroblasten aus beiden Wundgruppen in Mono-Kultur, als auch die Interaktion mit Endothelzellen (in Co-Kultur) analysiert werden.

Ergebnisse

Proliferation (Zellzahl): In unserem Modell war die Zelldichte zu Versuchsbeginn (0 h) an in den Fibroblasten-Kulturen der gut granulierenden Wunden mit 140 Zellen/mm² im Vergleich zu den Fibroblasten-Kulturen der chronischen Wunden mit 66 Zellen/mm² in Mono-Kultur signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu war die initiale Zelldichte in den chronischen Wunden in Co-Kultur mit 309 Zellen/mm² höher als in den gut granulierenden Wunden mit 288 Zellen/mm². Darüberhinaus war die Zelldichte in Mono-Kultur in der Gruppe der gut

granulierenden Wunden nach 24 h und 48 h mit 321 Zellen/mm² bzw. 406 Zellen/mm² gegenüber der Gruppe der chronischen Wunden mit 125 Zellen/mm² bzw. 232 Zellen/mm² nach 24 h und 48 h signifikant höher.

Proliferation (Generationszeit): In den Mono-Kulturen der chronischen Wunden nahm die Generationszeit mit 41 h nach Tag 1 und 33 h nach Tag 2 über die Zeit ab, wohingegen sie in den gut granulierenden Wunden mit 22 h nach Tag 1 und 58 h nach Tag 2 zunahm.

Proliferation (MIB): In den gut granulierenden Wunden in Mono-Kultur proliferierten 67% der Wundfibroblasten nach 24 h und 62% nach 48 h, das heißt tendenziell etwas stärker, als die Wundfibroblasten in den chronischen Wunden mit 65% nach 24 h und 54% nach 48 h. Dieselbe Tendenz zeigte sich in den Co-Kulturen.

Migration: Auch war die Migration der Fibroblasten aus den gut granulierenden Wunden generell stärker. Lediglich unter hypoxischen Bedingungen in Co-Kultur war die Migration bei den chronischen Wunden stärker als bei den Fibroblasten aus gut granulierenden Wunden.

Myofibroblasten-Differenzierungsrate: Die MFDR unter Normoxie war in Mono- und Co-Kultur in der Gruppe der chronischen Wunden mit im Mittel 24% bzw. 21% durchweg signifikant höher als in der Gruppe der gut granulierenden Wunden mit 9% bzw. 11%.

Interleukin-8: Die IL-8-Konzentrationen in den Zellüberständen unterschieden sich nicht wesentlich in beiden Gruppen. Beiden gemeinsam war ein relativer Anstieg der IL-8 Konzentration unter Hypoxie und unter Reoxygenierung im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen. Bei den Fibroblasten der chronischen Wunden wurden mit 3,4 fg/Zelle unter Hypoxie und mit 1,6 fg/Zelle unter Reoxygenierung höhere Werte gemessen als in ihren normoxischen Kontrollen (1,5 u. 0,7 fg/Zelle). Dasselbe galt auch für die Fibroblasten der gut granulierenden Wunden mit 2,8 fg/Zelle unter Hypoxie und mit 4,9 fg/Zelle unter Reoxygenierung gegenüber 1,9 fg/Zelle u. 2,4 fg/Zelle unter Normoxie.

Die Verwendung des Modells CCSWMA, erweitert um die Komponente Wundfibroblast, hat gezeigt, dass es sich generell für die In-vitro-Überprüfung der Heilungstendenz eines Weichteilschadens eignen kann. Insbesondere der Nachweis einer unterschiedlichen MFDR scheint in Zukunft als diagnostisches Tool geeignet zu sein. So könnte durch Diversifizierung weiterer Einflussfaktoren und Parameter der Wundheilung die MFDR als zusätzlicher prognostischer Marker für die Heilungstendenz einer Wunde herangezogen werden.

1. Summary

Human wound healing is characterized by the complex interaction of different cell types and transmitters. Fibroblasts, their differentiated form, the myofibroblasts and endothelial cells belong to the most important cells involved in wound healing. Myofibroblasts are activated by proinflammatory cytokines and contribute to the wound healing process by the release of growth factors and matrix proteins, as well as by their contractile abilities. Furthermore, their contribution to angiogenesis is discussed in the literature.

To ensure an adequate wound healing, a coordinated regulation of the interaction of fibroblasts, myofibroblasts and endothelial cells is indispensable. As the direct cell interaction between these cell types has not been investigated exhaustively yet, an in vitro wound healing assay (co-culture scratch-wound migration assay = CCSWMA) was established in previous works. This assay consists of human dermal microvascular endothelial cells, normal human dermal fibroblasts and myofibroblasts.

In the present work, the CCSWMA was developed further: The previously examined cell type of the normal fibroblast was replaced by the cell type of the human wound fibroblast, which had been isolated from patient biopsies before. These cells were acquired from chronic and well granulating wounds.

We verified, whether there exists a fundamental correlation between the clinical healing tendency and the behavior of the wound fibroblast in vitro.

This behavior was characterized in response to different oxygen levels (normoxia, hypoxia, reoxygenation) by the parameters proliferation (cell number, proliferation marker MIB, generation time), migration and myofibroblast differentiation rate (MFDR). In addition, the concentration of the cytokine Interleukin-8 (IL-8), which has been known to be involved in wound healing, was determined in the cell culture supernatants. We analysed the behavior of the fibroblasts of both wound groups in mono-culture as well as their interaction with endothelial cells in co-culture.

Results

Proliferation (cell number): At the beginning of the experiment (0 h) the cell density in the mono-culture from well granulating wounds (140 cells/mm²) was significantly increased compared to that in the mono-cultures from chronic wounds (66 cells/mm²). In contrast, the initial cell density in the chronic wounds in co-culture was higher with 309 cells/mm² than in the well granulating wounds with 288 cells/mm². Furthermore, the cell density after 24 h and 48 h in the group of the well granulating wounds with 321 cells/mm² and 406 cells/mm²,

respectively, was increased significantly compared to that of the group of the chronic wounds with 125 cells/mm² and 232 cells/mm², respectively.

Proliferation (generation time): In the mono-cultures of the chronic wounds, the generation time decreased over the time with 41 h after day 1 and 33 h after day 2, whereas in the well granulating wounds the generation time increased over the time with 22 h after day 1 and 58 h after day 2.

Proliferation (MIB): In the well granulating wounds in mono-culture, 67% of the wound fibroblasts were MIB positive after 24 h and 62% after 48 h. There was thus a slightly stronger proliferation compared to the wound fibroblasts in the chronic wounds with 65% after 24 h and 54% after 48 h. A similar development was detected among the co-cultures.

Migration: In general, fibroblasts from well granulating wounds showed a better migration. Only under hypoxic conditions in co-culture, the migration in the chronic wounds was stronger than in the well granulating wounds.

Myofibroblast differentiation rate: The average MFDR under normoxia in mono- and co-culture in the group of the chronic wounds with 24% and 21%, respectively, was consistently significantly higher compared to that of the group of the well granulating wounds with 9% and 11%, respectively.

Interleukin-8: IL-8-concentrations in the cell culture supernatants did not differ considerably between both groups. Common to both was a relative increase of the IL-8 concentration under hypoxia and reoxygenation in comparison to their normoxic controls. In the cultures of chronic wounds higher values were measured with 3.4 fg/cell under hypoxia and with 1.6 fg/cell under reoxygenation compared to their normoxic controls (1.5 fg/cell and 0.7 fg/cell). The same applied to the well granulating wounds with 2.8 fg/cell under hypoxia and with 4.9 fg/cell under reoxygenation compared to 1.9 fg/cell and 2.4 fg/cell under normoxia.

The usage of the model CCSWMA, extended by the component wound fibroblast, has shown that it generally might be valuable to verify the healing tendency of a certain soft tissue damage in vitro. Especially, the proof of a different MFDR among both groups seems to be a suitable tool in the future. Thus, the analysis of the MFDR, broadened by diversifying further influencing factors and parameters, could be used as a additional prognostic marker for the healing tendency of a wound.

2. Einleitung

2.1 Der Weichteilschaden

In der täglichen Praxis der ärztlichen Versorgung spielen chronische Wunden allein schon aufgrund ihrer Häufigkeit eine große Rolle. Schätzungsweise über 4 Millionen Menschen in der Bundesrepublik Deutschland leiden an chronischen Wunden. Die Behandlungskosten betragen, Stand 2005, ca. 5 Milliarden Euro pro Jahr und stellen somit auch erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem dar (Dill-Müller & Tilgen 2005).

Lokale und systemische Faktoren tragen zu Wundheilungsstörungen bei. So spielen die Lokalisation der Wunde und die damit einhergehende mechanische Belastung einerseits, als auch die Beschaffenheit der Wunde mit Parametern wie Wundausdehnung und -tiefe und Struktur der Wundränder eine entscheidende Rolle. Mikrobielle Infektionen, die durch Bakterien oder Pilze verursacht werden und bei denen der Erreger auch vom Entstehungsmechanismus der Wunde abhängig ist, können die Wundheilung sowohl durch lokales, als auch systemisches Auftreten beeinflussen.

Zu den systemischen Faktoren zählt zum einen das Patientenalter, das bei Zunahme mit einer abnehmenden Regenerationsfähigkeit einhergeht und damit auch die Wundheilung beeinflusst (Gosain & DiPietro 2004). Zum anderen spielt auch die Ernährung, und dabei insbesondere die Zufuhr von Vitaminen, Spurenelementen und Proteinen eine wichtige Rolle. Der Allgemeinzustand und damit auch die Wundheilung wird des Weiteren von Erkrankungen des Stoffwechsels wie Diabetes mellitus (Lebrun et al. 2010), des Gefäßsystems (z.B. periphere arterielle Verschlusskrankheit; Eneroth-Persson 1993), des Gerinnungssystems (diverse Faktoren-Mängel) und von Tumor-Erkrankungen beeinflusst. Zuletzt beeinflussen auch Medikamente wie Chemotherapeutika, Zytostatika, Antibiotika, Hormone, Antikoagulantien, aber auch Alkohol, Nikotin (Silverstein 1992) und andere Drogen den Heilungsverlauf negativ.

An therapeutischen Maßnahmen gibt es neben der Behandlung der prädisponierenden Grunderkrankung die möglichst angepasste Behandlung, abhängig von der individuellen Wundsituation. Zum Schaffen einer möglichst günstigen Wundsituation tragen zunächst einmal die Desinfektion der Wunde und das Beseitigen von verbliebenen Fremdkörpern, sowie von abgestorbenem und kontaminiertem Gewebe in der Frühphase der Wundheilung bei. Danach tritt mit fortschreitendem Heilungsprozess die Verhinderung eines Wundsekretstaus passiv mittels Hydrofaser- und Polymerverbänden oder aktiv mittels Vakuumsystemen in den Vordergrund. Über die Wahl entsprechender Verbandmaterialien lassen sich die Parameter Temperatur, Feuchtigkeit und Verhinderung der Keimbesiedlung

günstig beeinflussen. Die Vermeidung von mechanischer Belastung ist während des gesamten Wundheilungsprozesses von Bedeutung und wird durch entsprechende Lagerung, abhängig von der Wundlokalisation, schonende Verbandwechsel sowie angepasste Verbandwechselintervalle angestrebt (Scharf & Rüter 2008).

Experimentelle Studien sind vonnöten, um einerseits die pathophysiologischen Prozesse der gestörten Wundheilung besser zu verstehen und um neben der Verbesserung bewährter Therapien neue Angriffspunkte für individualisierte Therapiekonzepte zu finden.

In dieser Entwicklung ist es wichtig, möglichst viele Einflussfaktoren zu detektieren und sie nach ihrer Relevanz für den Heilungsprozess zu selektieren. Einflussfaktoren wie Sauerstoffversorgung und -unterversorgung (Hypoxie) oder Wachstumsfaktoren sind schon seit Jahren Gegenstand vieler standardisierter Modelle, bei denen versucht wird, den Wundheilungsverlauf in vitro möglichst genau zu simulieren oder ihn gezielt zu beeinflussen. Die dort gewonnenen Erkenntnisse sind oftmals besser untereinander vergleichbar und mit geringerem materiellen und finanziellen Aufwand realisierbar als Ergebnisse aus Tiermodellen.

2.2 Wundheilung

2.2.1 Definition und Ätiologie

Der Begriff Wunde wird als ein Verlust der Organintegrität mit Unterbrechung des Zusammenhangs von Körpergeweben mit oder ohne Substanzverlust definiert. Dabei treten Defekte durch exogene oder endogene Störfaktoren am häufigsten am Hautorgan auf (Voggenreiter & Dold 2004, Pschyrembel 259. Auflage).

Es werden Wunden unterschiedlicher Ätiologie unterschieden: Mechanische, thermische, chemische und Strahlenwunden.

Mechanische Wunden entstehen durch äußere, scharfe oder stumpfe Gewalteinwirkungen. Unter scharfen Gewalteinwirkungen entstehen Schnitt-, Stich-, Hieb- oder Bisswunden. Nach stumpfer Gewalteinwirkung entstehen Schürf-, Riss- Quetsch- und Platzwunden sowie Abloderung/Decollement, Pfählung, Schusswunden, Skalpierung und Dekubitus. Verbrennungen, Verbrühungen oder Erfrierungen gelten als thermische Wunden. Zu den chemischen Wunden zählt man Verätzungen durch Säuren, Laugen oder Schädigung durch andere zytotoxische Substanzen. Strahlenwunden kommen durch den Einfluss von Röntgenstrahlen oder radioaktiven Isotopen zustande.

2.2.2 Physiologie der Wundheilung

Definitionsgemäß ist die Wundheilung ein interaktiver Prozess, in dem lösliche Mediatoren, Blutzellen, extrazelluläre Matrix (ECM) und Parenchymzellen zusammenspielen (Voggenreiter & Dold 2004). Ziel ist der körpereigene Verschluss durch weitestgehende Wiederherstellung des Körpergewebes.

Man unterscheidet primäre und sekundäre Wundheilung. Erstere zeichnet sich durch glattrandige, nicht verunreinigte Wunden bei komplikationslosem Wundheilungsverlauf aus. Letztere entwickelt sich bei klaffenden Wunden mit Gewebsdefekt oder bei Wundinfekten und geht in der Regel mit Narbenbildung einher.

Eine Wunde wird als chronisch bezeichnet, wenn sie nicht wunsch- und zeitgerecht heilt oder der Heilungsprozess nicht zu einer strukturellen Integrität führt (Voggenreiter & Dold 2004).

Der Prozess der Wundheilung lässt sich in 4 Phasen einteilen, die nacheinander überlappend durchlaufen werden. Man unterscheidet die Phase der Hämostase, der Inflammation, der Proliferation und der Reparation. Von manchen Autoren werden die hämostatische und die inflammatorische Phase zusammen betrachtet. Im Folgenden werden die Vorgänge dieser vier Phasen detailliert beschrieben:

Hämostase

Mit dem Eintritt der Gewebsläsion kommt es zu einer Verletzung von Blutgefäßen und zur Freisetzung von Blutbestandteilen. Innerhalb der ersten 10 Minuten erfolgt die Blutstillung durch Vasokonstriktion der arteriellen Gefäße und Thrombozytenaggregation. Gleichzeitig setzen die Thrombozytengranula Gerinnungsfaktoren, Histamin, Wachstumsfaktoren und andere Enzyme frei. Die durch die Gewebsverletzung freiliegende Interzellulärmatrix übt zusammen mit den bei der Gerinnungs- und Komplementkaskade freigesetzten Mediatoren einen chemotaktischen Reiz auf einwandernde Leukozyten aus. Der Gewebedefekt wird durch die Ausbildung eines Fibrinnetzes verschlossen. In dem gebildeten Fibringerinnsel bleiben später in die Wunde einwandernde Fibroblasten hängen und tragen so zur Defektauffüllung bei. In der Gerinnungskaskade ebenfalls aktivierte intrinsische Faktoren limitieren die Thrombusbildung (Clark et al. 1985).

Inflammation

In der inflammatorischen oder auch exsudativen Phase, die bis zu 72 h andauert, werden biochemische und zelluläre Prozesse in Gang gesetzt, die die Grundlage für die Heilung einer Wunde darstellen. Weiterhin kommt dieser Phase der körpereigenen Immunabwehr zwecks Beseitigung von Bakterien und Fremdmaterial eine entscheidende Bedeutung zu.

Die Migration (Einwanderung) beginnt mit den neutrophilen Granulozyten, die als erstes bereits nach 1 h Stunde als Vertreter der unspezifischen Immunabwehr in das Wundgebiet einwandern. Sie tragen zum Wunddebridement bei, indem sie Fremdmaterial, nekrotische Zellen und Bakterien phagozytieren. Aufgrund der vermehrten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und Histamin durch Mastzellen kommt es zu einer Gefäßdilatation mit einhergehendem verlangsamten Blutfluss und einer erhöhten Gefäßpermeabilität, was die Granulozytenmigration in die Wunde fördert.

Ab dem 2. Tag erscheinen Monozyten in der Wunde, die durch Bindung an der extrazellulären Matrix aktiviert werden und zu Makrophagen differenzieren. Diese sezernieren im Verlauf neben Wachstumsfaktoren wie TGF- α und - β (Transforming Growth Factor- α und - β), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), CSF (Colony Stimulating Factor) und TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) auch Interleukin-1, -6, -8, -10 und Stickstoffmonoxid (NO). Die Makrophagen spielen daher eine zentrale Rolle beim Übergang zur 2. Phase der Wundheilung, der Proliferationsphase (Clark et al. 1985).

Proliferation

In der Proliferationsphase, auch Granulationsphase genannt, bildet den Ausgangspunkt ein Konglomerat aus Makrophagen, Fibroblasten und vaskulärem Gewebe, umgeben von einer lockeren Matrix aus Kollagen, Fibronectin und Hyaluronsäure. Diese Phase steht hauptsächlich im Zeichen der Auffüllung des entstandenen Gewebedefekts durch Zellvermehrung. Der Begriff Granulationsgewebe leitet sich aus dem lateinischen Wort Granula (Körnchen) ab und beschreibt die hellrote, gepunktete Oberfläche des Gewebes, der die Gefäßbäumchen der aus Endothelzellen formierten Kapillaren zugrunde liegen.

Von den chemotaktischen Mediatoren PDGF, TGF- β 1 und FGF (Fibroblast Growth Factor) angelockt, migrieren Fibroblasten ab dem 2.-3. Tag in die Wunde (Greiling & Clark 1997). Innerhalb von 7-14 Tagen erreicht die Fibroblasten-Dichte ihr Maximum. Fibroblasten schütten nun ihrerseits neben PDGF, TGF- β und FGF auch KGF (Keratinocyte Growth Factor) aus und stimulieren damit die Synthese von ECM. Keratinozyten interagieren mit verschiedenen Bestandteilen der ECM, wie Fibronectin, Vitronectin, Fibrin und Typ I

Kollagen und führen so zur Neubildung der Epidermis (Tsirogianni et al. 2006). Die ECM ist während dieser Phase starken Ab- und Umbauvorgängen unterworfen, welche unter anderem durch Matrixmetalloproteinasen katalysiert werden, die der Steuerung durch Zytokine unterliegen (Voggenreiter & Dold 2004). Die Proteasen Plasmin und Kollagenase schaffen durch den proteolytischen Abbau der Basalmembran die Voraussetzung zur Einwanderung von Endothelzellen und der damit verbundenen Neoangiogenese, welche für die Sauerstoff- und Nährstoff-Versorgung des granulierenden Gewebes unabdingbar ist. In diesem Zusammenhang sind basischer und saurer FGF sowie VEGF als Endothelzell-Stimulatoren zu nennen.

Remodelling

In der 2. Woche beginnt die reparative Phase der Wundheilung, die bis zu 2 Jahre andauern kann. In diesem Abschnitt der Wundheilung stehen die Kollagen-Neubildung und -Ausrichtung zu einem verzweigten, festen Netzwerk im Vordergrund. Fibrin, Fibronectin und weitere Proteine werden dabei schrittweise durch Kollagen ersetzt (Tsirogianni et al. 2006). Fibroblasten differenzieren über die Zwischenstufe der Proto-Myofibroblasten zu Myofibroblasten (MF), die mit ihren kontraktile Filamenten auch zur Wundkontraktion beitragen. Die zweistufige Differenzierung wird sowohl durch mechanischen Stress als auch TGF- β 1 stimuliert (Tomasek et al. 2002).

2.3 Störungen der Wundheilung und Rolle der Zytokine

Die Folgen einer gestörten Wundheilung manifestieren sich klinisch in vielerlei Formen, wobei man hauptsächlich die kleinere Gruppe der chronischen Verlaufsformen, denen ein akutes Trauma oder eine Operationswunde zugrunde liegt, von der größeren Gruppe der chronischen Verlaufsformen unterscheidet, die aufgrund von primären Erkrankungen vorliegen.

Zu der letzteren Gruppe zählen zunächst einmal durch Gefäßerkrankungen hervorgerufene Unterschenkelgeschwüre (Ulcera). Kommt mit der diabetischen Neuropathie zusätzlich eine weitere Erkrankung hinzu, kann sich das sogenannte diabetische Fußsyndrom entwickeln. Der Dekubitus als offene Wunde entwickelt sich durch länger andauernde Druckeinwirkung

an exponierten Körperstellen (oftmals mit persistierender Inflammation assoziiert, die die Heilung erschwert) wie z.B. den Fersen oder der Sakralregion (Scharf & Rüter 2008).

Chemokine werden überwiegend von Gewebezellen und infiltrierenden Leukozyten unter inflammatorischen Bedingungen wie der Wundheilung produziert (Furie & Randolph 1995). Sie werden synonym zu der Gruppe der Zytokine gezählt (Lindley et al. 1993). Die meisten Chemokine bestehen aus vier Cystein-Resten, die über zwei Disulfid-Brücken miteinander gekoppelt sind. Sie werden gemäß der Konfiguration der beiden dem Amino-Terminus nächstgelegenen Cysteine in C-X-C, C-C, C-X₃-C und C Chemokine eingeteilt (Rossi & Zlotnik 2000).

Zu ihren Aufgaben zählt die chemotaktische Anlockung von Leukozyten (Baggiolini 1998, Luster 1998). Zudem werden sie als Angiogenese-regulierende Zytokine angesehen (Belperio et al. 2000), nicht zuletzt durch den Nachweis der Expression durch Endothelzellen (Goebeler et al. 1997), die sie u.a. in ihrer Proliferation und Migration beeinflussen (Li et al. 2005). Darüber hinaus wird ihre Rolle bei diversen Erkrankungen wie Krebs, fibroproliferativen Störungen und ischämischen Herzerkrankungen diskutiert (Keeley et al. 2008)

Zytokine sind von entscheidender Bedeutung für die Regulierung von Wachstum und Differenzierung von Zellen. In der Klinik werden sie als diagnostische Marker verwendet, um Aussagen über Prognose und Verlaufskontrolle von Erkrankungen zu erlauben (Shahzad 2010). Für Weichteilschäden steht ein solches System bisher nicht zur Verfügung.

Interleukin-8 (IL-8) gehört zur Gruppe der C-X-C Chemokine (chemotaktische Zytokine) und hat eine Länge von 5191 Basenpaaren. Sein Gen liegt auf Chromosom 4q12-q21 (Zhang & Chen 2002).

IL-8 wird von diversen Zellen wie zum Beispiel Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet und spielt bei vielen inflammatorischen Erkrankungen eine Rolle. Daher haben wir uns mit IL-8 als einem der Faktoren des Wundheilungsprozesses im Allgemeinen und seinem Auftreten im Zusammenhang mit Fibroblasten und Endothelzellen im Speziellen in der vorliegenden Arbeit befasst. Seine Hauptaufgabe besteht in der chemotaktischen Anlockung von Leukozyten (Baggiolini et al. 1994, Engelhardt 1998). Des Weiteren ist es ein wichtiger Aktivator für neutrophile Granulozyten (Baggiolini et al. 1989, Bickel 1993).

Der klinische Einsatz wird für IL-8 als Marker u.a. bei Blasenkrebs (Koçak et al. 2004), chronischer Prostatitis (Duan & Yang 2005) und nosokomialen bakteriellen Infektionen (Franz et al. 1999, Weitkamp et al. 2002) sowie zur Diagnostik von pulmonalen Infektionen (Rennen et al. 2004) und von Osteomyelitis (Gratz et al. 2001, Bleeker-Rovers et al. 2007) diskutiert.

2.4 In-vitro-Co-Kultur-Wund-Modell im Vergleich

Um auf dem Gebiet der Wundbehandlung im Experiment erfolgreich zu sein, ist es wichtig, die physiologischen Abläufe der Wundheilung möglichst exakt zu imitieren (Kirkpatrick et al. 2002).

Es gibt verschiedene In-vitro-Modelle zur Untersuchung der Wundheilungsprozesse wie Monolayer-Kulturen (Moulin et al. 1996), die aber keine Analysen über Zellinteraktionen zulassen. Weiterhin sind Modelle zu nennen, die mittels Co-Kultivierung Zellinteraktion ermöglichen, die aber bisher nicht mit einem Wundheilungsassay kombiniert sind. Tier-Modelle (Sullivan et al. 2001) ermöglichen zwar im Prinzip eine realitätsnahe Abbildung des Wundheilungsgeschehens, sind aber generell nur zum Teil auf den Menschen übertragbar. Die standardisierte Akquise humaner Wundproben gestaltet sich aufgrund der bereits erwähnten Vielzahl von lokalen und systemischen Faktoren ebenfalls kompliziert.

Die vorliegende Arbeit baut auf Ergebnissen eines bereits standardisierten In-vitro-Co-Kultur-Modells auf (Oberringer et al. 2007). Ziel dieser vorangegangenen Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, mit dem sich die Interaktion von Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen unter Wundbedingungen charakterisieren lässt. Daraus resultierte ein In-vitro-Modell, welches co-kultivierte humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) und normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) mit einem In-vitro-Wundheilungsassay kombiniert (CCSWMA: co-culture scratch-wound migration assay). Die Zellinteraktion wurde in Normoxie und Hypoxie unter den Gesichtspunkten Proliferation, Migration und myofibroblastoider Differenzierung beurteilt. Die Co-Kultivierung ermöglichte eine bessere Simulation der in der Wundheilung vorgegebenen typischen Gegebenheiten auf zellulärer Ebene.

In der aktuellen Arbeit wurde der CCSWMA weiterentwickelt und aus Patientenbiopsien gewonnene humane dermale Wundfibroblasten anstelle der NHDF eingesetzt. Diese Zellen wurden aus chronischen und gut granulierenden Wunden gewonnen, um zu überprüfen, ob sich prinzipiell eine Korrelation der klinisch beobachteten Heilungstendenz einer Wunde mit dem Expressions-, Wachstums- und Differenzierungsverhalten ex vivo und in vitro herstellen lässt.

2.5 Fragestellungen

1. Ist es möglich, auch aus humanen Wunden gewonnene Fibroblasten und humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen zusammen in einem Co-Kultur-Wundmodell zu kultivieren?
2. Sind die Parameter Migration, Proliferation, myofibroblastoide Differenzierung, IL-8-Release und der Vergleich Mono- und Co-kultivierter Wundfibroblasten geeignet, charakteristische Unterschiede von Wundfibroblasten mit unterschiedlicher Herkunft aufzuzeigen?
3. Lassen sich Unterschiede zwischen Wundfibroblasten aus chronischen Wunden (cW) und gut granulierenden Wunden (gG) feststellen?
4. Zeigen Wundfibroblasten aus chronischen Wunden und gut granulierenden Wunden eine unterschiedliche Antwort auf Hypoxie?
5. Spielt das Alter der Patienten eine Rolle?
6. Spielt der Nikotinkonsum der Patienten eine Rolle?
7. Inwieweit lassen sich in vitro gewonnene Erkenntnisse auf natürliche Wundverhältnisse übertragen bzw. lassen sich umgekehrt in vivo vorherrschende Gegebenheiten in vitro reproduzieren?

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Überblick

Ausgangsmaterial der Versuche waren einerseits die aus Patientenproben isolierten Wundfibroblasten (WF), andererseits die von der Firma Promocell erworbenen humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC). Jeder Einzelversuch hatte eine Vorlaufzeit von 15 Tagen, innerhalb derer die WF bis Passage (P) 6 und die HDMEC bis P 7 aus Kryokulturen expandiert wurden. 24 h vor Versuchsbeginn (Tag 0) wurde eine WF-Mono- und eine WF-HDMEC-Co-Kultur auf jeweils 7 Objektträgern angelegt. An Tag 0 erfolgte ein Scratching der In-vitro-Wunden in den Zell-Monolayern. Die ersten beiden Kontrollpräparate von Mono- und Co-Kultur wurden fixiert und von den verbliebenen Präparaten jeweils 6 unter Hypoxie- und unter Normoxie-Bedingungen kultiviert. An Tag 1 wurden 4 Hypoxiepräparate zusammen mit ihren Kontrollen fixiert. Die verbliebenen 2 Objektträger aus der Hypoxie wurden unter Normoxie reoxygeniert und zusammen mit den normoxischen Kontrollen an Versuchstag 2 fixiert (siehe auch Tab. 5).

3.1.2 Wundfibroblasten

3.1.2.1 Patienten-Kollektiv

Insgesamt 14 verschiedene Weichteilschäden wurden nach ihrem klinischen Wundbild und ihrem Heilungsverlauf in 6 chronische Wunden (Gruppe cW) und 8 gut granulierende Wunden (Gruppe gG) eingeteilt (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: *Klassifikation der Wundproben.*

Gruppe ¹	Patienten-Nr.	Geschlecht	Geburts-jahr [Jahre]	Alter bei Entnahme ² [Jahre]	Vorhandensein systemischer Begleiterkrankung ³	Nikotinkonsum
cW	1	m	1949	> 50	ja	ja
	2	m	1966	< 50	-	ja
	3	w	1937	> 50	ja	-
	4	m	1951	> 50	ja	ja
	5	w	1956	< 50	ja	-
	6	w	1937	> 50	ja	-
	n=6	w: n=3 m: n=3		Mittelwert: ~ 55	ja: n=5	ja: n=3
gG	1	m	1943	> 50	-	-
	2	m	1954	> 50	ja	-
	3	w	1959	< 50	ja	ja
	4	w	1943	> 50	ja	-
	5	m	1988	< 50	-	ja
	6	w	1988	< 50	-	-
	7	m	1978	< 50	-	-
	8	m	1971	< 50	-	-
	n=8	w: n=3 m: n=5		Mittelwert: ~ 39	ja: n=3	ja: n=2

¹ = Klassifikation klinisch

² = Lebensalter der Patienten zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme (auf- bzw. abgerundet zur Bildung eines Mittelwerts)

³ = Begleiterkrankungen: mittelgradige Stenose A. femoralis superficialis, akutes Nierenversagen, chronischer Alkoholabusus, Steatosis hepatis, Unterschenkelthrombose, akuter arterieller Gefäßverschluss Unterschenkel, Adipositas per magna, chronisch venöse Insuffizienz, Diabetes mellitus, diabetische Nephropathie, pAVK, arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, Osteomyelitis

3.1.2.2 Gewebe-Entnahme und Zellisolierung

Im Zuge der operativen Wundversorgung wurde Gewebe, das ohnehin entfernt worden wäre für die Studie verwendet. Ein positives Ethikvotum der Ethik-Kommission der Ärzte-Kammer des Saarlandes liegt vor.

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter der sterilen Werkbank ausgeführt. Die Gewebeproben wurden mit einem Skalpell in etwa 1 mm² große Stückchen zerteilt und dann in aufrecht stehenden T25-Kulturflaschen einem Kollegenase-Verdau unterzogen. Über Nacht verblieben die Gewebestücke hierzu unter Standard-Brutschrankbedingungen (37 °C, feuchte Atmosphäre bei 5% CO₂) in 5 ml einer Lösung, die 100 U/ml Kollagenase in Quantum 333-Fibroblastenmedium enthielt. Nach dem Verdau wurden die Stücke mechanisch durch wiederholtes Pipettieren geschert, um eine bestmögliche Separation der Zellen zu erreichen. Im Anschluss an eine Waschung in Medium und einer Zentrifugation bei 1000 U/min erfolgte der Transfer der Zellen und der erhalten gebliebenen Zellverbände in Kulturgefäße.

Anlegen einer Masterzellbank

Die Masterzellbank stellte das Ausgangs-Zellmaterial aller Versuche dar. In ihr lagen die expandierten Wundfibroblasten in einer einheitlichen P4 vor. Ihre Herstellung erfolgte wie folgt:

Nach ihrer Isolierung wurden die WF zunächst in P0 in einer T25-Kulturflasche mit 2 ml Quantum 333-Medium angesetzt. Die Kultivierung erfolgte unter Standard-Brutschrankbedingungen. Die Zellen wurden vor Erreichen der mikroskopisch kontrollierten Konfluenz in Passage P0 unterkultiviert. Dabei vollzog man eine Passagierung auf eine T75-Kulturflasche mit 12 ml Medium. Hierzu wurde der Mediumüberstand dekantiert und der Zellrasen mit 5 ml sterilem PBS zweimal gespült. Anschließend erfolgte die Abtrypsinierung der Wundfibroblasten durch Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA und 3-minütiger Inkubation im Brutschrank. Unter lichtmikroskopischer Sichtkontrolle wurden die abgekugelten Zellen durch leichtes Schlagen mit der flachen Hand an die Kulturflasche abgeklopft, um sie vom Boden der Kulturflaschen abzulösen. Die Zell-Trypsin-Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen abpipettiert und das Trypsin-EDTA durch Zugabe von 3 ml Quantum 333-Medium neutralisiert. Die Abzentrifugation dauerte 3 min, bei 1250 U/min und Raumtemperatur (RT). Nach Abpipettieren des Trypsin-Medium-Überstandes wurde das Zellpelett in 10 ml Quantum 333-Medium resuspendiert und in einer T75-Kulturflasche angesetzt.

Sobald auch in P1 eine ausreichende Konfluenz des Zellrasens erreicht war, folgten weitere Unterkultivierungen bis in P3, die nach dem gleichen Prinzip, aber jeweils mit 10 ml PBS und 5 ml Trypsin-EDTA je T75-Kulturflasche, durchgeführt wurden. In P3 wurden die WF schließlich mittels Kryokonservierung in 1 ml Quantum 333-Medium mit 5%-igem DMSO Zusatz in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt.

Expansion

Am ersten Tag des Experiments erfolgte das Ansetzen der Wundfibroblasten (P4 aus Kryokultur). Dafür wurden die Zellen im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und danach unter der sterilen Werkbank mittels Einmal-Pipette in eine T75-Kulturflasche überführt. Anschließend wurde 1 ml Zell-Suspension durch hinzupipettieren von 9 ml Quantum 333 auf 10 ml verdünnt und die Zellen resuspendiert.

Der Mediumwechsel mit 10 ml Quantum 333-Medium erfolgte am Tag darauf und wurde dann generell jeden 2. Tag bzw. an Tagen nach Unterkultivierungen durchgeführt.

Die erste Unterkultivierung von einer auf drei T75-Kulturflaschen vollzog man am vierten Tag nach Ansetzen der Zellen, die zweite, von Passage 5 auf 6, wurde am 9. Tag durchgeführt (siehe Abb. 1), bevor die Wundfibroblasten am Tag 15 in den eigentlichen Versuch gingen (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Kultivierungsprotokoll Wundfibroblasten.

Kultivierungstag	Prozedur
0	Ansetzen (P4)
1	Mediumwechsel
3	Mediumwechsel
4	Unterkultivierung (P5)
7	Mediumwechsel
9	Unterkultivierung (P6)
10	Mediumwechsel
12	Mediumwechsel
14	Mediumwechsel
15	Ansetzen Mono- u. Co-Kultur

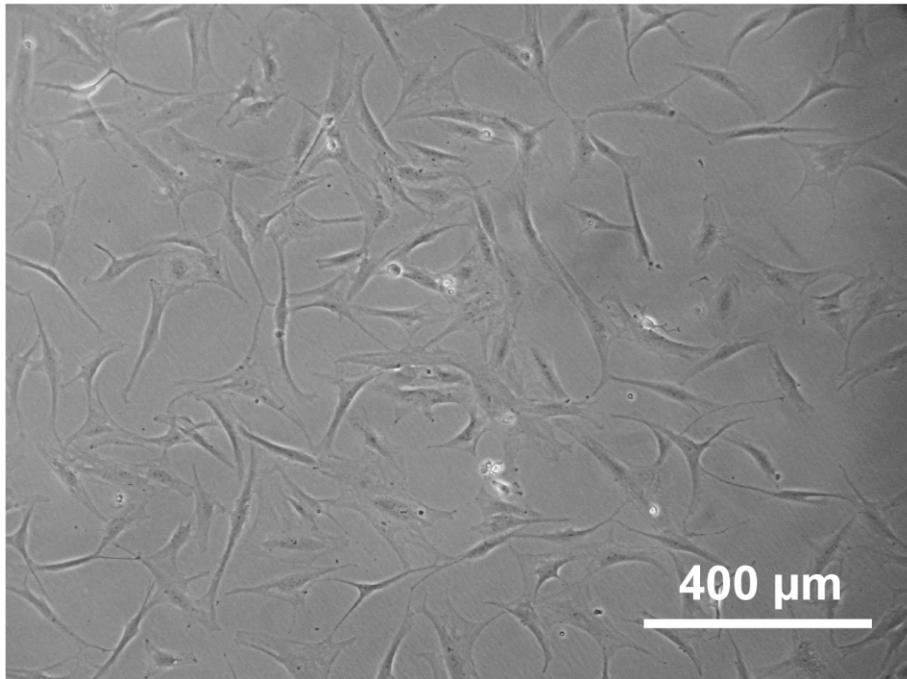


Abbildung 1:
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer Fibroblasten-Kultur an Tag 10.

3.1.3 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen

Anlegen einer MasterZellbank

Die Herstellung einer HDMEC-Masterzellbank erfolgte wie bei den WF zur Schaffung einer einheitlichen Passage des Ausgangszellmaterials. Mediumwechsel mit Endothelzellmedium und Unterkultivierungen (siehe Tab. 3) erfolgten nach den unter 3.1.2.2 beschriebenen Prinzipien.

Tabelle 3: Kultivierungsprotokoll Masterzellbank HDMEC.

Kultivierungstag	Prozedur
0	Ansetzen (P2)
1	Mediumwechsel
3	Unterkultivierung (P3)
6	Mediumwechsel
8	Unterkultivierung (P4)
10	Unterkultivierung (P5)
14	Mediumwechsel
16	12 Kryokulturen (P6)

Anlegen der HDMEC-Kulturen

Im Gegensatz zu den WF wurden die Kryokulturen der HDMEC erst 8 Tage vor dem eigentlichen Versuch angesetzt (siehe Abb. 2).

Tabelle 4: Kultivierungsprotokoll HDMEC.

Kultivierungstag	Prozedur
0	Ansetzen (P6)
1	Mediumwechsel
3	Unterkultivierung (P7)
4	Mediumwechsel
7	Mediumwechsel
8	Ansetzen in Co-Kultur

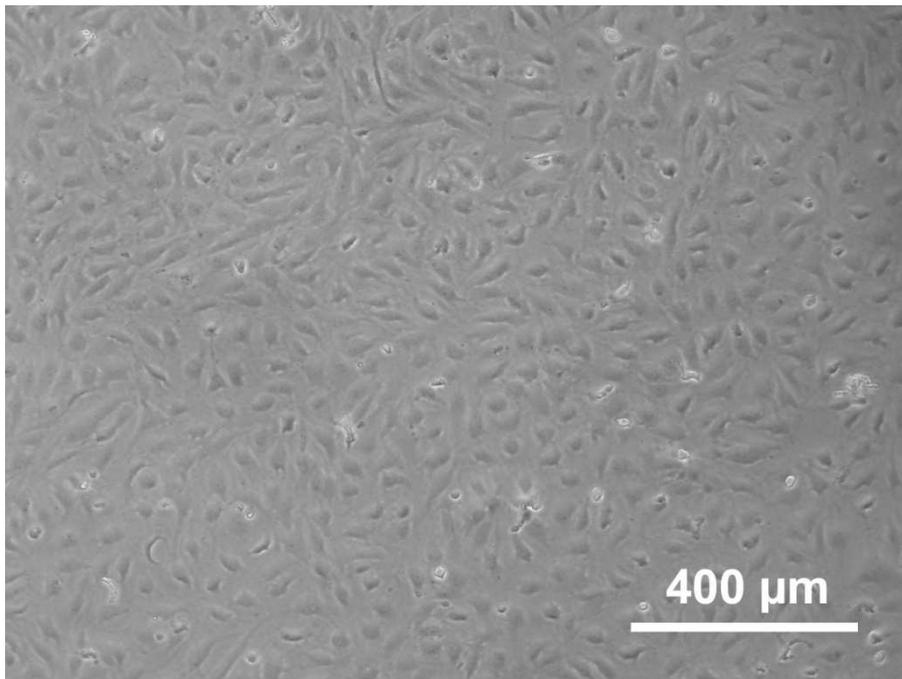


Abbildung 2:
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer konfluenten HDMEC-Kultur an Tag 7.

3.1.4 Versuchsdurchführung

Das Ausgangs-Material bildeten zwei T75-Kulturflaschen einer WF-Kultur der P6 und zwei T75-Kulturflaschen HDMEC der P7. Die vier Kulturen wurden einen Tag vor dem eigentlichen Versuchsbeginn auf insgesamt zehn Objektträger in QuadriPerm-Schalen ausgesät. Eine Kulturflasche einer WF-Kultur kam auf fünf Objektträger und bildete die Mono-Kultur. Die zweite WF-Kulturflasche und die beiden HDMEC-Kulturflaschen wurden zusammen ebenfalls auf fünf Objektträger ausgesät und bildeten die Co-Kultur. (siehe Tab. 5). Es wurden je 5 ml eines 3:1 Mediumgemischs (3 Teile Endothellzellmedium und 1 Teil Quantum 333-Medium) hinzugegeben und die insgesamt 10 Objektträger daraufhin in den Brutschrank unter Standardbedingungen eingestellt.

Nach 24 h (T0) wurden mit einer 1000 µl-Pipetten-Spitze auf jedem Objektträger je zwei Wundspalte manuell induziert, was lichtmikroskopisch kontrolliert wurde (siehe Abb.4 und 5). Der Zeitpunkt des Setzens der Wundspalte markierte gleichzeitig den Startzeitpunkt des Versuchs. Vor der Fixierung eines jeden Präparates wurde je zwei mal 1 ml Medium gesammelt und bei -80°C gelagert, um den Release von IL-8 pro Zelle mittels eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zu quantifizieren.

Die erste Probe (T0K) wurde direkt nach dem Induzieren der Wundspalte fixiert, um die Ausgangsparameter zu determinieren. Die nächsten 24 h wurden jeweils 4 Präparate (T1H, T2H/R) in einer Hypoxiekammer (siehe 3.1.5; Abb. 3) im Brutschrank bei einer Medium-Sauerstoffsättigung von ≤ 5 mmHg kultiviert. Die Inkubation der anderen 4 Präparate (T1K, T2K) erfolgte unter normoxischen Bedingungen.

Tags darauf wurden 2 Hypoxie-Präparate und ihre 2 Kontrollen fixiert, die verbleibenden 4 Objektträger reoxygeniert bzw. unter Normoxie weiterkultiviert.

Nach Ablauf von weiteren 24 h erfolgte schließlich die Fixierung der Hypoxie-Reoxygenierungs-Präparate (T2H/R) und ihrer beiden Kontrollen.

Die Fixierung der Präparate lief folgendermaßen ab: Nach Abpipettieren des Mediumüberstandes erfolgte das zweimalige Spülen mit PBS. Daraufhin wurden die Objektträger für 5 min bei 37 °C mit 0,05 M Kaliumchlorid versetzt. Die hypotone Flüssigkeit führt zu einem Anschwellen der Zellen, was diese für die Antikörperaufnahme während der später folgenden Immunfärbung zugänglicher macht. Anschließend wurden die Präparate während einer 10-minütigen Verweildauer in -20°C kaltem Methanol fixiert. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur markierte die Eindeckung der Objektträger mit einem Glycerol-PBS-Gemisch (9+1) den letzten Schritt, bevor die Präparate bei 4°C bis zur Immunfärbung im Kühlschrank gelagert wurden.

Tabelle 5: Präparate eines Versuchs in Mono- u. Co-Kultur und ihre Fixierungszeitpunkte (KF: Kulturflasche, OT: Objektträger).

	-24h	0 h	24 h	48 h
MK	1x T75 KF WF	OT1: Start (T0K)	OT2: Normoxie (T1K) OT3: Hypoxie (T1H)	OT4: Normoxie (T2K) OT5: Reoxygenierung (T2H/R)
CK	1x T75 KF WF 2xT75 KF HDMEC	OT6: Start (T0K)	OT7: Normoxie (T1K) OT8: Hypoxie (T1H)	OT9: Normoxie (T2K) OT10: Reoxygenierung (T2H/R)

3.1.5 In-vitro-Hypoxie

Die Hypoxiekammer (perfundierbare Plexiglasbox), in welche die Hypoxiekulturen für 24 h gestellt wurden, befand sich im Brutschrank bei 37°C. Die Zufuhr mit einem Gemisch aus 95% N₂ und 5% CO₂ führte bei einem Durchfluss von 1 l/h nach 120 min zu stabilen Hypoxiebedingungen von ≤ 5 mmHg O₂ im Medium.

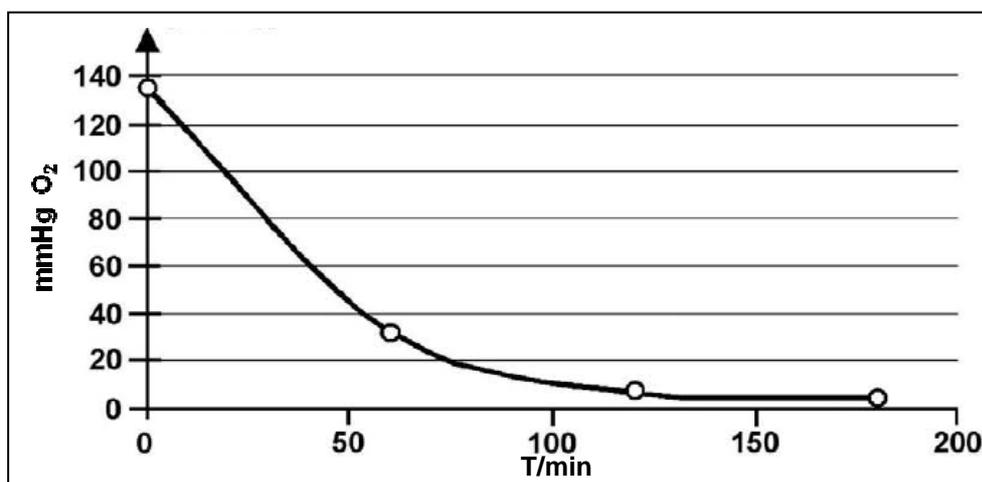


Abbildung 3:

Sauerstoffgehalt im Kulturmedium in der Hypoxiekammer bei einem Gasfluß von 1 l/min, gemessen mit einer Lycox-Sonde.

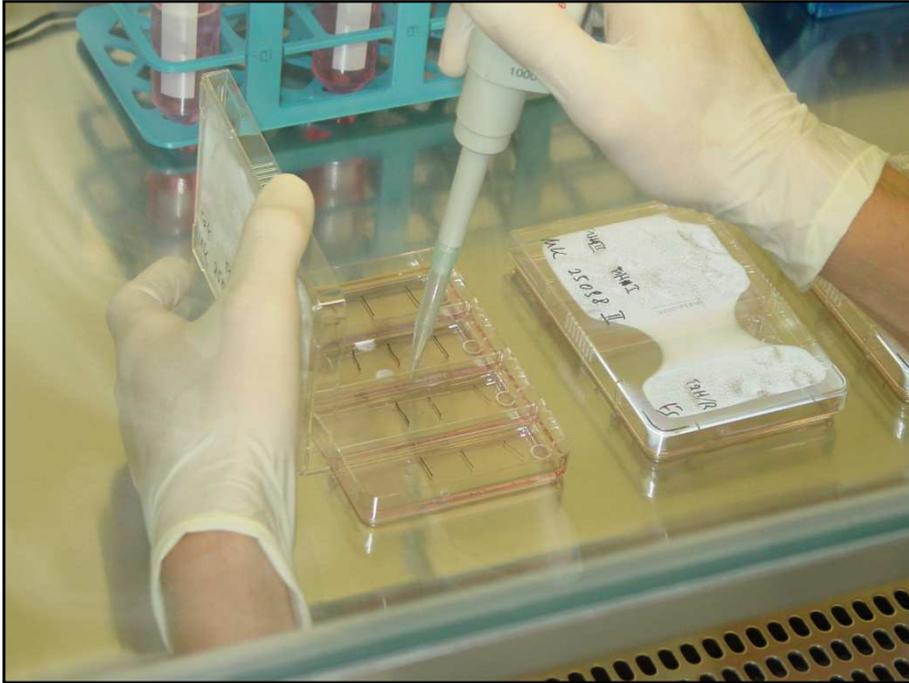


Abbildung 4:
Herstellung der In-vitro-Wunden: Scratching des Monolayers mit der Pipettenspitze.

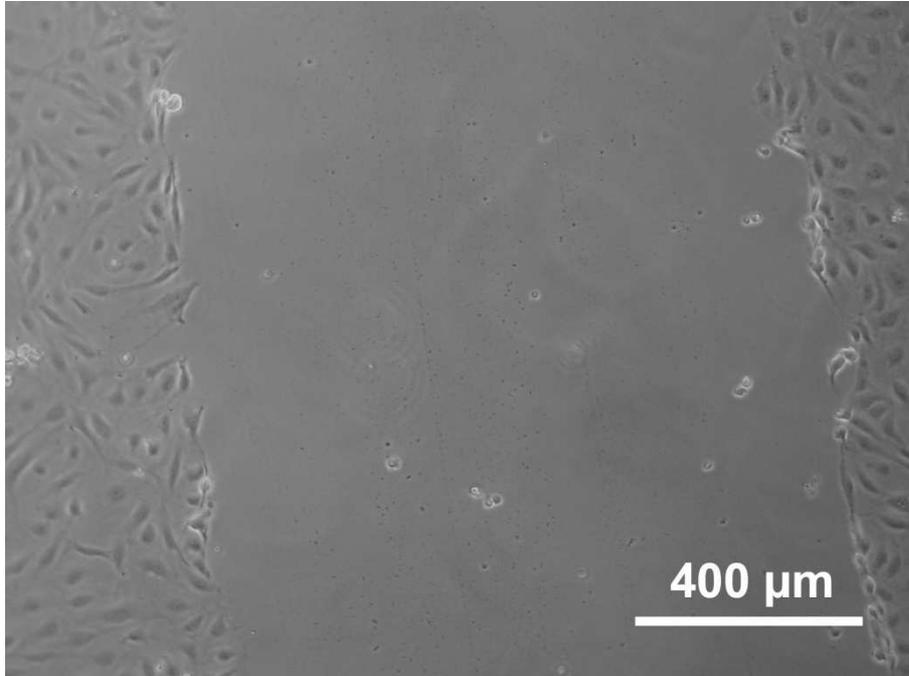


Abbildung 5:
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme des initialen Spalts einer Co-Kultur (T0K).

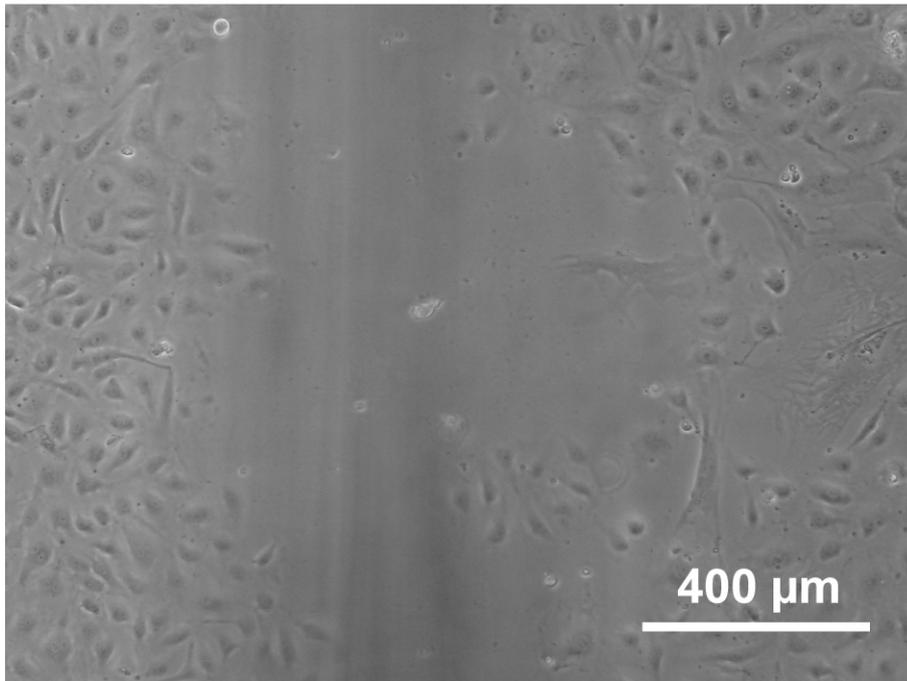


Abbildung 6:
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der Besiedelung des Spalts nach 24 h in Co-Kultur (T1K).

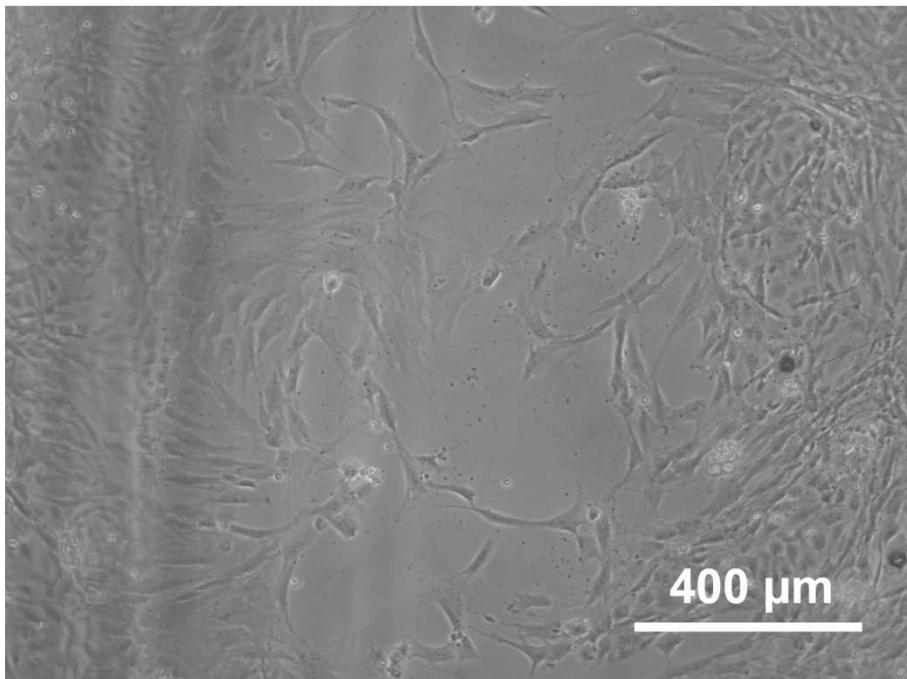


Abbildung 7:
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der Besiedelung des Spalts nach 48 h in Co-Kultur (T2K).

3.2 Immunfluoreszenzfärbung

3.2.1 Grundprinzip der Immunfärbung

Bei einer immunzytochemischen Färbung können Antigene, die für bestimmte Zelltypen charakteristisch sind, mittels spezifisch an diese bindenden Antikörpern (Primär-Antikörper) detektiert werden. Im vorliegenden Fall wurden diese Bindungen durch einen zweiten, sogenannten sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen, der an den primären Antikörper bindet (Sandwich-Technik).

Im ersten Schritt der Färbeprozedur werden die Zellen mit dem primären, z.B. von der Maus stammenden, spezifischen Antikörper, inkubiert. Alle nicht an entsprechende Antigene gebundenen Antikörper werden im folgenden Waschvorgang ausgewaschen. Im zweiten Schritt erfolgt die Bindung des sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers mit Spezifität für den Primärantikörper an den Fc-Teil des Letztgenannten. Nach Inkubation und Waschung wird der an die Proteine gebundene fluoreszierende Farbstoff unter dem Fluoreszenzmikroskop angeregt und die zugehörigen Zellen werden dadurch sicht- und identifizierbar.

3.2.2 Färbe-Protokoll

Es wurden jeweils 10 Objektträger gleichzeitig, ein kompletter Versuch (siehe 3.1.4), während einer Prozedur gefärbt. Mono- und Co-Kultur wurden dabei nach dem gleichen Procedere gefärbt.

Zunächst mussten die Deckgläser von den Objektträgern vorsichtig entfernt werden. Daraufhin folgte ein Waschschritt von jeweils 3 mal 5 min mit PBS/0,5% Tween in einer Färbeküvette, der im Folgenden nach jeder Antikörpergabe und anschließenden Inkubation wiederholt wurde. Während jedes Waschgangs wurde parallel jeweils der Antikörper für den nächsten Inkubationsschritt vorbereitet, indem er mit PBS/0,1% BSA entsprechend der Vorgabe verdünnt wurde. Jedes Deckglas wurde jeweils mit 65 µl verdünntem Antikörper betropft, kleine Deckgläser, die für das geteilte Färbefeld (siehe Abb. 8) verwendet wurden, mit jeweils 15 µl. Die Primärantikörper Von-Willebrand-Faktor (vWF, aus Kaninchen) und α -Smooth-Muscle-Actin (aus Maus), sowie der Proliferationsmarker MIB (aus Maus) wurden im jeweils darauf folgenden Färbeschritt durch die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, Goat-anti-rabbit und Goat-anti-mouse detektiert (siehe Abb. 8). Die Inkubationsdauer betrug je nach Antikörper 30-45 min und erfolgte in einer feuchten, abgedunkelten Kammer bei RT.

Nach der letzten Antikörpergabe und Waschung wurden die Zellen für 5 min in 4%-iger PAF/PBS-Lösung unter Schütteln eingestellt, was zur lokalen Fixierung der Antikörper diente. Es schloss sich eine letzte 3-malige Waschung an, bevor die Zellen mittels einer aufsteigenden Alkohol-Reihe dehydriert wurden. Dabei verweilten die zehn Objektträger nacheinander in Küvetten mit 70%-igem, 80%-igem und 90%-igem Ethanol jeweils 5 min. Nach dem Lufttrocknen deckte man die Präparate mit Eindeckmedium mit DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)-Zusatz ein und lagerte sie bis zur mikroskopischen Auswertung im Kühlschrank.

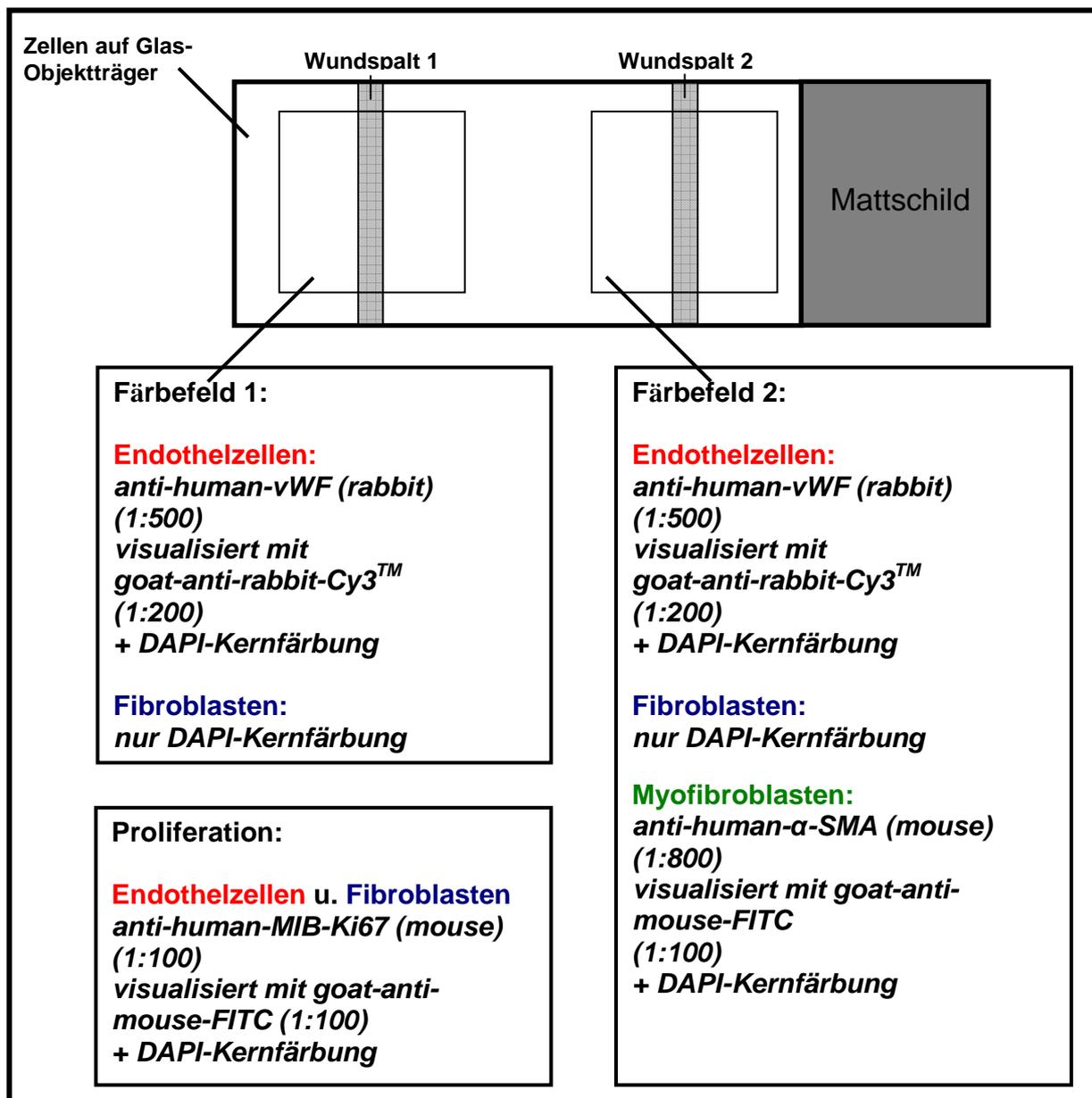


Abbildung 8:

Schematische Darstellung der Färbefelder und verwendeten Antikörper und Verdünnungen.

3.2.3 Primärantikörper

3.2.3.1 Von-Willebrand-Faktor

Von-Willebrand-Faktor ist ein Glycoprotein, das von Endothelzellen in der Intima von Blutgefäßen und von Megakaryozyten gebildet wird und in den sogenannten „Weibel-Palade-Bodies“ intrazellulär gespeichert wird (Pannekoek & Voorberg 1989, Fernandez et al. 1982). Weiterhin tritt es im Plasma (extrazellulär) und in Thrombozyten auf. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, indem es sowohl die Anheftung von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand, als auch die Plättchen-Aggregation ermöglicht (Sakariassen et al. 1979). Darüber hinaus stellt es das Trägerprotein für Faktor VIII und einen Co-Faktor für Faktor IX in der Gerinnungskaskade dar (Weiss et al. 1977, Brinkhous et al. 1985). Defekte oder Mutationen im Von-Willebrand-Gen führen zu erhöhter Blutungsneigung, der sogenannten Von-Willebrand-Krankheit. Mit dem anti-humanen vWF-Antikörper lassen sich Endothelzellen sichtbar machen und somit von Fibroblasten und MF unterscheiden. Der rot-fluoreszierende Sekundärantikörper goat-anti-rabbit-Cy3TM macht durch Kopplung an den vWF-Primär-Antikörper die Endothelzellen sichtbar (siehe Abb. 9, 11).

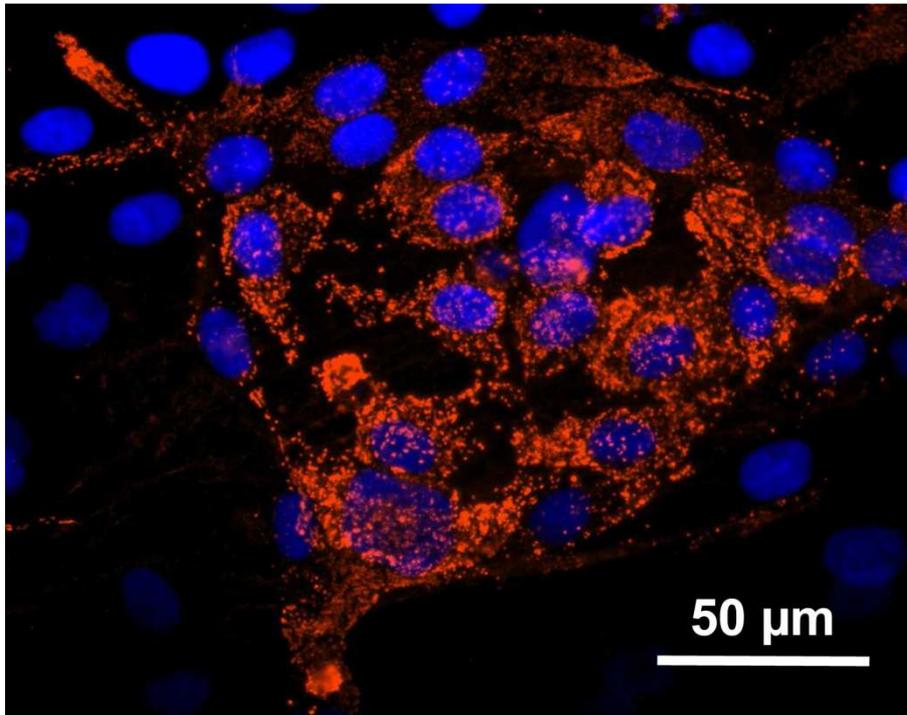


Abbildung 9:

In Form eines Clusters angeordnete HDMEC, detektiert mit einem anti-humanen von-Willebrand-Faktor-Antikörper (rabbit) und visualisiert mit einem goat-anti-rabbit-Cy3-Antikörper (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt.

3.2.3.2 α -Smooth-Muscle-Actin

α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMA) ist die alpha-Isoform des Proteins Aktin, welches in glatten Muskelzellen (Gown et al. 1985) und in einigen Stamm- und Vorläuferzellen (Kinner et al. 2002) vorkommt. Weiterhin wurde es in Perizyten von Blutgefäßen, in der intestinalen Muscularis Mukosae und in Myoepithelzellen von Brust- und Speichelzellen nachgewiesen (Mukai et al. 1981). In Skelett- und Herzmuskelzellen treten andere Isoformen auf (Gown et al. 1985). Da das α -SMA-Protein auch von MF exprimiert wird, lässt sich dieser Zelltyp mit dem entsprechenden Antikörper nachweisen (Desmouliere & Gabbiani 1994).

Der grün-fluoreszierende Sekundärantikörper Goat-anti-mouse (GAM)-FITC detektiert den anti-human- α -SMA-Antikörper und ermöglicht somit die Darstellung der MF (siehe Abb. 10,11).

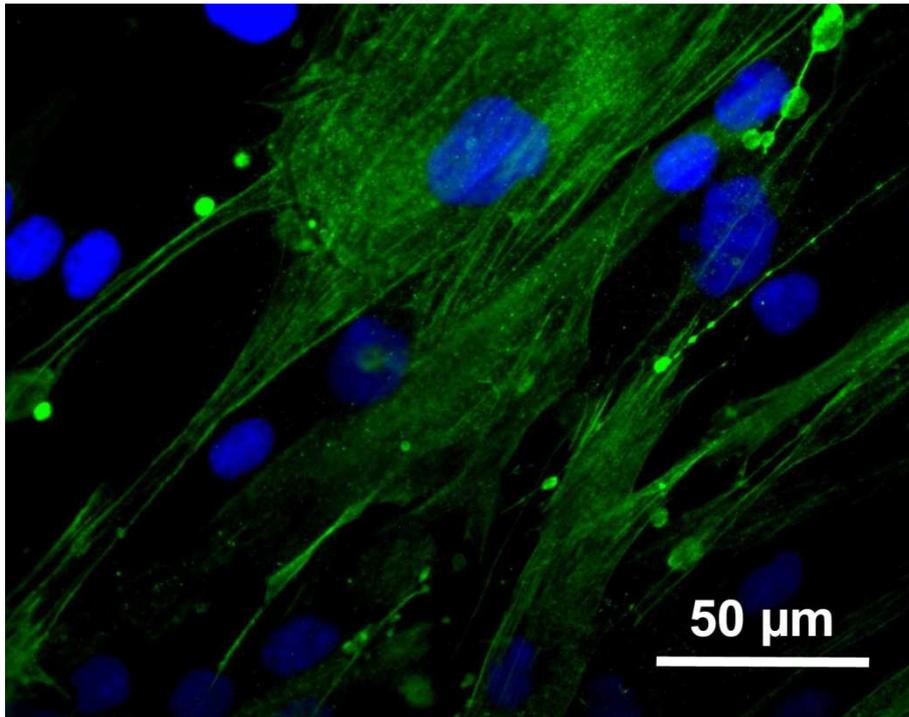


Abbildung 10:
Darstellung von MF, detektiert mit einem anti-human- α -Smooth-Muscle-Actin-Antikörper (mouse) und visualisiert mit goat-anti-mouse-FITC-Antikörper (grün). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt.

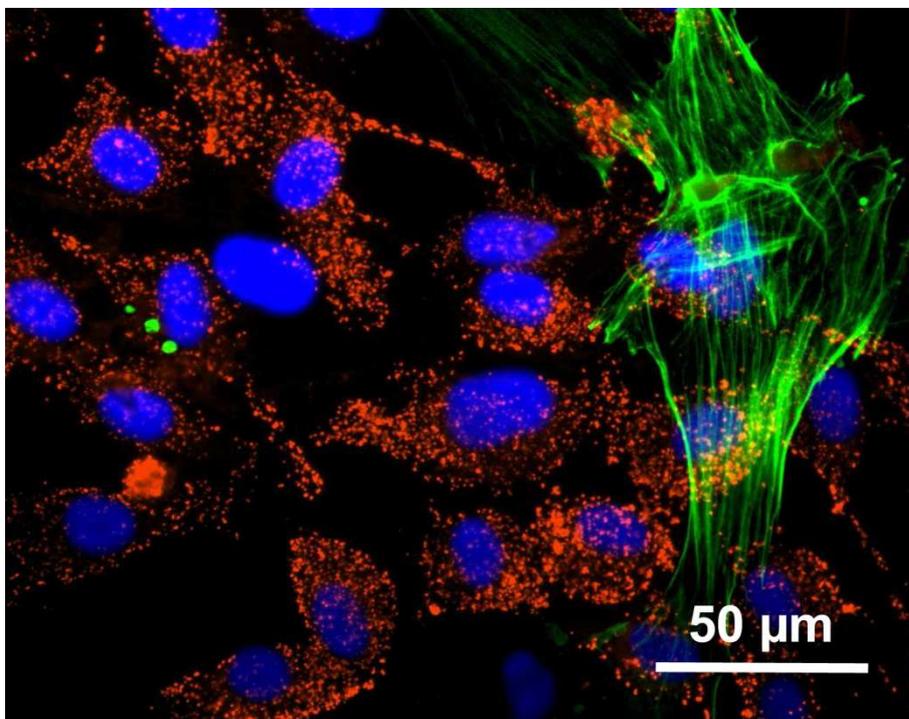


Abbildung 11:
Ausschnitt einer Co-Kultur: MF zeigen α -SMA (grün), HDMEC zeigen vWF (rot). Fibroblasten zeigen nur die Blau-Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

3.2.3.3 Ki67

Das Ki67-Antigen wird in Diagnostik und Forschung als Zellproliferationsmarker vor allem bei Tumorerkrankungen verwendet. Es handelt sich um ein Antigen mit einem Molekulargewicht von 320-359 kDa (Schluter et al. 1993), das im Zellkern nur in der G₁-, S- und G₂-Phase des Zellzyklus und während der Zellteilung exprimiert wird, nicht aber in der Ruhephase G₀ (Gerdes et al. 1984, 2000). Die Sichtbarmachung dieses Antigens lässt Rückschlüsse auf die Aktivität der Zellen zu (siehe Abb. 12). Das Ki67-Antigen wird durch den MIB (Molecular Immunology Borstel)-1-Antikörper detektiert (Cross 2002).

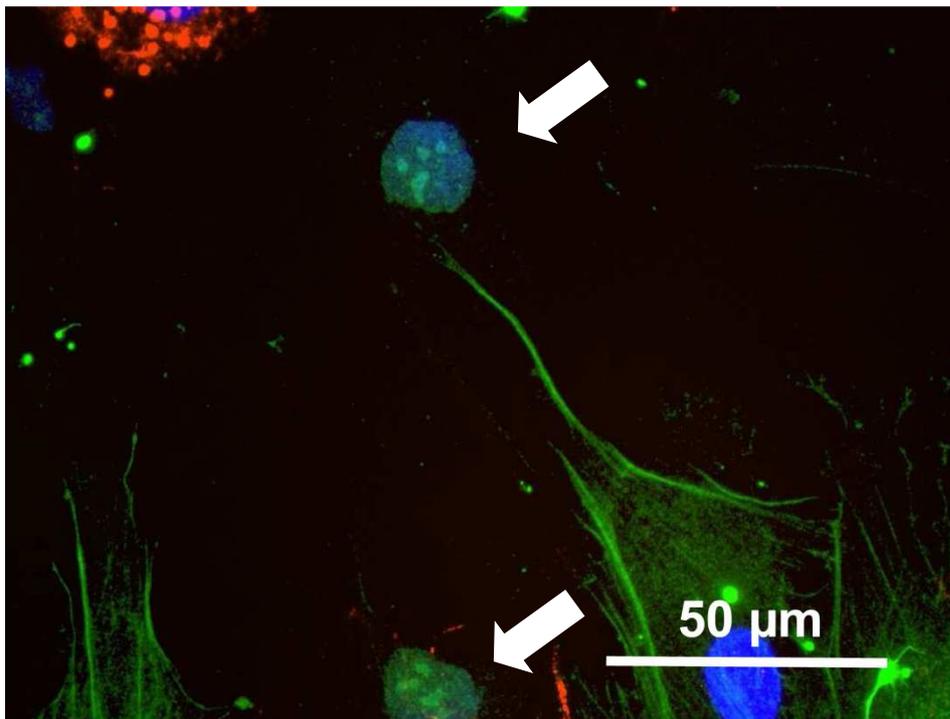


Abbildung 12:

Zwei MIB-positive Fibroblasten-Zellkerne (Pfeile), detektiert mit einem anti-human-MIB-Ki67-Antikörper (mouse) und visualisiert mit einem goat-anti-mouse-FITC-Antikörper (grün). Im Überlappungsbereich der Färbefelder Blau-Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

3.2.4 Interleukin-8-Immunoassay

3.2.4.1 Prinzip

Der Nachweis von spezifischen Antigenen, Antikörpern und Haptenen kann mittels ELISA geführt werden.

Dieser Assay macht sich die sogenannte Sandwich-Technik zunutze, bei der ein Antikörper, in diesem Fall ein für IL-8-spezifischer Antikörper, fest an eine Mikrotiterplatte gebunden ist. Nach Inkubation mit einem im Überschuss vorliegenden Antigen und anschließendem Auswaschen des Überstandes wird ein zweiter Enzym-markierter-Antikörper hinzugegeben, der an ein weiteres Epitop des Antigens bindet und somit zu einem Sandwichkomplex führt. Nach Zugabe eines chromogenen Substrates, welches durch das Enzym umgesetzt wird, kann photometrisch quantifiziert werden.

3.2.4.2 Quantifizierung von Interleukin-8

Mittels ELISA wurde die IL-8-Konzentration im Zellüberstand bestimmt, um potenzielle Unterschiede zwischen den zwei Gruppen und zwischen Kontroll- und Hypoxie-Gruppen aufzuzeigen.

Die Standards zur Erstellung der Eichkurve und die Proben wurden auf eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert, deren Oberfläche mit monoklonalen rabbit-anti-human-IL-8-Antikörpern beschichtet war. Die Kammern wurden mit jeweils 50 µl Medium der verschiedenen Kulturen befüllt. Nach 2-stündiger Inkubation und 4-maligem Waschen mit einem verdünnten Waschpuffer erfolgte die Zugabe eines zweiten, an Meerrettichperoxidase gekoppelten, Antikörpers gegen IL-8. Im Anschluss an eine 1-stündige Inkubation und einem weiteren Waschvorgang wurde die Mikrotiterplatte mit Tetramethylbenzidin inkubiert, das als Substrat für die Farbreaktion diente. Im letzten Schritt wurde die Farbreaktion durch Zugabe von jeweils 200 µl Schwefelsäure gestoppt und die Absorption im Photometer bei 450 nm bestimmt. Die dabei gemessene Extinktion ist proportional zur IL-8-Konzentration im Zellüberstand. Die Ergebnisse werden ausgedrückt als IL-8-Release pro Zelle, da die Zellzahlen aus der mikroskopischen Auswertung bekannt sind.

3.3 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

3.3.1 Aufbau des Fluoreszenzmikroskops

Die Auswertung der Präparate wurde an einem Axioskop 2 plus (Zeiss) durchgeführt (siehe Abb. 13). Ausgehend von der Lichtquelle des Mikroskops, einer Quecksilberdampf-Hochdrucklampe, trifft der Lichtstrahl auf einen Anregungsfilter und danach auf einen dichroischen Teilerspiegel, der den Strahl um 90° ablenkt (siehe Abb. 14). Das Licht tritt durch das Objektiv hindurch und trifft auf die fluoreszierende Probe. Dadurch werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren Licht, das wiederum durch den dichroischen Spiegel fällt. Die Funktion dieses Spiegels besteht darin, das kurzwellige Licht zu reflektieren und nur das langwellige Emissionslicht hindurch zu lassen.

Der dichroische Spiegel ist Teil des Filterwürfels, zu dem auch der Anregungsfilter und der Emissionsfilter gehören. Für bestimmte Anregungs- und Emissionswellenbereiche eines Fluoreszenzfarbstoffs gibt es jeweils einen spezifischen Filterwürfel.

Durch das Okular wird das Bild nochmal zehnfach vergrößert, bevor es das Auge des Betrachters erreicht. Die AxioCam (Zeiss), eine Mikroskop-spezifische Kamera, kann bei Bedarf angeschlossen werden, um das Bild auf das Bildbearbeitungsprogramm AxioVision zu übertragen.

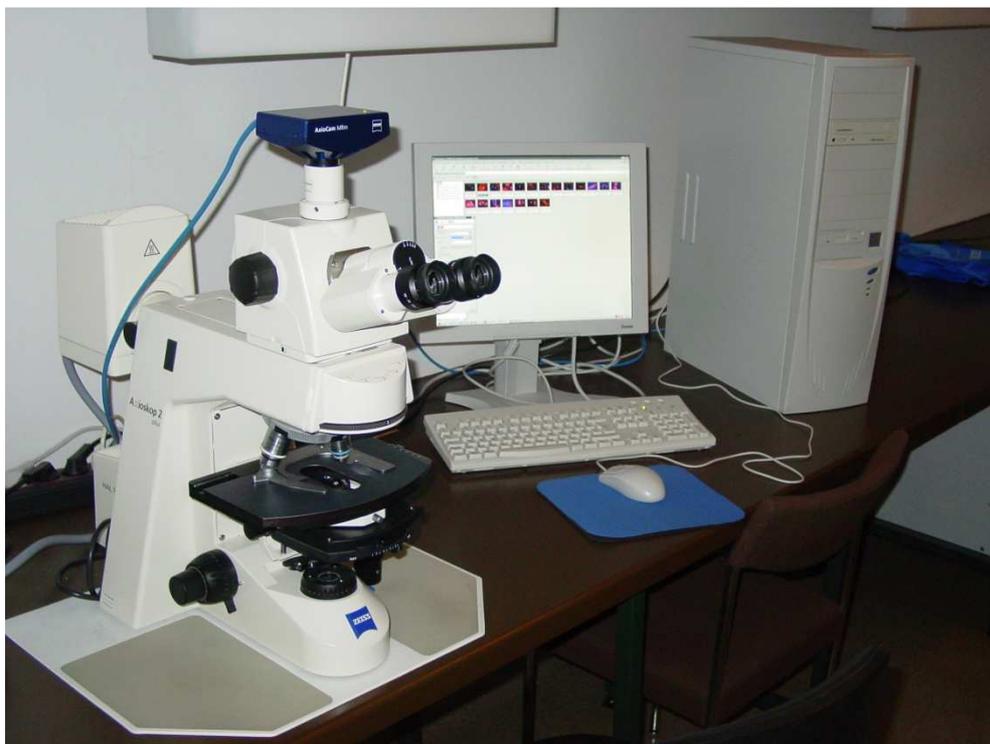


Abbildung 13:

Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 Plus (Zeiss) mit PC zur Bildbearbeitung.

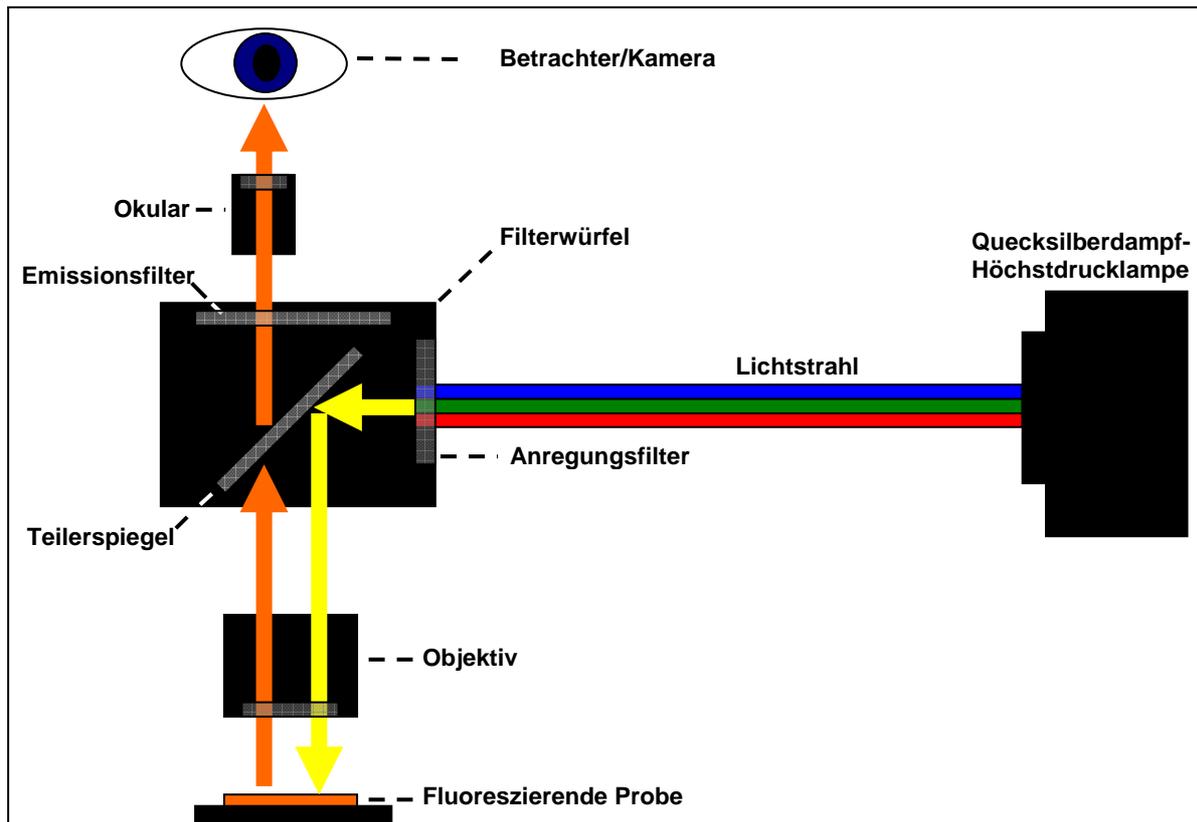


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines Fluoreszenzmikroskops.

3.3.2 Auswertung

Jeder Objektträger wurde nach einem standardisierten Schema unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die dort erhobenen Daten wurden gemittelt und später in der statistischen Auswertung verwendet (siehe 3.4). Die mikroskopische Auswertung der Gesamtzellzahl und der quantitativen Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen erfolgte unter 400-facher Vergrößerung. Dabei wurden insgesamt 20 Gesichtsfelder in 4 definierten Kolumnen mit jeweils 5 Feldern ausgezählt, um die Zellzahl pro mm^2 zu berechnen.

Der Anteil der Fibroblasten-, MF- und Endothelzell-Population an der Gesamtpopulation in % wurde durch das Zählen von mindestens 800 Zellen in 4 definierten Kolumnen des Objektträgers ermittelt. Hier ergab sich die Anzahl der Fibroblasten rechnerisch als Differenz von Gesamtzellzahl zu der Summe aus MF und Endothelzellen. Die Identifizierung der MIB-positiven Zellen wurde unter 1000-facher Vergrößerung in ebenfalls 4 Kolumnen zu mindestens 600 Zellen durchgeführt.

Die Vermessung der Spaltbreite der Wundspalte wurde unter 100-facher Vergrößerung mit Hilfe des Computerprogramms AxioVision durchgeführt (siehe Abb. 15). Die Messung an 10 verschiedenen Messpunkten erfolgte jeweils auf Höhe der 300 μm -Linie im Bild und

gewährleistete so standardisierte Abstandsintervalle von der Höhe eines Gesichtsfeldes zwischen den einzelnen Messpunkten.

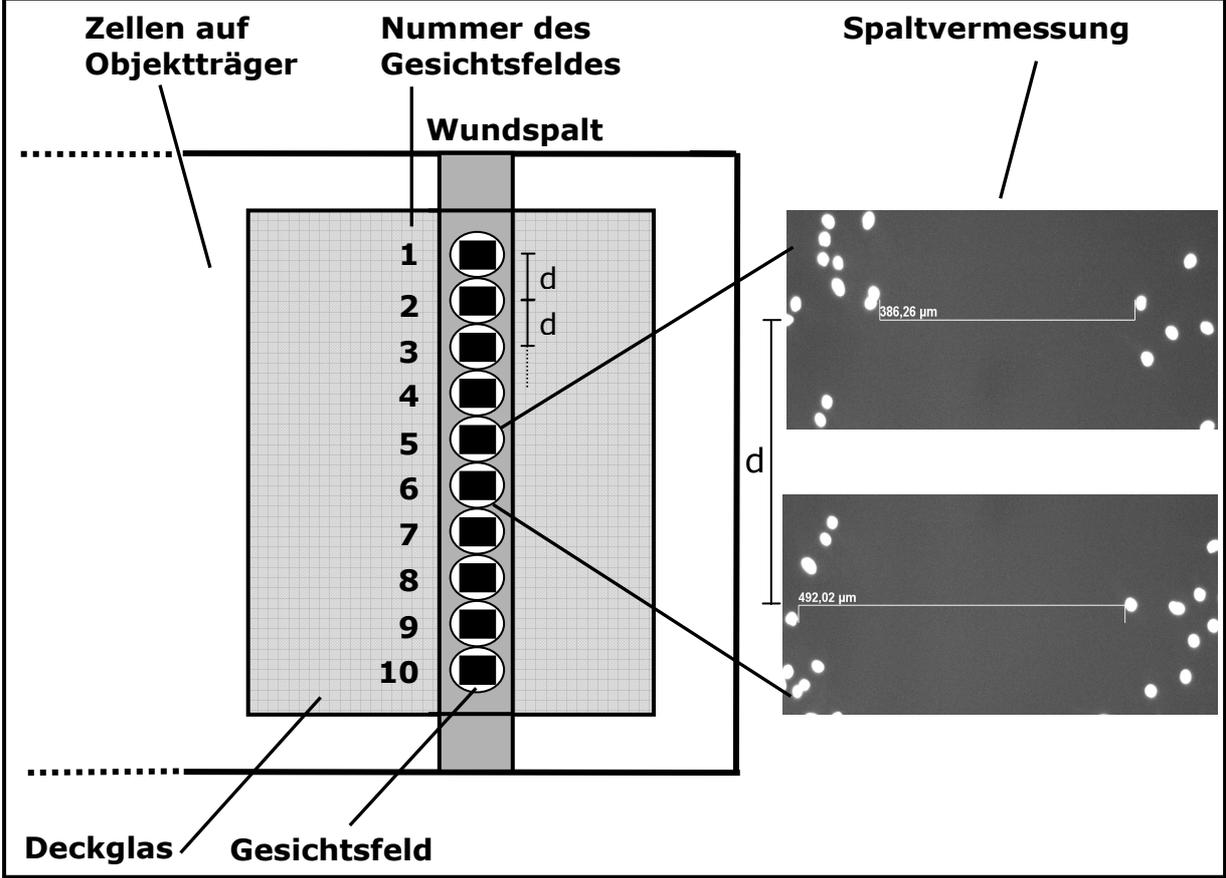


Abbildung 15:
Standardisierte mikroskopische Wundspaltvermessung mittels AxioVision.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung bezog sich auf die Unterschiede im Spaltschluss der In-vitro-Wunden, der Zelldichte, des Proliferationsmarkers MIB, der Generationszeit, des MF-Anteils, des Endothelzell-Anteils und der Interleukin-8-Konzentration zwischen Normoxie- und Hypoxie-Gruppen und zwischen den chronischen und gut granulierenden Wunden.

Die Berechnung der Generationszeit (Zeit, die eine Zellkultur benötigt, um ihre Zellzahl zu verdoppeln) erfolgte mit folgender Formel:

$$t_g = \frac{\log 2 \times t}{\log N - \log N_0}$$

t_g = Generationszeit in h

t = Dauer der Kultur zum Ablesezeitpunkt in h

N = Gesamtzellzahl nach t

N_0 = Ausgangszellzahl

Die Unterschiede der Mittelwerte wurden mittels ANOVA (Varianzanalyse) und anschließender Holm-Sidak-Methode auf Signifikanz überprüft.

Die Ergebnisse sind alle als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung dargestellt. Die Ergebnisse wurden bei $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Spaltschluss

Der Parameter Spaltschluss lieferte gemäß dem Versuchsschema (3.1.4) Erkenntnisse über das Migrationsverhalten der Wundfibroblasten in chronischen und gut granulierenden Wunden in Mono- und Co-Kultur.

4.1.1 Chronische Wunden

4.1.1.1 Mono-Kultur

Die prozentuale Abnahme der Spaltbreite in der Fibroblasten-Mono-Kultur bei chronischen Wunden zeigte signifikante Unterschiede zwischen hypoxischen und normoxischen Bedingungen (siehe Abb. 16). So nahm die Spaltbreite in Normoxie nach 24 h um 35% ab, während sie sich in Hypoxie nur um 9% verringerte. Nach 48 h reduzierte sich die Spaltbreite in Normoxie um 66% und in Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung um 34%.

4.1.1.2 Co-Kultur

In Co-Kultur zeigte sich bezüglich des Einflusses der Hypoxie auf die Abnahme der Spaltbreite in etwas abgeschwächter Form die gleiche Tendenz (siehe Abb. 16). In Normoxie verringerte sich die Spaltbreite um 32% nach 24 h und um 66% nach 48 h, in Hypoxie und nach Reoxygenierung entsprechend um 24% und um 36%.

4.1.1.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

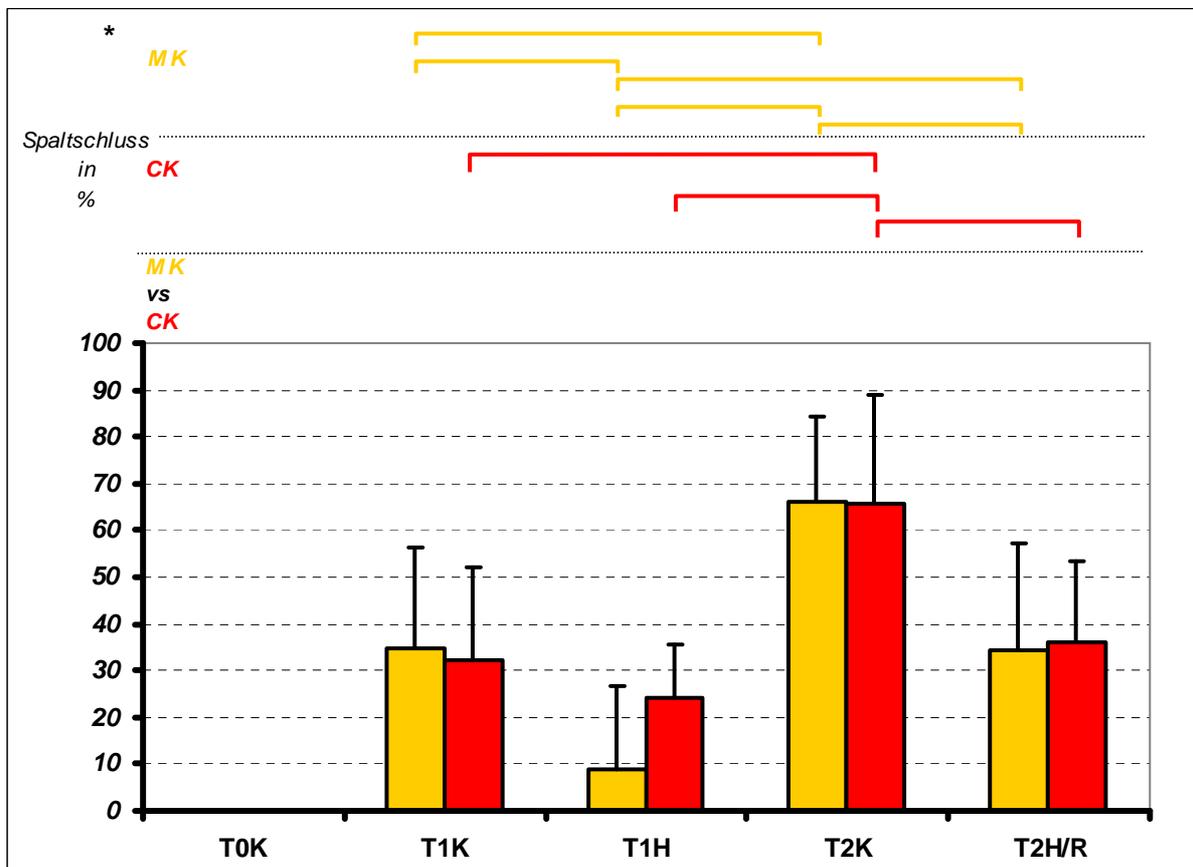


Abbildung 16: Spaltschluss der Mono- und Co-Kulturen aus chronischen Wunden (cW)

Prozentuale Abnahme der Spaltbreite in % der initialen Spaltgröße (T0K) der In-vitro-Wunden von Mono- (■, n=6) und Co-Kulturen (■, n=6) nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

Im Vergleich der Kulturen fällt die geringere, wenn auch nicht signifikante Migrationshemmung der Co-Kultur unter Hypoxie (T1H) auf (siehe Abb.16). Ansonsten unterscheidet sich die Migration in Mono- und Co-Kultur in der Gruppe der chronischen Wunden praktisch nicht.

4.1.2 Gut granulierende Wunden

4.1.2.1 Mono-Kultur

Die Migration in Mono-Kultur in der Gruppe der gut granulierenden Wunden zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen hypoxischen und normoxischen Bedingungen (siehe Abb. 17). Die Spaltbreite nahm in Normoxie nach 24 h um 48% ab und verringerte sich in Hypoxie nur um 15%. Nach 48 h betrug die Spaltbreitenverringering in Normoxie 73%, in Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung 50%.

4.1.2.2 Co-Kultur

In Co-Kultur zeigten sich bezüglich des Einflusses der Hypoxie auf die Abnahme der Spaltbreite die gleichen Signifikanzen wie bei der Mono-Kultur (siehe Abb. 17). In Normoxie ging die Spaltbreite um 35% nach 24 h und um 76% nach 48 h zurück, in Hypoxie und nach Reoxygenierung entsprechend um 12% und um 40%.

4.1.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

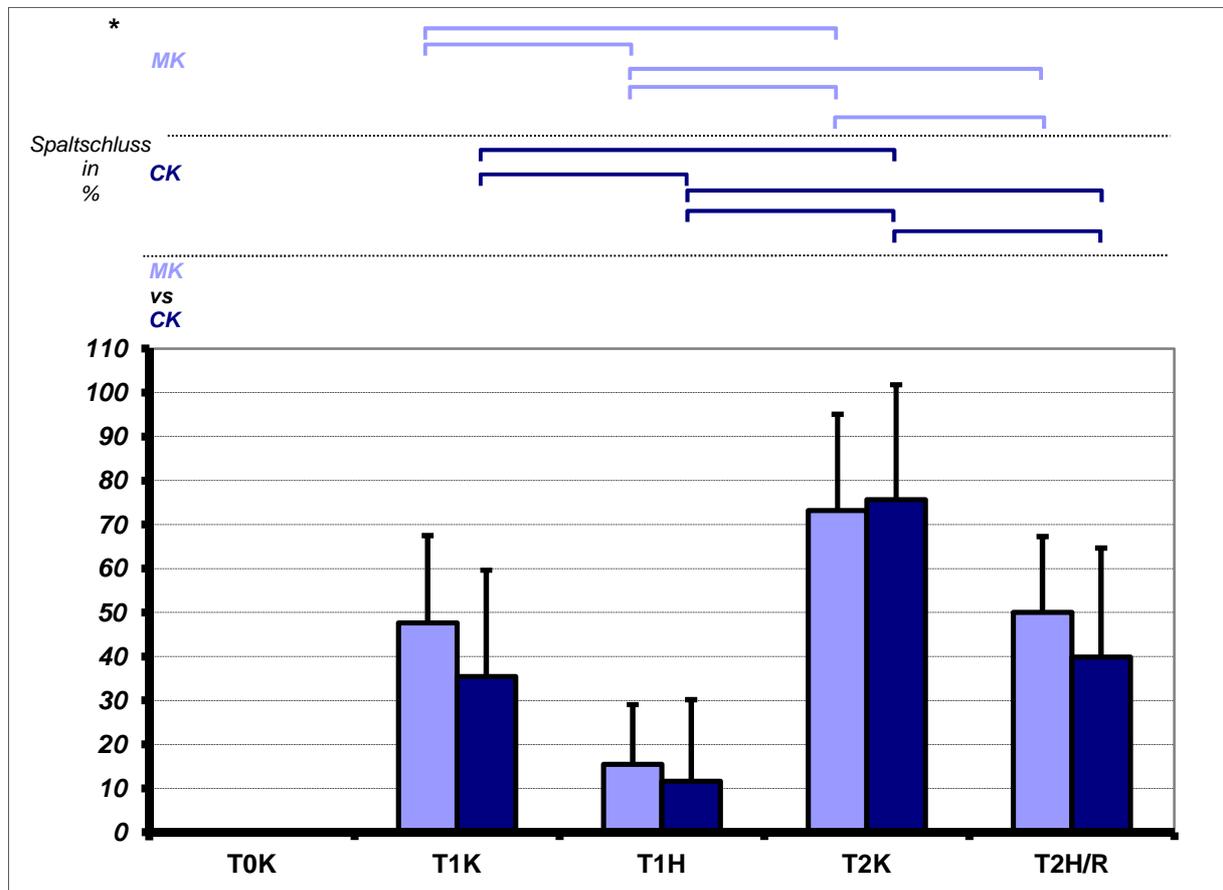


Abbildung 17: Spaltschluss der Mono- und Co-Kulturen aus gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentuale Abnahme der Spaltbreite in % der initialen Spaltgröße (T0K) der In-vitro-Wunden von Mono- (■, n=8) und Co-Kulturen (■, n=8) nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

Im Vergleich zwischen Mono- und Co-Kultur zeigt sich in 3 von 4 Fällen eine gesteigerte Migration in der Mono-Kultur (siehe Abb.17). Nur nach 48 h in Normoxie ist die Spaltbreiten-Abnahme in Co-Kultur tendenziell erhöht.

4.1.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden

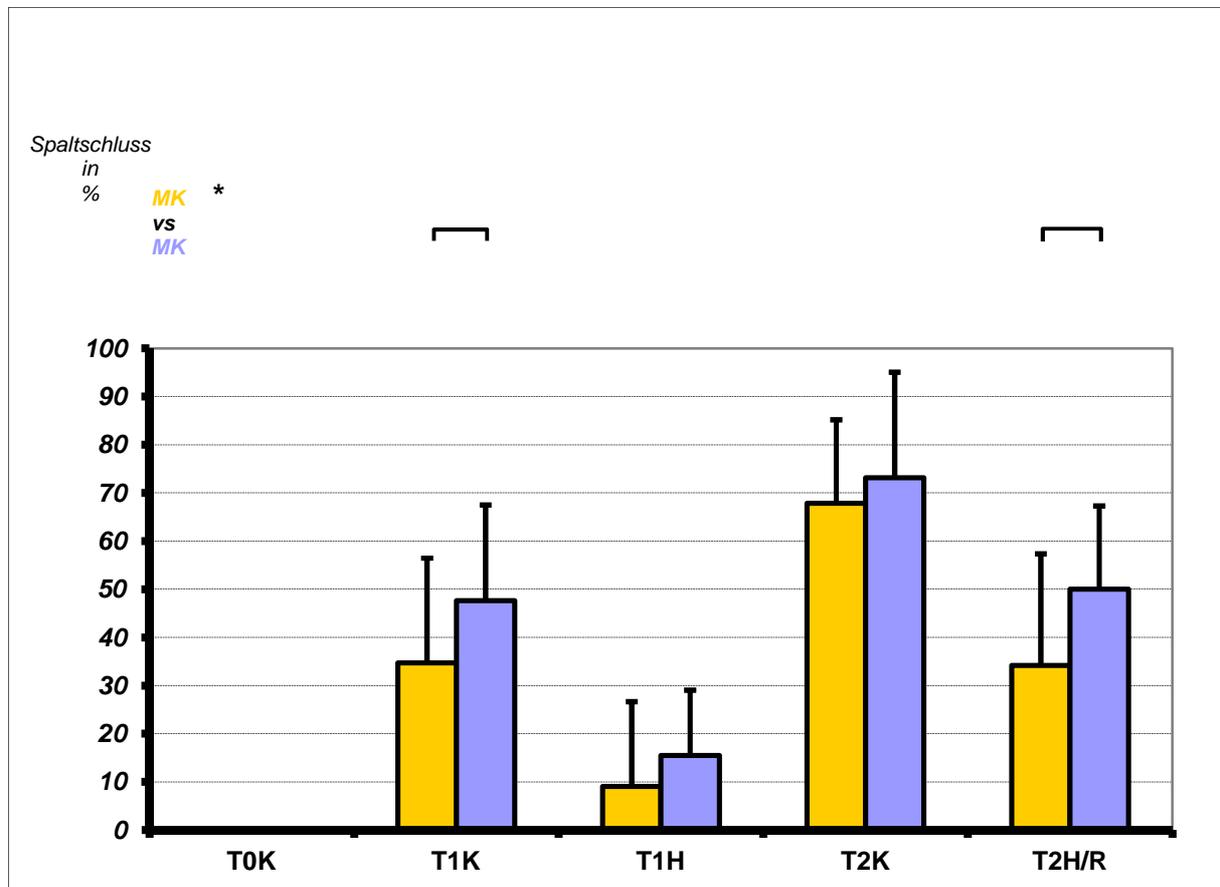


Abbildung 18: Vergleich des Spaltschlusses zwischen den Mono-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentuale Abnahme der Spaltbreite in % der initialen Spaltgröße (T0K) der In-vitro-Wunden im Vergleich der Mono-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

Im Vergleich zwischen den chronischen und gut granulierenden Wunden zeigte sich bei den Mono-Kulturen teils signifikant (T1K und T2H/R), teils tendenziell (T1H und T2K) eine stärkere Migration in den gut granulierenden Wunden (siehe Abb.18).

Im Vergleich der Co-Kulturen bestätigte sich dieser Effekt tendenziell, mit Ausnahme der Hypoxie-Kulturen. Hier stellte man nach 24 h bei den chronischen eine deutlich größere Spaltbreitenabnahme als bei den gut granulierenden Wunden fest (siehe Abb.19).

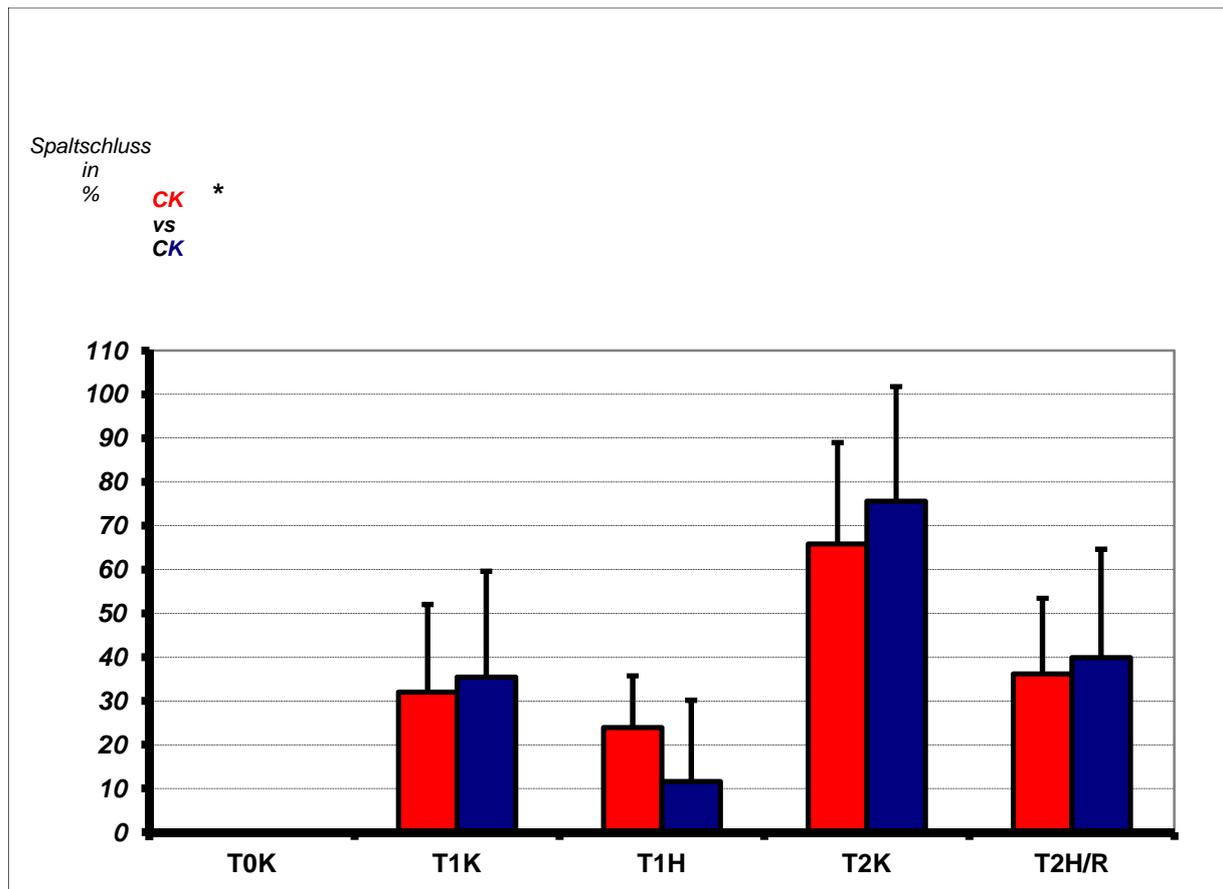


Abbildung 19: Vergleich des Spaltschlusses zwischen den Co-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentuale Abnahme der Spaltbreite in % der initialen Spaltgröße (T0K) der In-vitro-Wunden im Vergleich der Co-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.2 Zelldichte

4.2.1 Chronische Wunden

4.2.1.1 Mono-Kultur

Die Zelldichte der Fibroblasten-Mono-Kultur in der Gruppe der chronischen Wunden stieg von initial 66 Zellen pro mm² an Tag 0, über 125 Zellen pro mm² nach 24 h, bis zu 232 Zellen pro mm² an Tag 2 an (siehe Abb. 20). Im Vergleich zur Normoxie-Kultur proliferierten die Zellen unter Hypoxie mit 76 Zellen pro mm² nach 24 h und 95 Zellen pro mm² an Tag 2 nach Reoxygenierung deutlich weniger stark.

4.2.1.2 Co-Kultur

Die Gesamt-Zelldichte der Co-Kultur aus Fibroblasten, MF und HDMEC fiel von anfangs 309 Zellen pro mm² an Tag 0 leicht auf 292 Zellen pro mm² nach 24 h und stieg bis zu 411 Zellen pro mm² an Tag 2 an (siehe Abb. 20). Analog zur Mono-Kultur proliferierten die Zellen unter Hypoxie mit 237 Zellen pro mm² nach 24 h und 228 Zellen pro mm² an Tag 2 nach Reoxygenierung deutlich weniger stark.

4.2.1.3 Vergleich Mono vs. Kultur-Co-Kultur

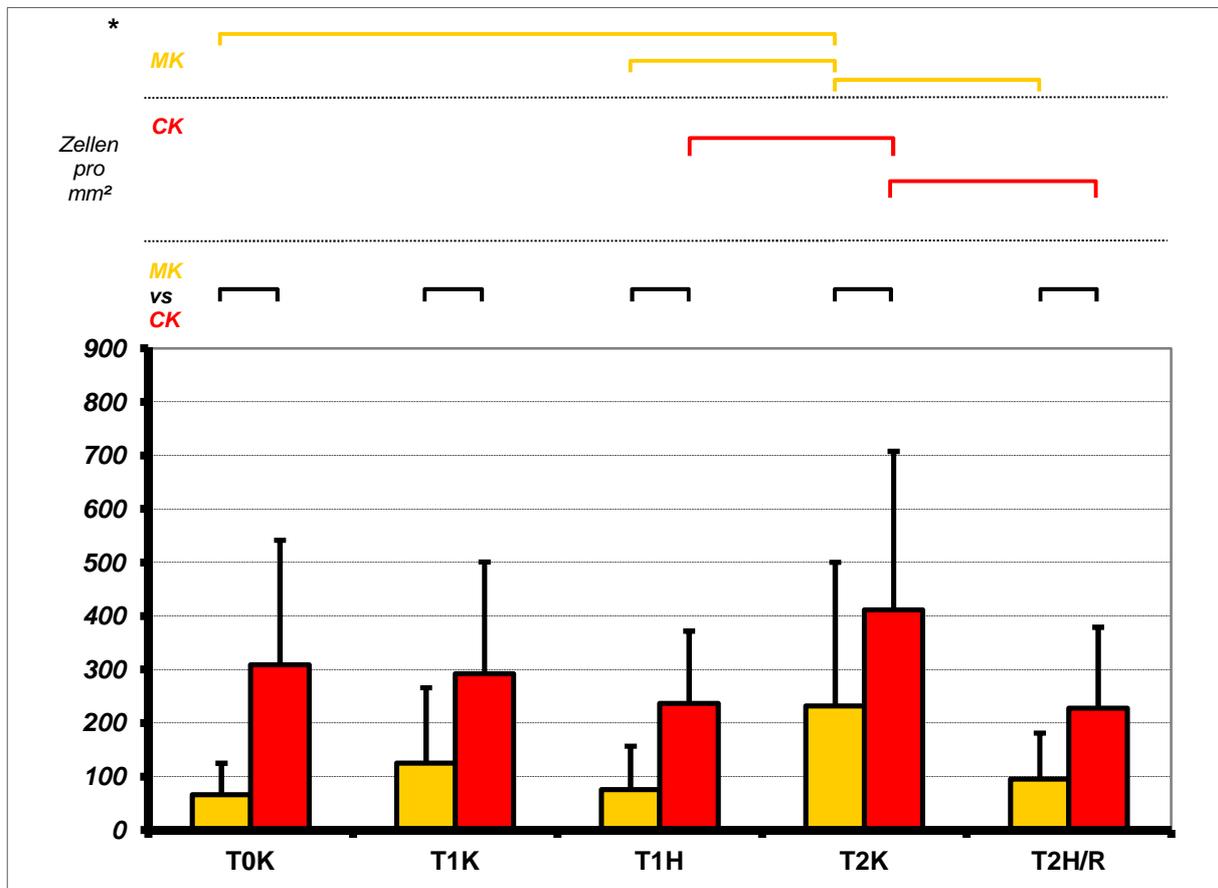


Abbildung 20: Zelldichte der Mono- und Co-Kulturen aus chronischen Wunden (cW)

Zellzahl pro mm² von Mono- (■, n=6) und Co-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In Co-Kultur lag die Zelldichte durchweg signifikant höher als in Mono-Kultur (siehe Abb. 20). In beiden Kulturen war der Abfall der Zelldichte der Reoxygenierungs-Kultur gegenüber ihrer Kontrolle stärker als der Abfall der Hypoxie-Kultur zur Kontrolle. In Mono-Kultur stieg die Zelldichte nach Hypoxie in den 24 h der Reoxygenierung wieder an, während sie in Co-Kultur sogar weiter leicht abfiel.

4.2.2 Gut granulierende Wunden

4.2.2.1 Mono-Kultur

Die Zelldichte der Fibroblasten-Mono-Kultur in der Gruppe der gut granulierenden Wunden stieg von initial 140 Zellen pro mm² an Tag 0, über 321 Zellen pro mm² nach 24 h, bis zu 406 Zellen pro mm² an Tag 2 an (siehe Abb. 21). Im Vergleich zur Normoxie-Kultur proliferierten die Zellen unter Hypoxie mit 200 Zellen pro mm² nach 24 h und 224 Zellen pro mm² an Tag 2 nach Reoxygenierung deutlich weniger stark.

4.2.2.2 Co-Kultur

Die Gesamt-Zelldichte der Co-Kultur aus Fibroblasten, MF und HDMEC stieg von anfangs 288 Zellen pro mm² an Tag 0 und 435 Zellen pro mm² an Tag 1 auf bis zu 537 Zellen pro mm² an Tag 2 an (siehe Abb. 21). Unter Hypoxie proliferierten die Zellen mit 265 Zellen pro mm² nach 24 h und 278 Zellen pro mm² an Tag 2 nach Reoxygenierung deutlich weniger stark.

4.2.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

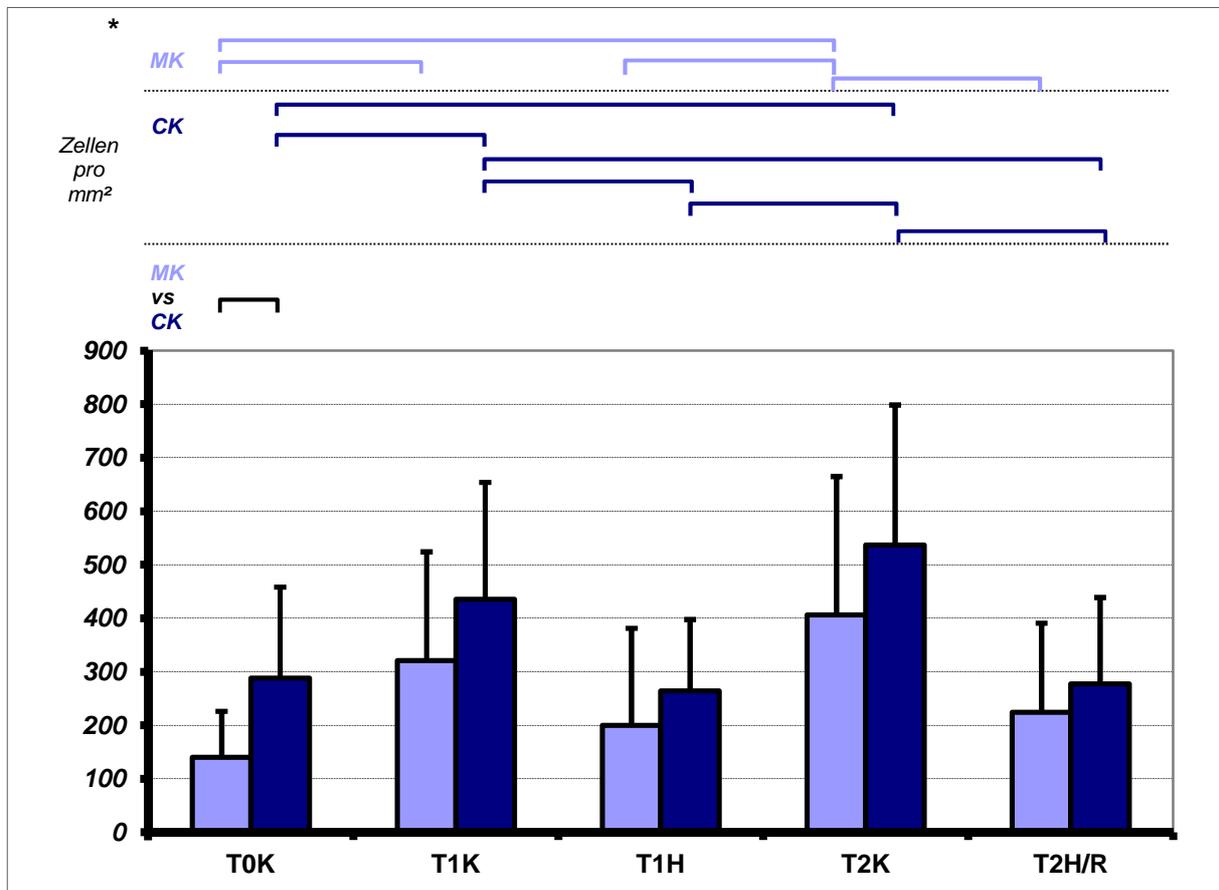


Abbildung 21: Zelldichte der Mono- und Co-Kulturen aus gut granulierenden Wunden (gG)

Zellzahl pro mm² von Mono- (■, n=8) und Co-Kulturen (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In der Co-Kultur lag die Zelldichte durchweg tendenziell höher als in Mono-Kultur (siehe Abb. 21). Nur an Tag 0 war die Zelldichte in Co-Kultur gegenüber in Mono-Kultur auch signifikant erhöht. In beiden Kulturen stieg die Zelldichte, nach einem Rückgang unter Hypoxie, unter Reoxygenierung wieder an.

4.2.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden

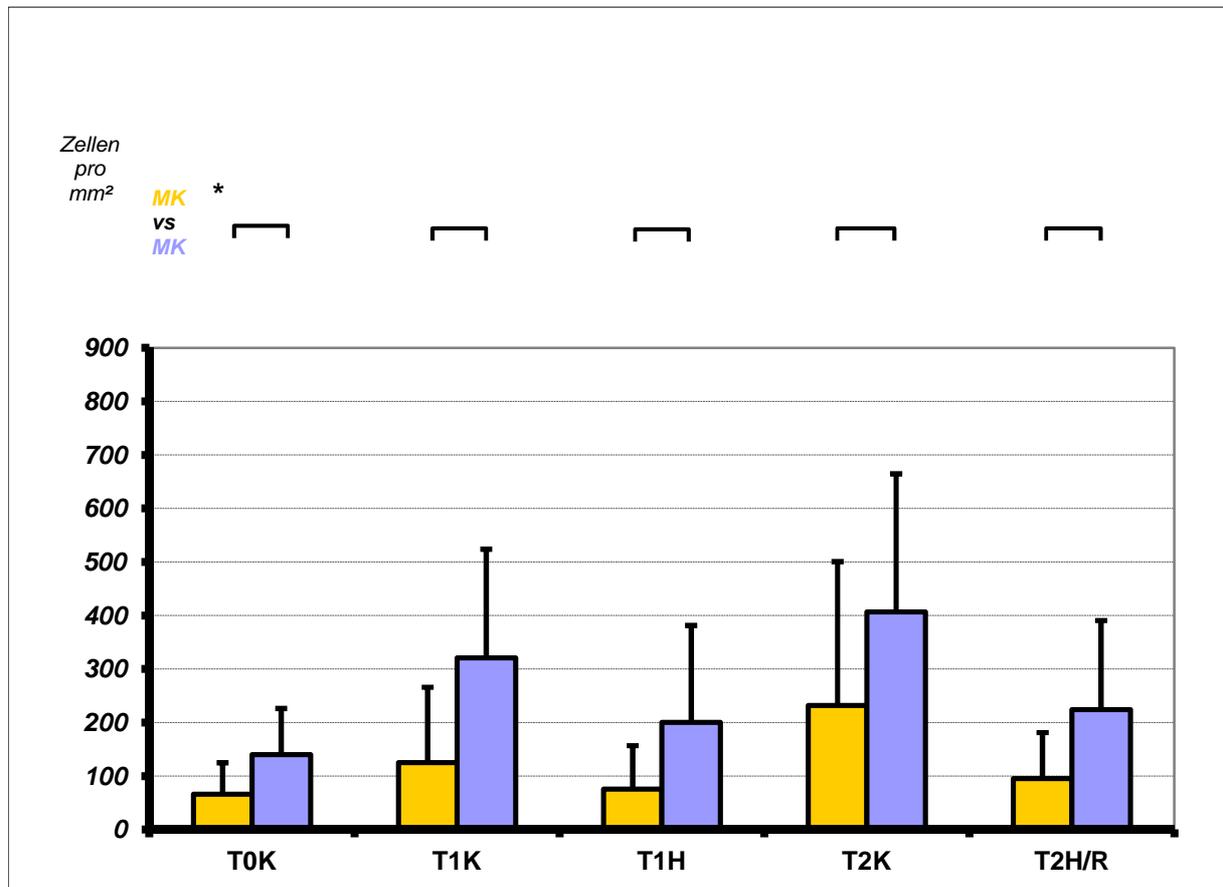


Abbildung 22: Vergleich der Zelldichte zwischen den Mono-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Zellzahl pro mm² im Vergleich der Mono-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In den Mono-Kulturen der gut granulierenden Wunden zeigten sich gegenüber der Gruppe der chronischen Wunden signifikant erhöhte Zelldichten (siehe Abb.22).

Im Vergleich der Co-Kulturen bestätigte sich mit Ausnahme von Tag 0 dieses Ergebnis in abgeschwächter Form (siehe Abb. 23).

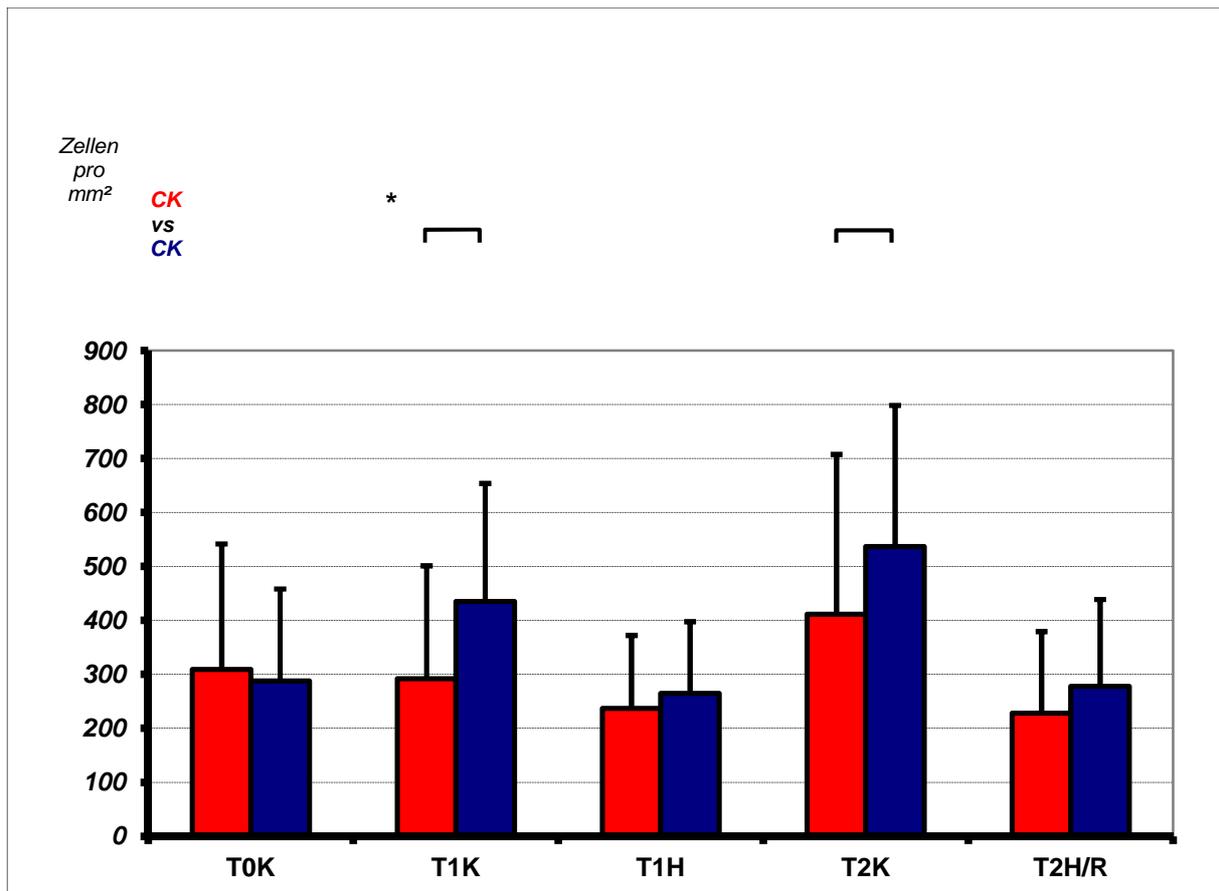


Abbildung 23: Vergleich der Zelldichte zwischen den Co-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Zellzahl pro mm² im Vergleich der Co-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.2.4 Zelldichte in der Gruppe der Raucher

4.2.4.1 Mono-Kultur

Die Zelldichte der Fibroblasten-Mono-Kulturen in der Gruppe der Raucher stieg von initial 120 Zellen pro mm² an Tag 0, über 244 Zellen pro mm² nach 24 h, bis zu 345 Zellen pro mm² an Tag 2 an (siehe Abb. 24). Im Vergleich zur Normoxie-Kultur proliferierten die Zellen unter Hypoxie mit 160 Zellen pro mm² nach 24 h und 180 Zellen pro mm² an Tag 2 nach Reoxygenierung deutlich weniger stark.

4.2.4.2 Co-Kultur

Die Zelldichte der Co-Kultur stieg von anfangs 247 Zellen pro mm² an Tag 0 leicht auf 330 Zellen pro mm² nach 24 h und stieg bis zu 459 Zellen pro mm² an Tag 2 an (siehe Abb. 24). Analog zur Mono-Kultur proliferierten die Zellen unter Hypoxie mit 225 Zellen pro mm² nach 24 h und ebenfalls 225 Zellen pro mm² an Tag 2 nach Reoxygenierung deutlich weniger stark.

4.2.4.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

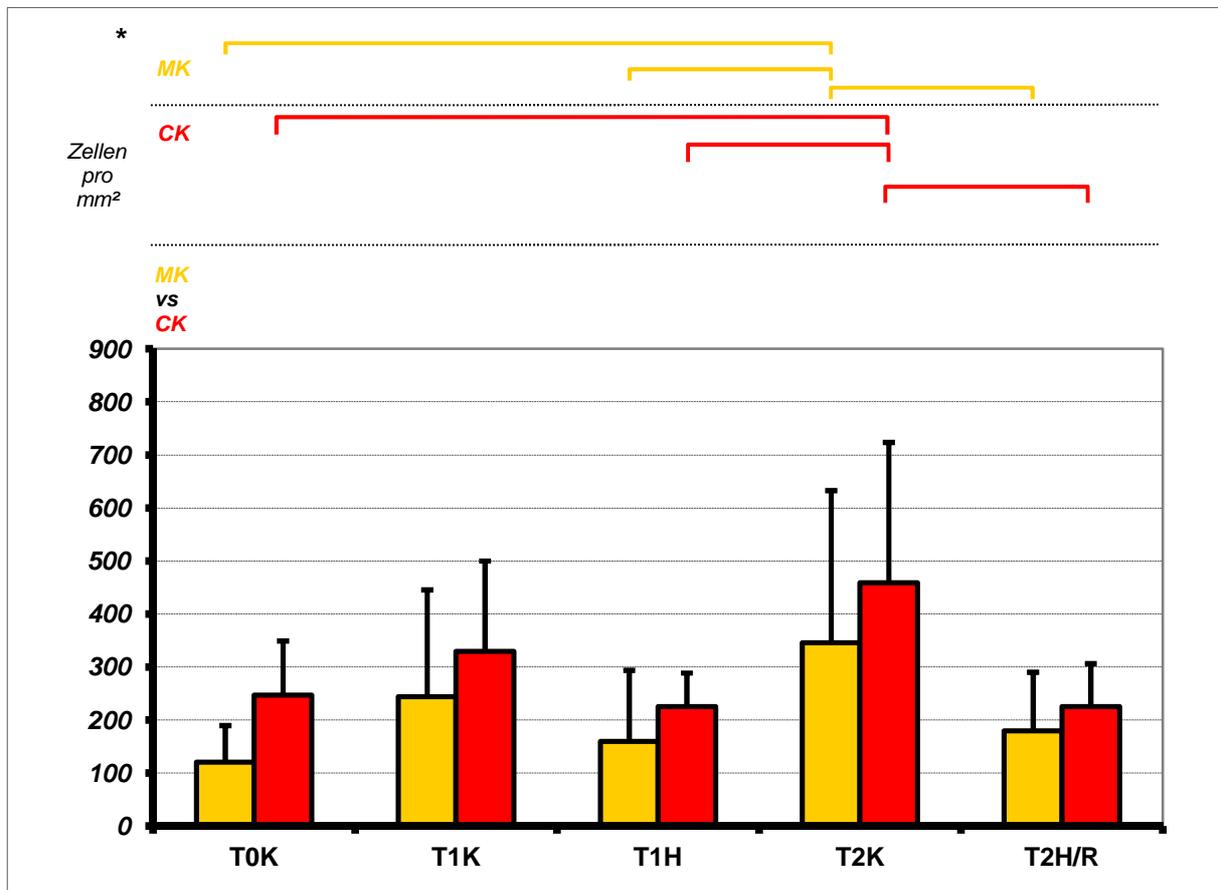


Abbildung 24: Zelldichte der Mono- und Co-Kulturen in der Gruppe der Raucher

Zellzahl pro mm² von Mono- (■, n=5) und Co-Kulturen (■, n=5) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In der Co-Kultur lag die Zelldichte durchweg signifikant höher als in Mono-Kultur (siehe Abb. 24). In beiden Kulturen war der Abfall der Zelldichte der Reoxygenierungs-Kultur gegenüber ihrer Kontrolle stärker als der Abfall der Hypoxie-Kultur zur Kontrolle. In Mono-Kultur kam es zu einem tendenziellen Anstieg der Zelldichte nach Hypoxie in den 24 h der Reoxygenierung, während sie in Co-Kultur konstant blieb.

4.2.5 Zelldichte in der Gruppe der Nichtraucher

4.2.5.1 Mono-Kultur

Die Zelldichte der Fibroblasten-Mono-Kultur in der Gruppe der Nichtraucher stieg von initial 102 Zellen pro mm² an Tag 0, über 233 Zellen pro mm² nach 24 h, bis zu 324 Zellen pro mm² an Tag 2 an (siehe Abb. 25). Im Vergleich zur Normoxie-Kultur proliferierten die Zellen unter Hypoxie mit 140 Zellen pro mm² nach 24 h und 163 Zellen pro mm² an Tag 2 nach Reoxygenierung deutlich weniger stark.

4.2.5.2 Co-Kultur

Die Zelldichte der Co-Kultur stieg von anfangs 325 Zellen pro mm² an Tag 0 und 399 Zellen pro mm² an Tag 1, auf bis zu 497 Zellen pro mm² an Tag 2 an (siehe Abb. 25). Unter Hypoxie proliferierten die Zellen mit 268 Zellen pro mm² nach 24 h und 274 Zellen pro mm² an Tag 2 nach Reoxygenierung deutlich weniger stark.

4.2.5.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

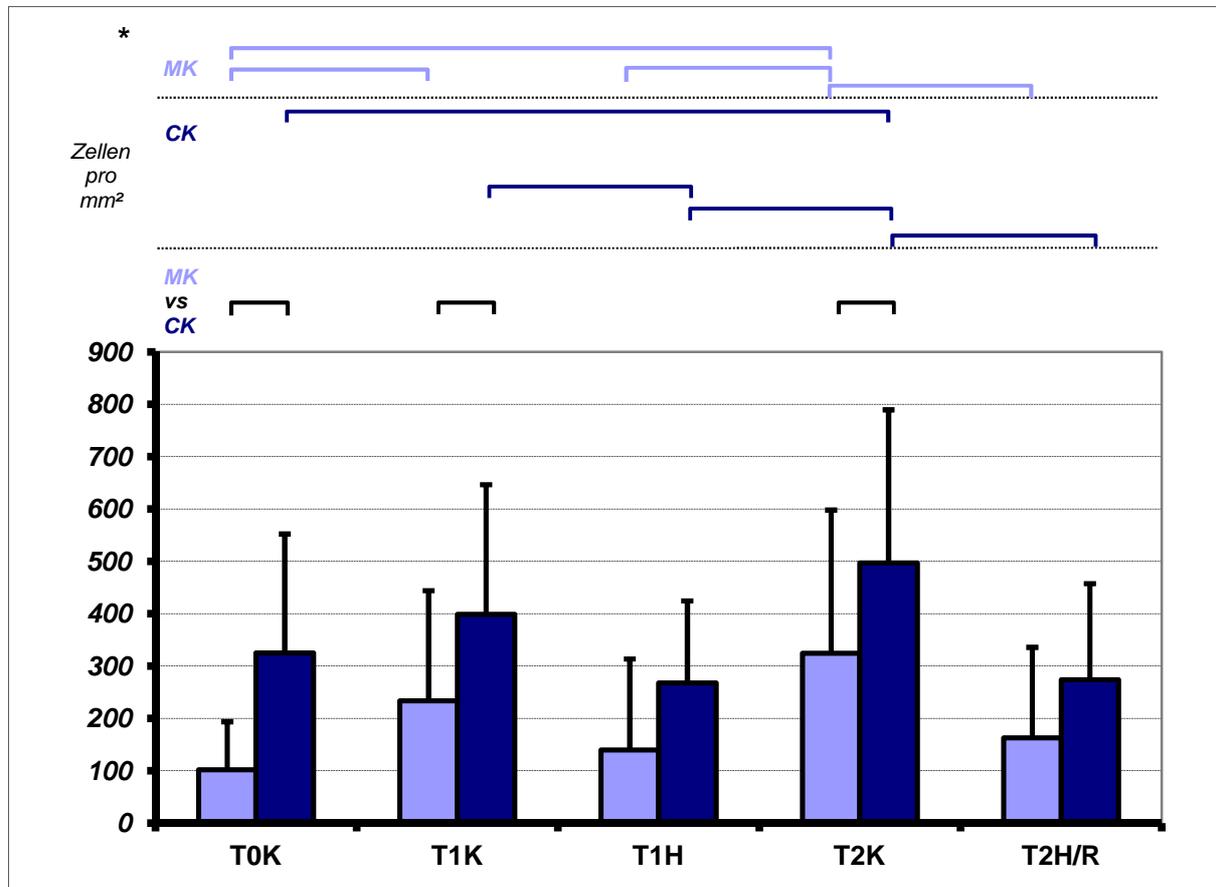


Abbildung 25: Zelldichte der Mono- und Co-Kulturen der Nichtraucher

Zellzahl pro mm² von Mono- (■, n=9) und Co-Kulturen (■, n=9) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In der Co-Kultur lag die Zelldichte durchweg höher als in Mono-Kultur (siehe Abb. 25), an den Tagen 0, 1 und 2 auch signifikant. In beiden Kulturen stieg die Zelldichte, nach einem Rückgang unter Hypoxie, unter Reoxygenierung wieder an (nicht signifikant).

4.2.6 Vergleich Raucher vs. Nichtraucher

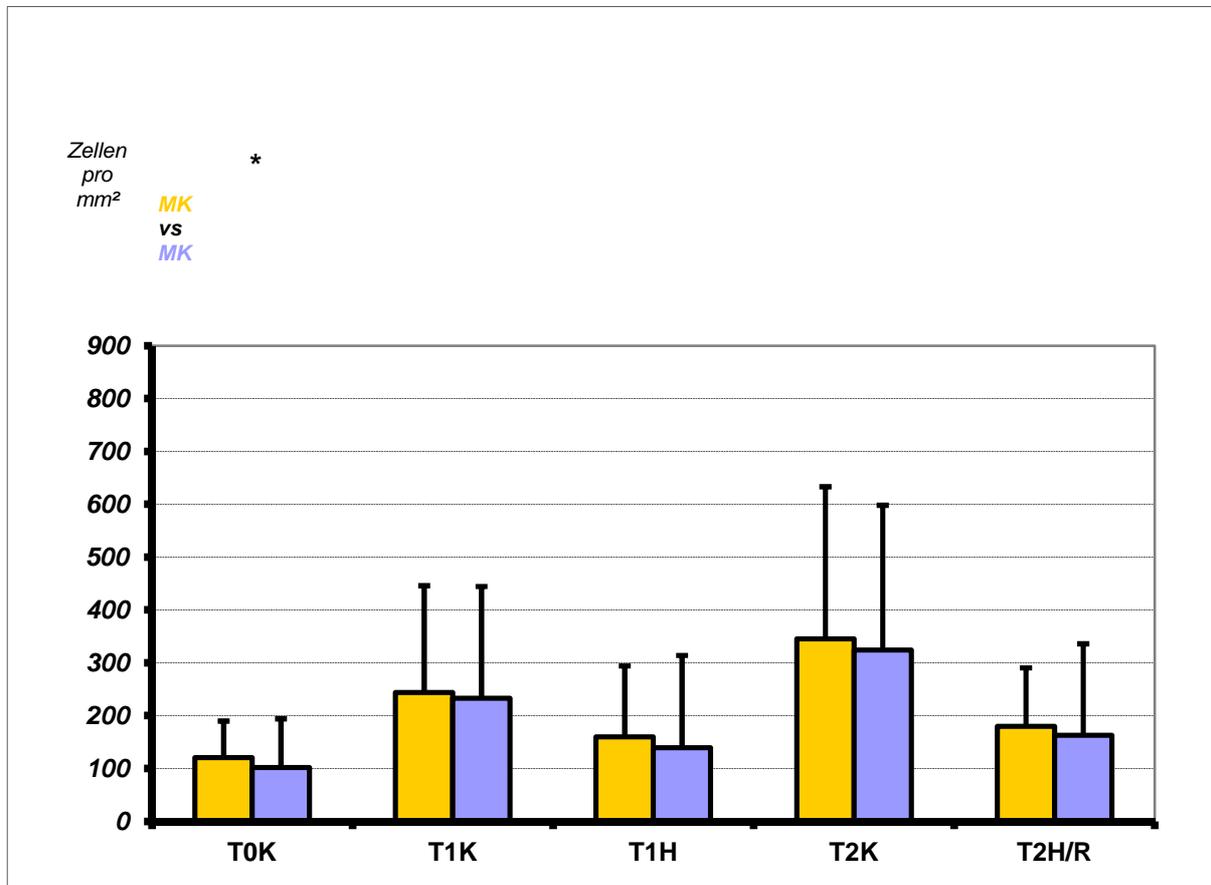


Abbildung 26: Vergleich der Zelldichte zwischen den Mono-Kulturen der Raucher- und Nichtraucher

Zellzahl pro mm² im Vergleich der Mono-Kulturen von Rauchern (■, n=5) und Nichtrauchern (■, n=9) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In der Mono-Kultur der Raucher zeigten sich gegenüber der Nichtrauchern minimal erhöhte Zelldichten (siehe Abb.26).

Im Vergleich der Co-Kulturen zeigte sich ein tendenziell gegensätzliches Bild mit erhöhten Zelldichten bei den Nicht-Rauchern (siehe Abb. 27).

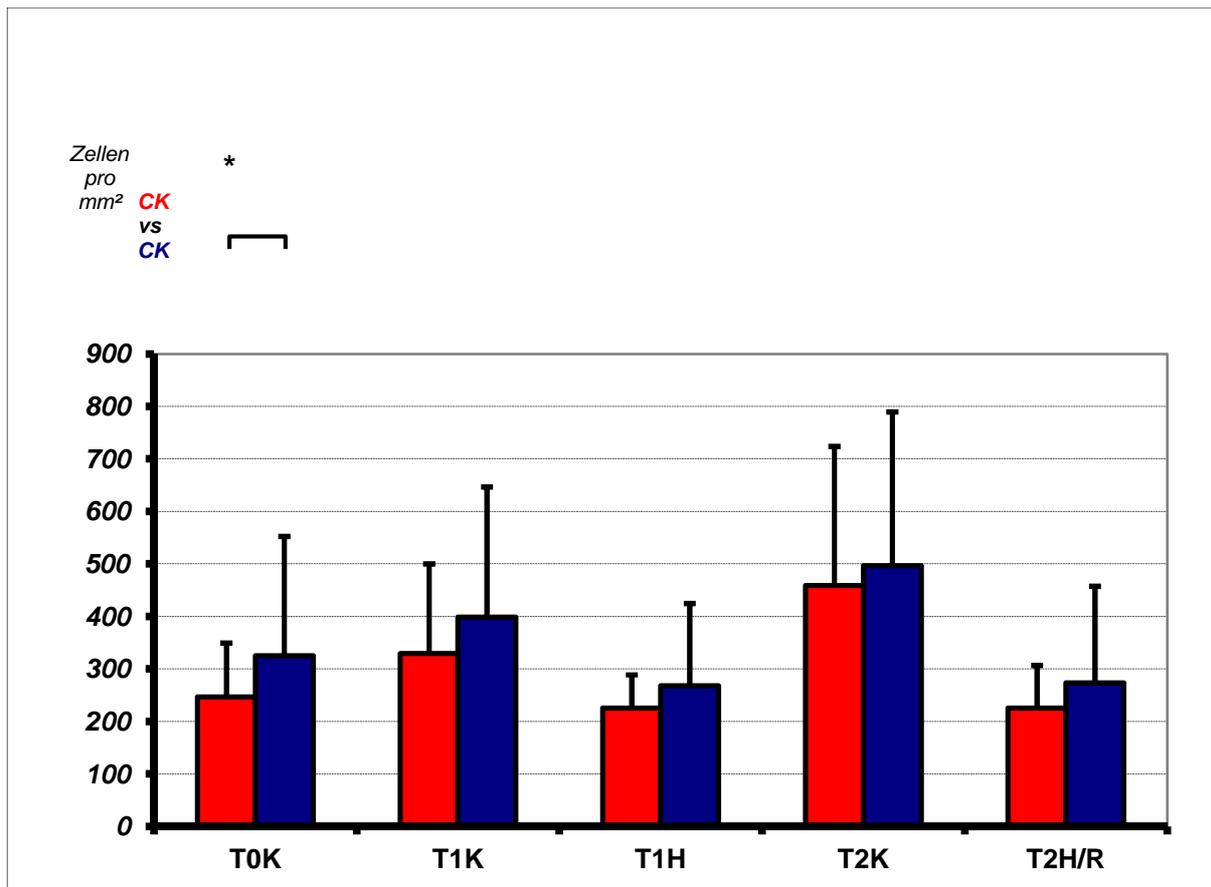


Abbildung 27: Vergleich der Zelldichte zwischen den Co-Kulturen der Raucher und der Nichtraucher

Zellzahl pro mm² im Vergleich der Co-Kulturen von Rauchern (■, n=5) und Nichtrauchern (■, n=9) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.3 Proliferationsmarker MIB

4.3.1 Fibroblasten: chronische Wunden

4.3.1.1 Mono-Kultur

In Mono-Kultur der Gruppe der chronischen Wunden steigerte sich die Proliferationsrate der Fibroblasten zunächst von 47% zu Beginn auf 65% nach 24 h (siehe Abb. 28). Nach 48 h fiel sie auf 54% ab. Mit 50% unter Hypoxie und 61% nach Reoxygenierung lagen die Proliferationsraten nach 24 h unter und nach 48 h über ihren normoxischen Kontrollen.

4.3.1.2 Co-Kultur

In Co-Kultur stieg die Proliferationsrate der Fibroblasten initial von 56% an Tag 0 auf 70% an Tag 1 und war mit 67% an Tag 2 leicht rückläufig (siehe Abb. 28). Mit 54% unter Hypoxie und 61% nach anschließender Reoxygenierung proliferierten die Fibroblasten an Tag 1 und 2 weniger stark als ihre normoxischen Kontrollen.

4.3.1.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

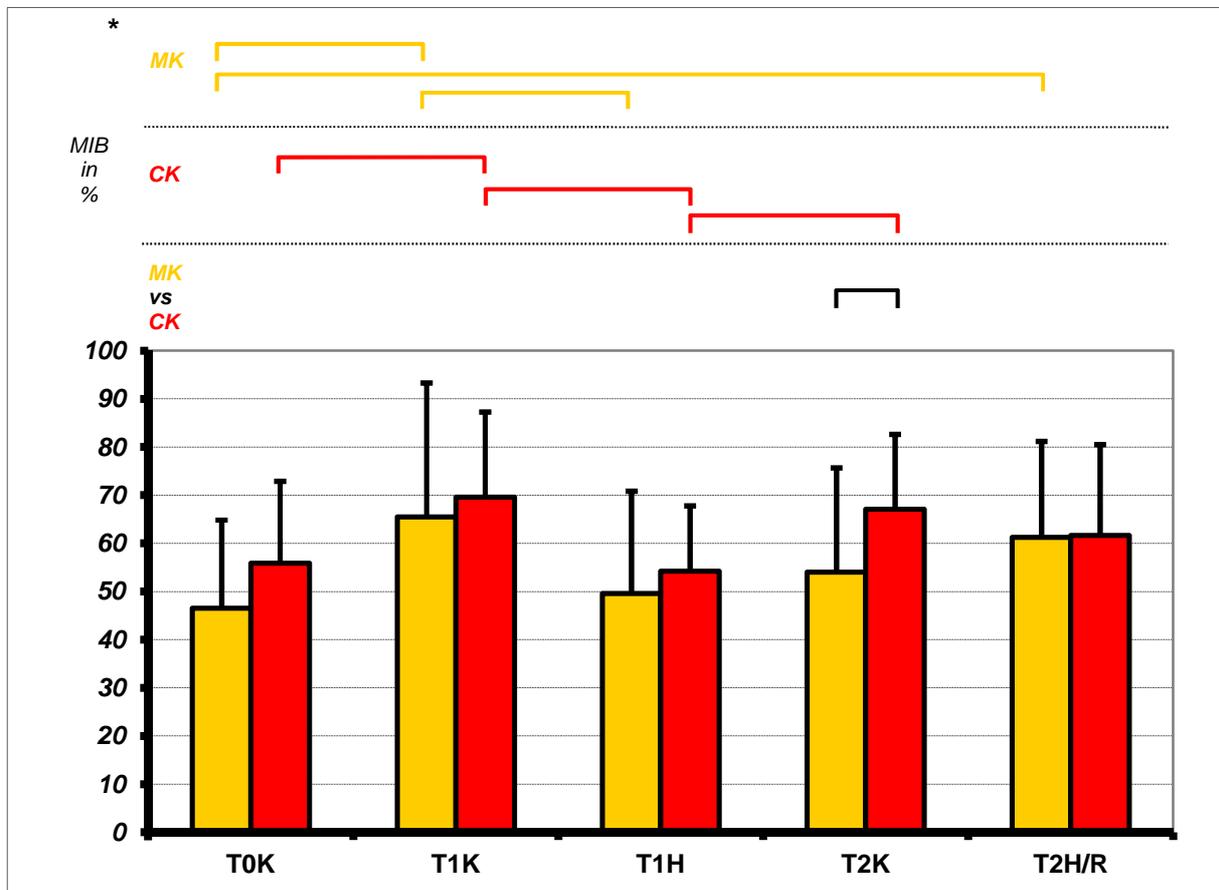


Abbildung 28: Proliferation der Wundfibroblasten in den Mono- und Co-Kulturen aus chronischen Wunden (cW)

Prozentualer Anteil an MIB-positiven Wundfibroblasten in Mono- (■, n=6) und Co-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

Im Vergleich der Kulturen fiel auf, dass die Fibroblasten in Co-Kultur tendenziell stärker proliferieren (siehe Abb. 28). Sowohl in Mono- als auch in Co-Kultur wurden die höchsten Werte jeweils in Normoxie nach 24 h (T1K) erreicht. Auffällig war die tendenziell höhere Proliferationsrate der Hypoxie-Reoxygenierungs-Kultur gegenüber der Kultivierung unter 48 h Normoxie in Mono-Kultur.

4.3.2 Fibroblasten: gut granulierende Wunden

4.3.2.1 Mono-Kultur

In den Mono-Kulturen der Gruppe der gut granulierenden Wunden steigerte sich die Proliferationsrate der Fibroblasten zunächst von 56% nach 0 h auf 67% nach 24 h (siehe Abb. 29). Nach 48 h fiel sie auf 62% ab. Mit 54% unter Hypoxie und 63% nach Reoxygenierung lagen die Proliferationsraten nach 24 h unter und 48 h über ihren normoxischen Kontrollen.

4.3.2.2.Co-Kultur

In Co-Kultur stieg die Proliferationsrate der Fibroblasten initial von 60% an Tag 0 auf 76% an Tag 1 und ging mit 71% an Tag 2 leicht zurück (siehe Abb. 29). Mit 60% und 67% unter Hypoxie und nach anschließender Reoxygenierung proliferierten die Fibroblasten an Tag 1 und an Tag 2 tendenziell weniger stark als ihre normoxischen Kontrollen.

4.3.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

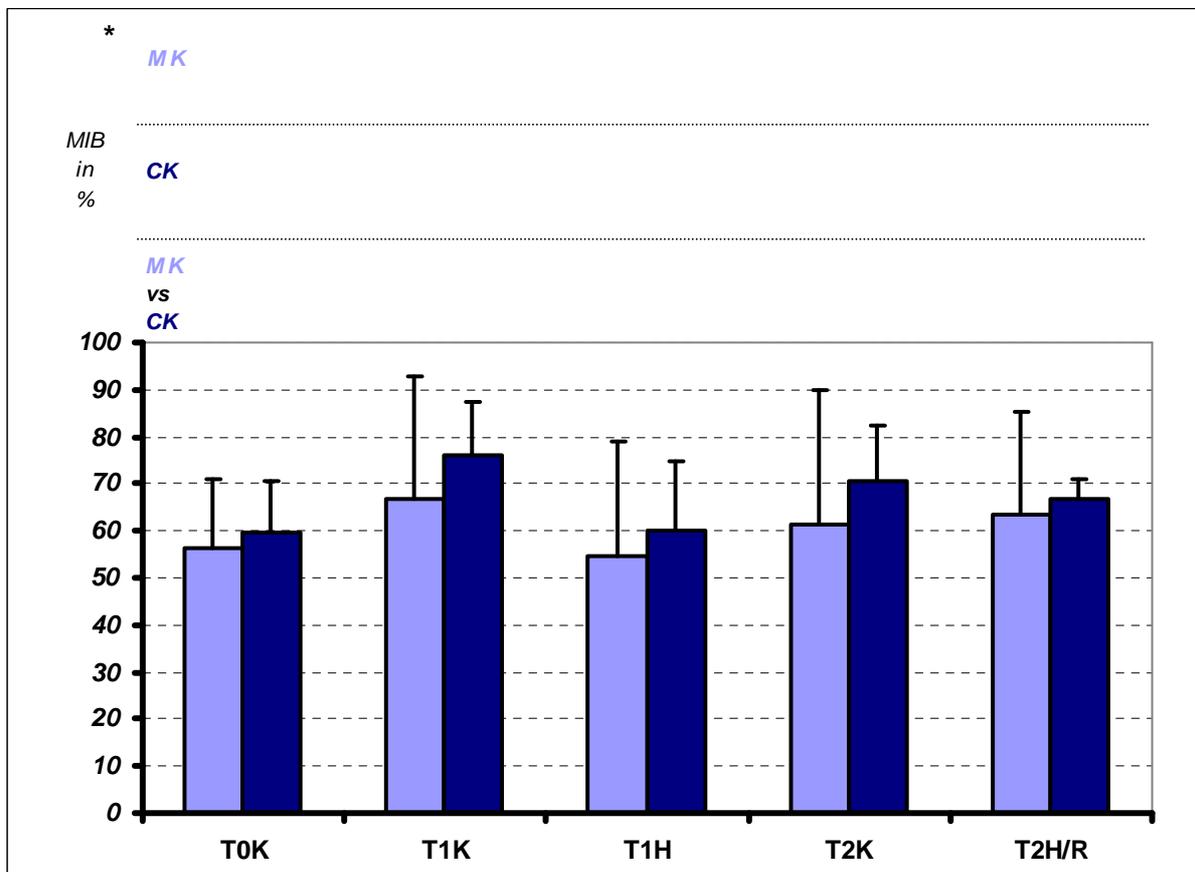


Abbildung 29: Proliferation der Wundfibroblasten in den Mono- und Co-Kulturen aus gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentualer Anteil an MIB-positiven Wundfibroblasten in Mono- (□, n=8) und Co-Kulturen (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; * $p \leq 0,05$.

Auch in der Gruppe der gut granulierenden Wunden proliferierten die Fibroblasten in Co-Kultur tendenziell stärker (siehe Abb. 29). Sowohl in Mono- als auch in Co-Kultur wurden die höchsten Werte jeweils in Normoxie nach 24 h (T1K) erreicht.

4.3.3 Fibroblasten: Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden

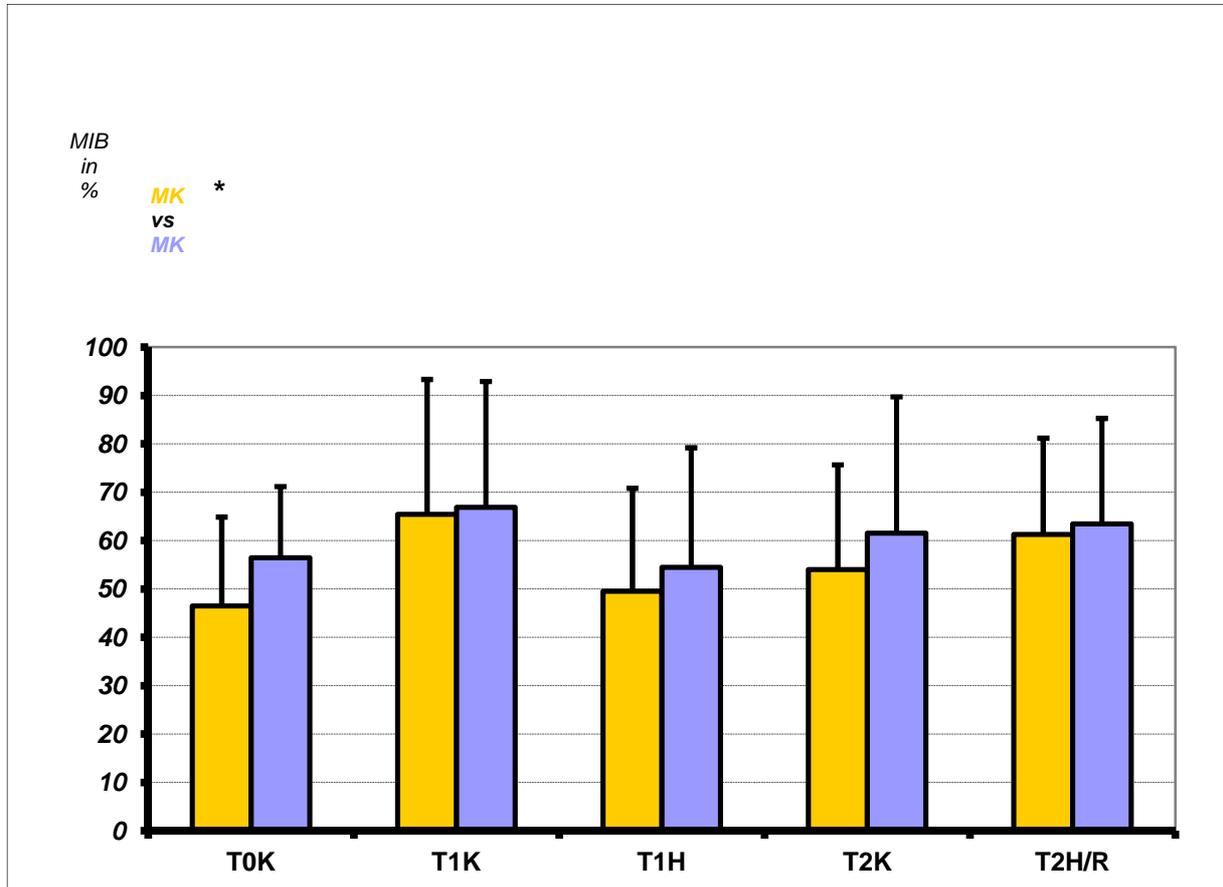


Abbildung 30: Vergleich der Proliferation der Wundfibroblasten zwischen den Mono-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentualer Anteil an MIB-positiven Wundfibroblasten im Vergleich der Mono-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

Sowohl die Mono- als auch Co-Kulturen in der Gruppe der gut granulierenden Wunden proliferierten geringfügig stärker als in der Gruppe der chronischen Wunden (siehe Abb. 30 u. 31). In beiden Gruppen wurden in Mono- und Co-Kultur die höchsten Proliferationsraten nach 24 h Normoxie gemessen.

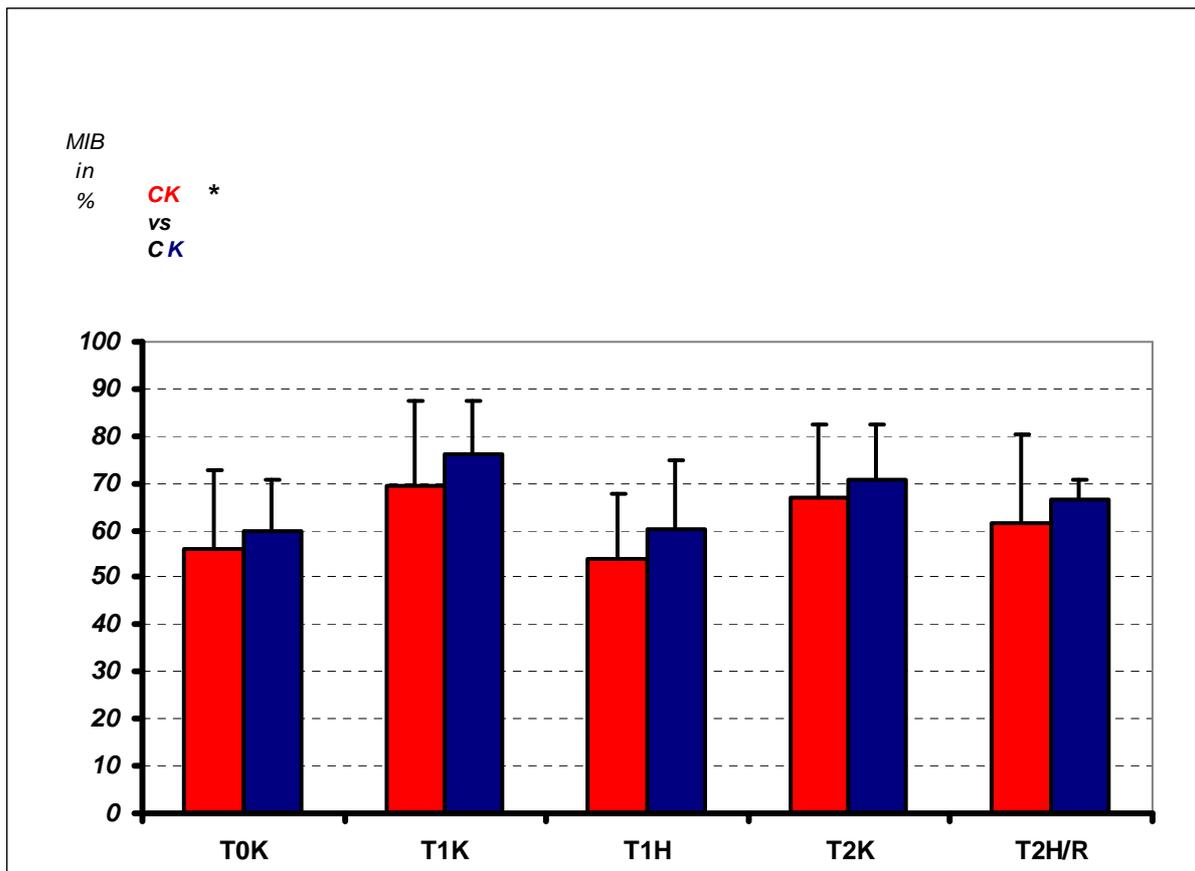


Abbildung 31: Vergleich der Proliferation der Wundfibroblasten zwischen den Co-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentualer Anteil an MIB-positiven Wundfibroblasten im Vergleich der Co-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.3.4 HDMEC

Die Proliferationsraten der Endothelzellen in Co-Kultur lagen stets unter denen der Wundfibroblasten.

4.3.4.1 Chronischen Wunden

Die Proliferationsrate der Endothelzellen in Co-Kultur mit Fibroblasten aus chronischen Wunden nahm über die Versuchszeit hinweg tendenziell ab (siehe Abb. 32). Die HDMEC wiesen an Tag 0 eine Proliferationsrate von 33% und an Tag 1 von 32% auf. Nach 24 h Hypoxie war die Rate auf 29% gesunken und nach Reoxygenierung an Tag 2 auf 14%. Dagegen fiel sie unter 48 h Normoxie nur auf 24% ab.

4.3.4.2 Gut granulierende Wunden

Die Proliferationsrate der Endothelzellen in Co-Kultur mit Fibroblasten aus gut granulierenden Wunden nahm über die Versuchszeit hinweg tendenziell ebenfalls ab (siehe Abb. 32). Die HDMEC wiesen an Tag 0 eine Proliferationsrate von 29%, an Tag 1 von 33% und an Tag 2 von 19% auf. Hypoxie hatte auch bei gut granulierenden Wunden einen eher negativen Einfluss auf die Proliferation, was sich mit einer Rate von 30% nach 24 h Hypoxie bemerkbar machte. Nach weiteren 24 h Reoxygenierung an Tag 2 wies die Proliferationsrate mit 19% den gleichen Wert auf wie nach 48 h Normoxie.

4.3.4.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden

In beiden Gruppen sank die Proliferationsrate über 48 h ab (siehe Abb. 32). Dieser Effekt wurde in beiden Fällen tendenziell durch Hypoxie verstärkt, wobei er vor allem in der Phase der Reoxygenierung in der Co-Kultur mit Fibroblasten aus chronischen Wunden zur Geltung kam.

Zu keinem Zeitpunkt traten signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf.

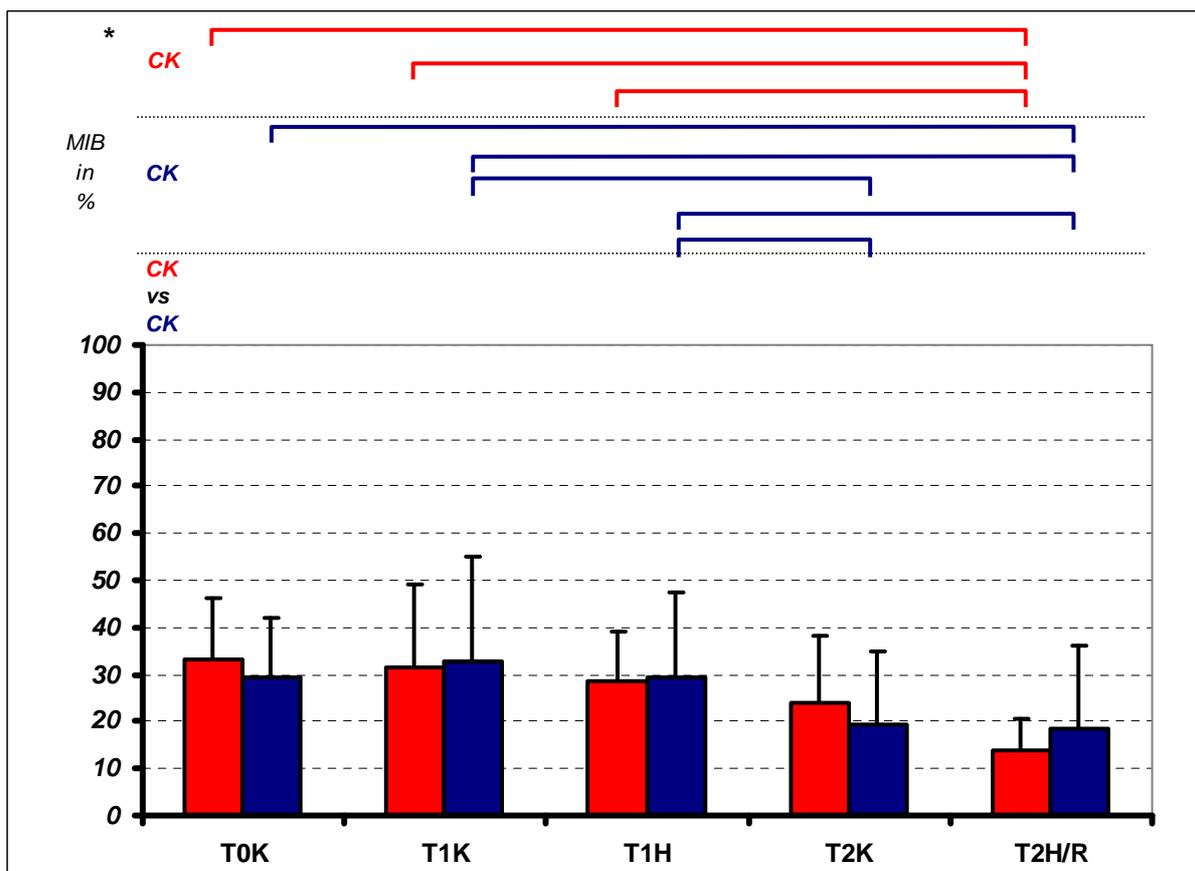


Abbildung 32: Vergleich der Proliferation der Endothelzellen zwischen den Co-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentualer Anteil an MIB-positiven Wundfibroblasten im Vergleich der Co-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.4 Generationszeit der Fibroblasten in Normoxie

Als Generationszeit wird die Zeit bezeichnet, die eine Zellkultur benötigt, um ihre Zellzahl zu verdoppeln (siehe 3.4).

4.4.1 Chronische Wunden

4.4.1.1 Mono-Kultur

In der Mono-Kultur der Gruppe der chronischen Wunden betrug die Generationszeit der Fibroblasten, berechnet nach einem Tag 41 h und berechnet nach 2 Tagen 33 h (siehe Abb. 33).

4.4.1.2 Co-Kultur

In der Co-Kultur betrug die Generationszeit der Fibroblasten, berechnet nach Tag 1 in Normoxie, 51 h und berechnet nach 2 Tagen 44 h (siehe Abb. 33).

4.4.1.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

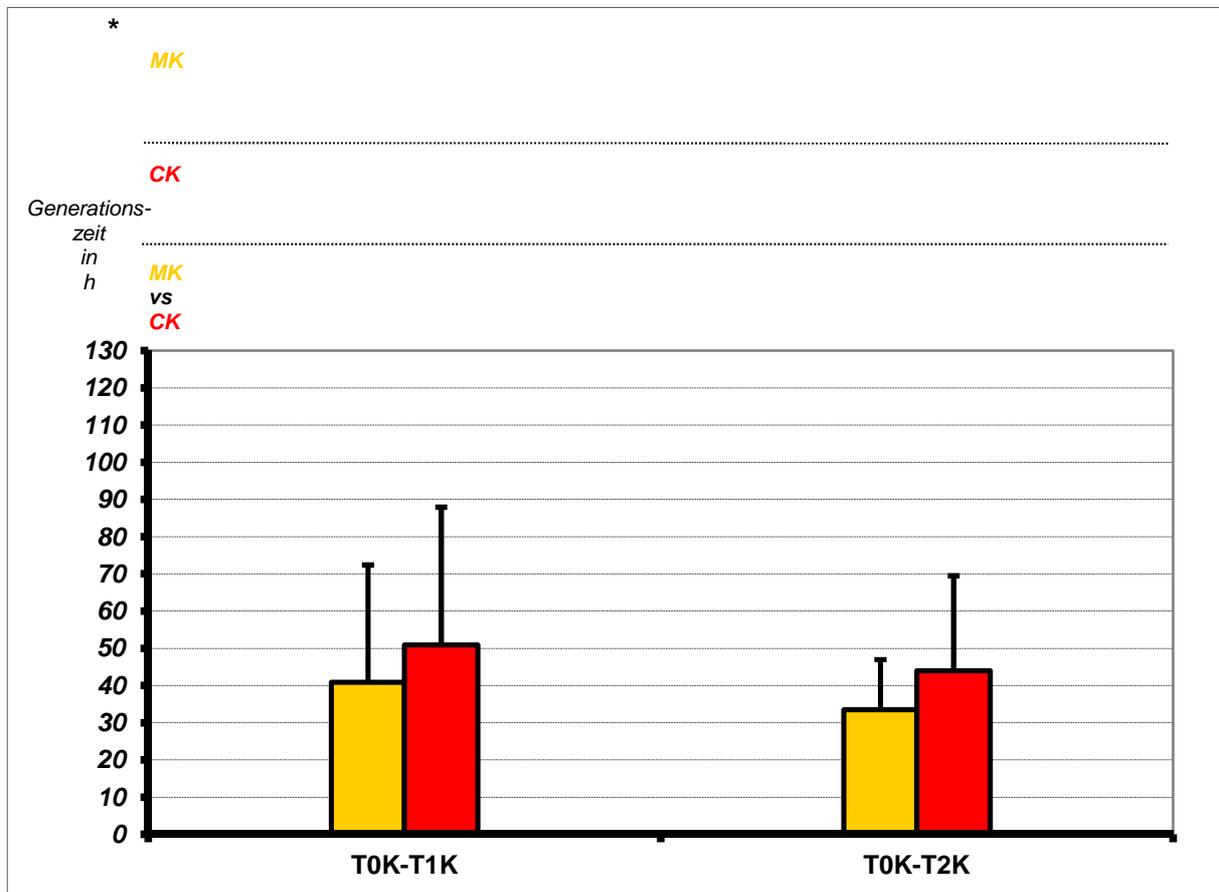


Abbildung 33: Generationszeiten der Wundfibroblasten in den Mono- und Co-Kulturen aus chronischen Wunden (cW)

Verdopplungszeit der Wundfibroblasten in Stunden in Mono- (■, n=6) und Co-Kulturen (■, n=6) zu den Zeitpunkten nach 24 h (T0K-T1K) und nach 48 h (T0K-T2K) Normoxie. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

Der Vergleich zeigte, dass in Mono-Kultur die Fibroblasten tendenziell stärker als in Co-Kultur proliferierten (siehe Abb. 33).

4.4.2 Gut granulierende Wunden

4.4.2.1 Mono-Kultur

In der Mono-Kultur der gut granulierenden Wunden war die Generationszeit der Fibroblasten berechnet mit 22 h nach Tag 1 niedriger als berechnet nach 2 Tagen mit 58 h (siehe Abb. 34).

4.4.2.2 Co-Kultur

In der Co-Kultur der gut granulierenden Wunden lag die Generationszeit der Fibroblasten berechnet mit 33 h nach Tag 1 leicht über den 31 h berechnet nach 2 Tagen (siehe Abb. 34).

4.4.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

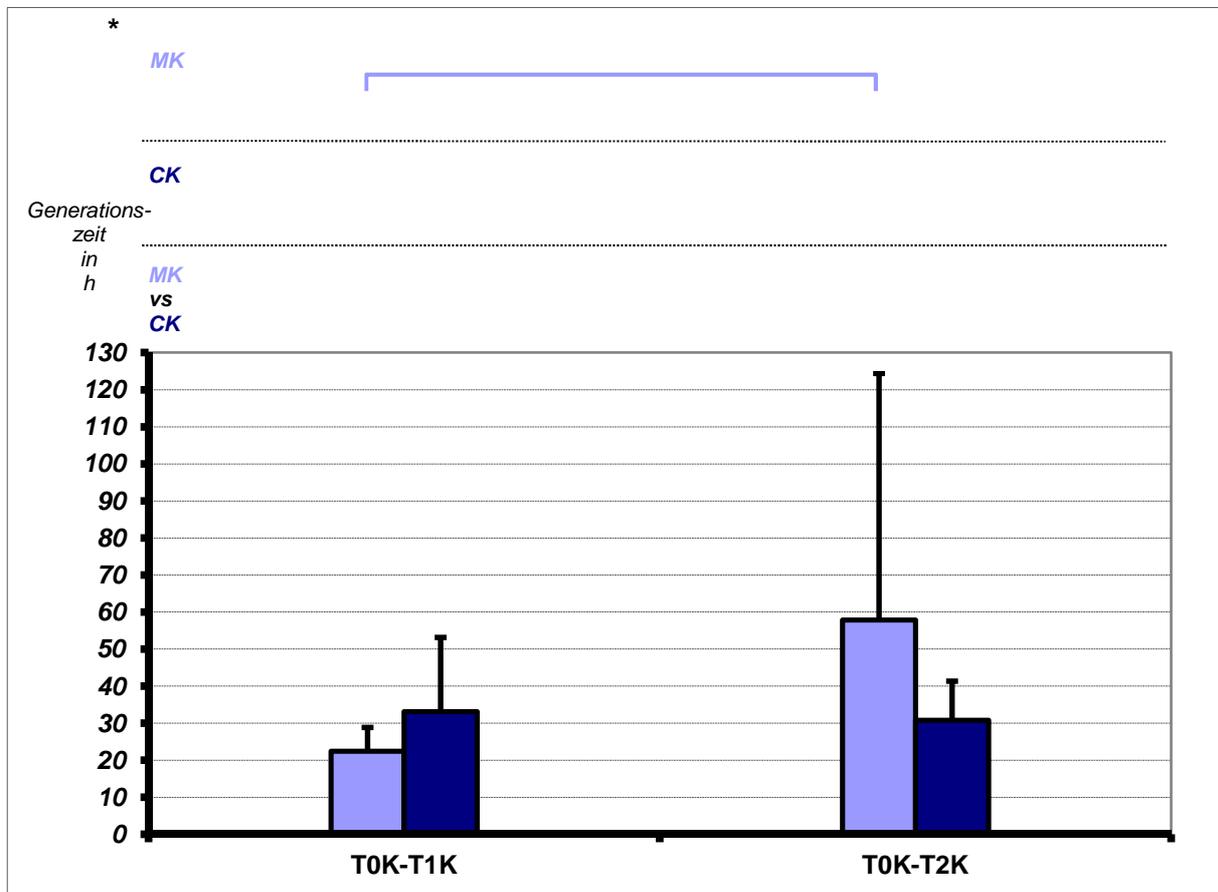


Abbildung 34: Generationszeiten der Wundfibroblasten in den Mono- und Co-Kulturen aus gut granulierenden Wunden (gG)

Verdopplungszeit der Wundfibroblasten in Stunden in Mono- (□, n=8) und Co-Kulturen (■, n=8) zu den Zeitpunkten 24 h (T0K-T1K) und 48 h (T0K-T2K) Normoxie. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In Mono-Kultur proliferierten die Fibroblasten in der Gruppe der gut granulierenden Wunden ähnlich den Fibroblasten der Gruppe der chronischen Wunden stärker an Tag 1. Die nach 2 Tagen berechnete Generationszeit war jedoch in Co-Kultur niedriger und zeigte einen deutlich positiven Einfluss der Endothelzellen auf die Fibroblasten der Gruppe der gut granulierenden Wunden an, der bei den Fibroblasten der Gruppe der chronischen Wunde nicht deutlich wurde (siehe Abb. 34).

4.4.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden

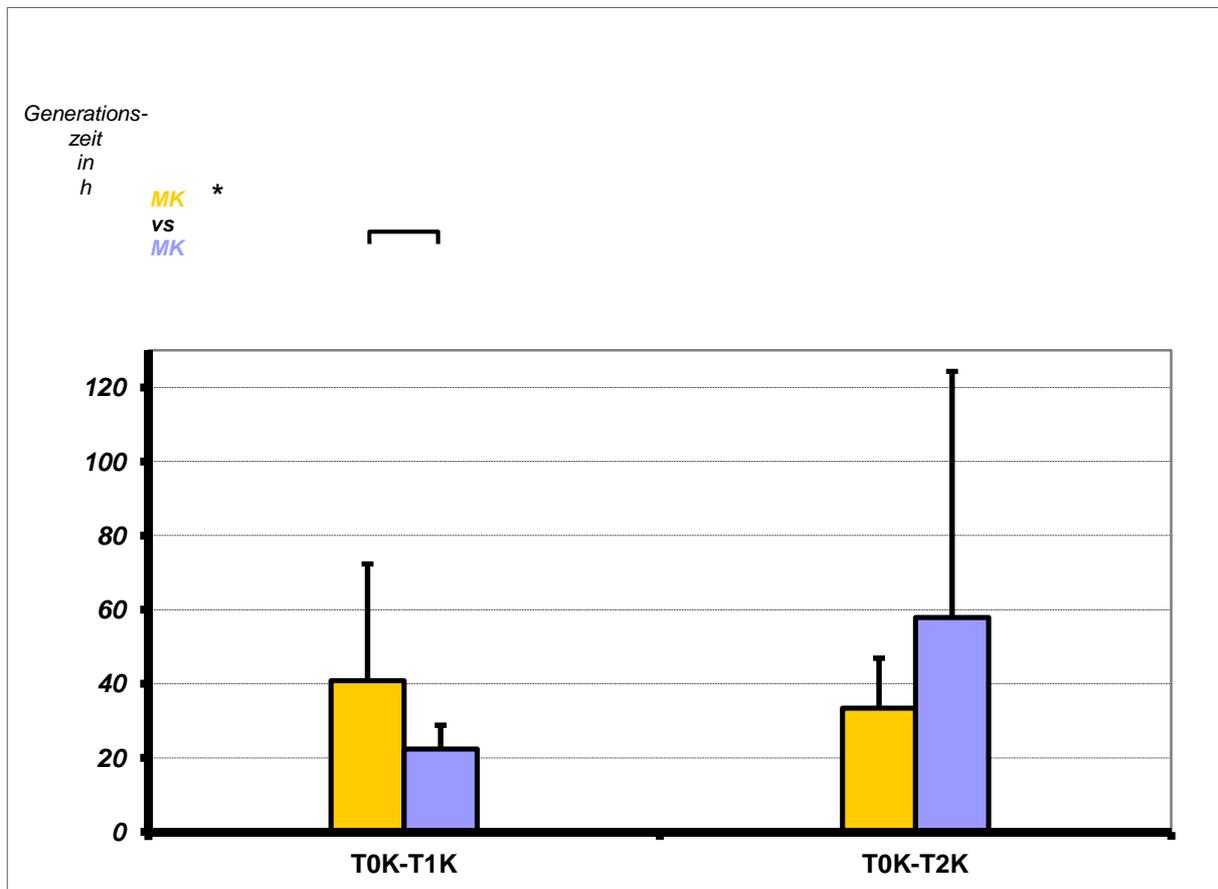


Abbildung 35: Vergleich der Generationszeiten zwischen den Mono-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Verdopplungszeit der Wundfibroblasten in Stunden im Vergleich der Mono-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) zu den Zeitpunkten 24 h (T0K-T1K) und 48 h (T0K-T2K) Normoxie. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In Mono-Kultur proliferierten die Fibroblasten aus der Gruppe gut granulierenden Wunden nach 24 h stärker als die Fibroblasten aus der Gruppe der chronischen Wunden. Nach 2 Tagen stellte man jedoch eine stärkere Proliferation der chronischen Wunden fest. (siehe Abb. 35).

In Co-Kultur wurde sowohl nach 24 h als auch nach 48 h bei den Fibroblasten der gut granulierenden Wunden eine geringere Generationszeit, d.h. bessere Proliferation gemessen (siehe Abb. 36).

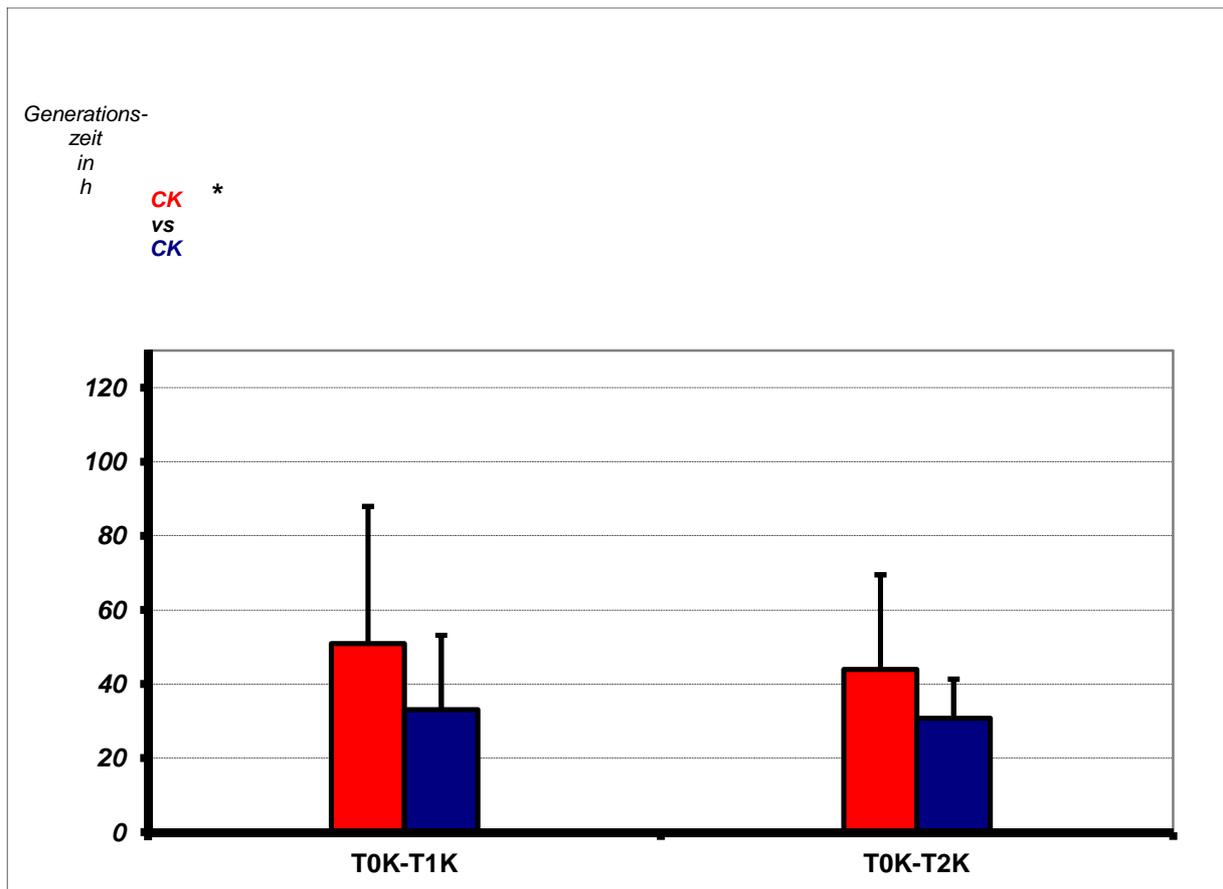


Abbildung 36: Vergleich der Generationszeiten zwischen den Co-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Verdopplungszeit der Wundfibroblasten in Stunden im Vergleich der Co-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) zu den Zeitpunkten 24 h (T0K-T1K) und 48 h (T0K-T2K) Normoxie. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.5 Myofibroblasten-Anteil

4.5.1 Chronische Wunden

4.5.1.1 Mono-Kultur

In Mono-Kultur der chronischen Wunden fiel der MF-Anteil von 33% nach 0 h, auf 22% nach 24 h und auf 16% nach 48 h ab (siehe Abb. 37). Mit 27% unter Hypoxie und 25% nach Reoxygenierung lagen die MF-Raten nach 24 h und 48 h über ihren normoxischen Kontrollen.

4.5.1.2 Co-Kultur

In Co-Kultur sank die MF-Rate initial von 23% an Tag 0 auf 19% an Tag 1 und stieg mit 22% an Tag 2 fast wieder auf ihren Ausgangswert an (siehe Abb. 37). Mit 21% und 19% unter Hypoxie und nach anschließender Reoxygenierung differenzierten sich die Fibroblasten an Tag 1 tendenziell stärker und an Tag 2 schwächer als ihre normoxischen Kontrollen zu MF.

4.5.1.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

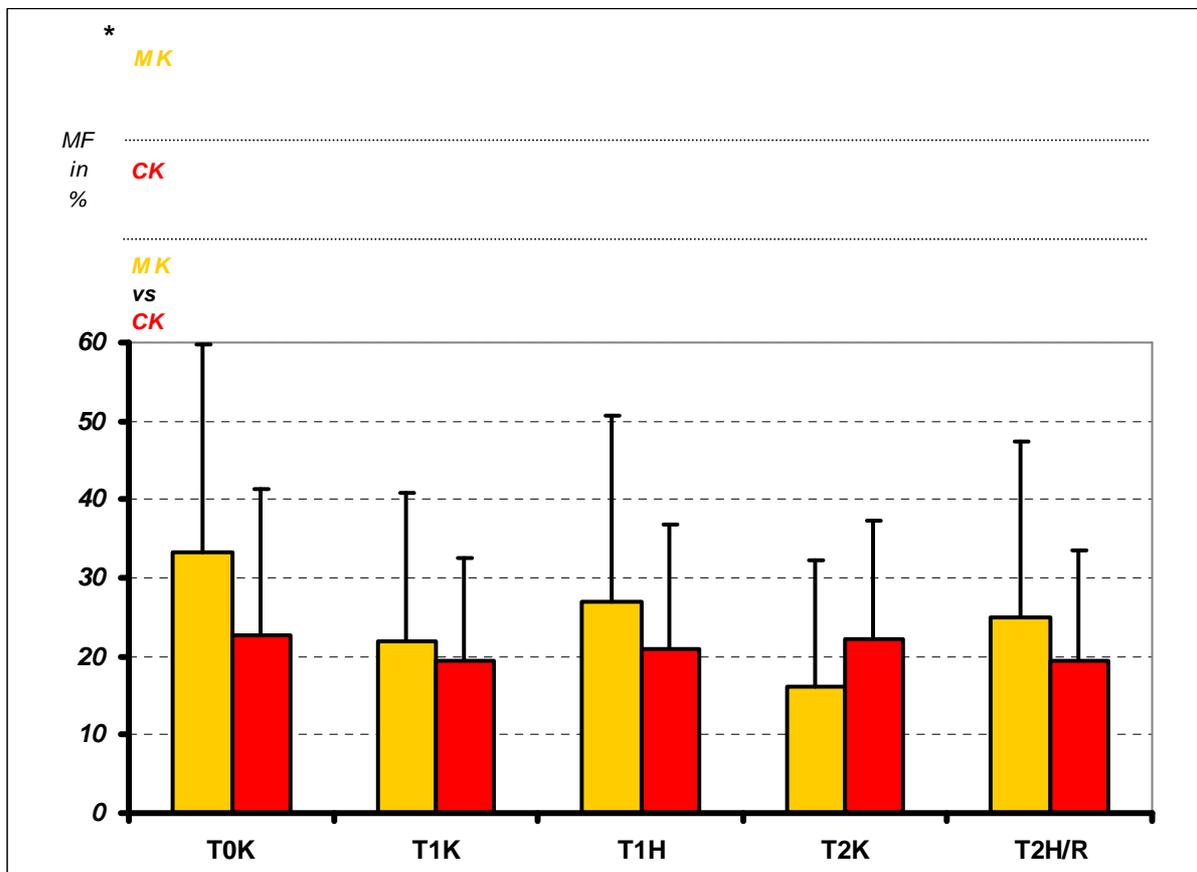


Abbildung 37: Myofibroblasten-Anteil in den Mono- und Co-Kulturen aus chronischen Wunden (cW)

Prozentualer Anteil an Myofibroblasten in der Fibroblasten-Population in Mono- (■, n=6) und Co-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In den chronischen Wunden wurde in der Mono-Kultur tendenziell höhere MF-Raten gemessen als in Co-Kultur (siehe Abb. 37). Gemeinsam war beiden Kulturen, dass sie an Tag 0 die höchsten MF-Raten aufwiesen und ihre Differenzierungsrate unter Hypoxie im Vergleich zu ihren Kontrollen anstieg.

4.5.2 Gut granulierende Wunden

4.5.2.1 Mono-Kultur

In Mono-Kultur der gut granulierenden Wunden fiel der MF-Anteil der Fibroblasten von 14% an Tag 0, auf 9% an Tag 1 und auf 5% an Tag 2 ab (siehe Abb. 38). Mit 9% unter Hypoxie und 8% nach Reoxygenierung entsprach die MF-Rate nach 24 h ihrer normoxischen Kontroll-Rate, nach 48 h lag sie darüber.

4.5.2.2 Co-Kultur

In Co-Kultur sank die MF-Rate initial geringgradig von 11% an Tag 0 auf 10% an Tag 1 (siehe Abb. 38). Nach 48 h war sie auf 13% angestiegen. Mit 7% und 8% unter Hypoxie und nach anschließender Reoxygenierung differenzierten sich die Fibroblasten an Tag 1 und 2 schwächer als ihre normoxischen Kontrollen zu MF.

4.5.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

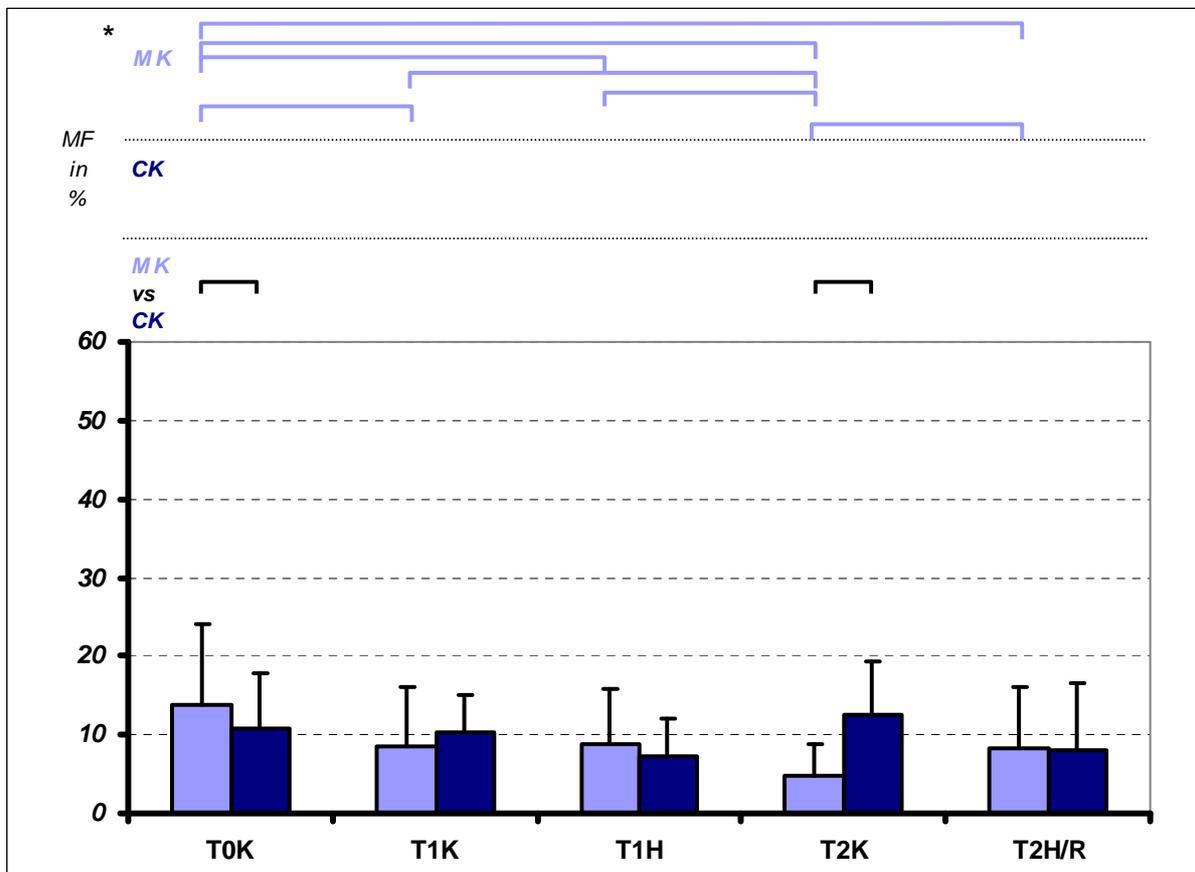


Abbildung 38: Myofibroblasten-Anteil in den Mono- und Co-Kulturen aus gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentualer Anteil an Myofibroblasten in der Fibroblasten-Population in Mono- (□, n=8) und Co-Kulturen (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In den Mono-Kulturen der gut granulierenden Wunden der wurden an Tag 1 und Tag 2 in Normoxie tendenziell geringere MF-Raten gemessen als in Co-Kultur (siehe Abb. 38). In Bezug zur Antwort auf Hypoxie waren die Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle indifferent.

4.5.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden

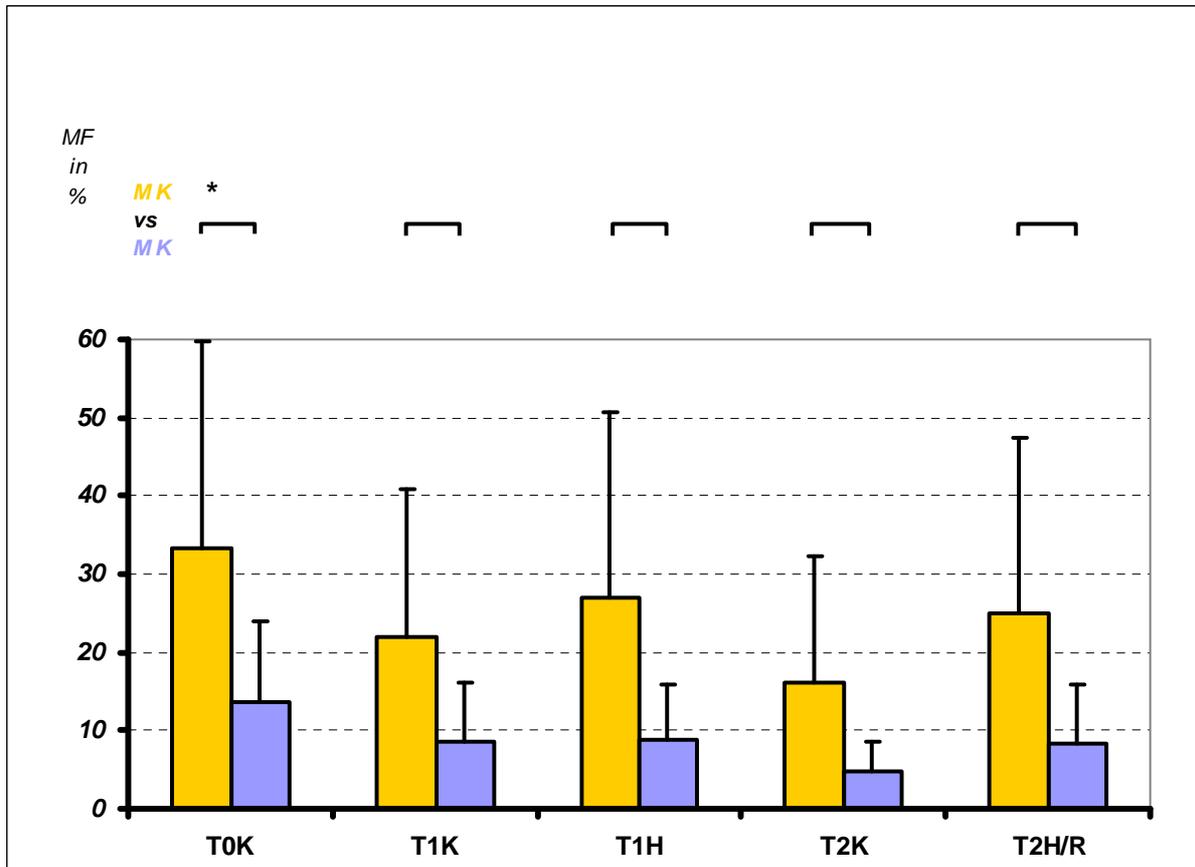


Abbildung 39: Vergleich des Myofibroblasten-Anteils zwischen den Mono-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentualer Anteil an Myofibroblasten in der Fibroblasten-Population im Vergleich der Mono-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; * $p \leq 0,05$.

Die Mono-Kultur der chronischen Wunde wies durchweg signifikant höhere Werte an MF auf (siehe Abb. 39). Die Mono-Kulturen beider Gruppen differenzierten unter Hypoxie und Reoxygenierung tendenziell stärker als ihre normoxischen Kontrollen.

Auch die Fibroblasten der Co-Kultur der chronischen Wunde differenzierten durchweg signifikant stärker als in der Gruppe der gut granulierenden Wunden (siehe Abb. 40). In Bezug auf die Antwort auf Hypoxie war der Vergleich der Co-Kulturen beider Gruppen uneinheitlich.

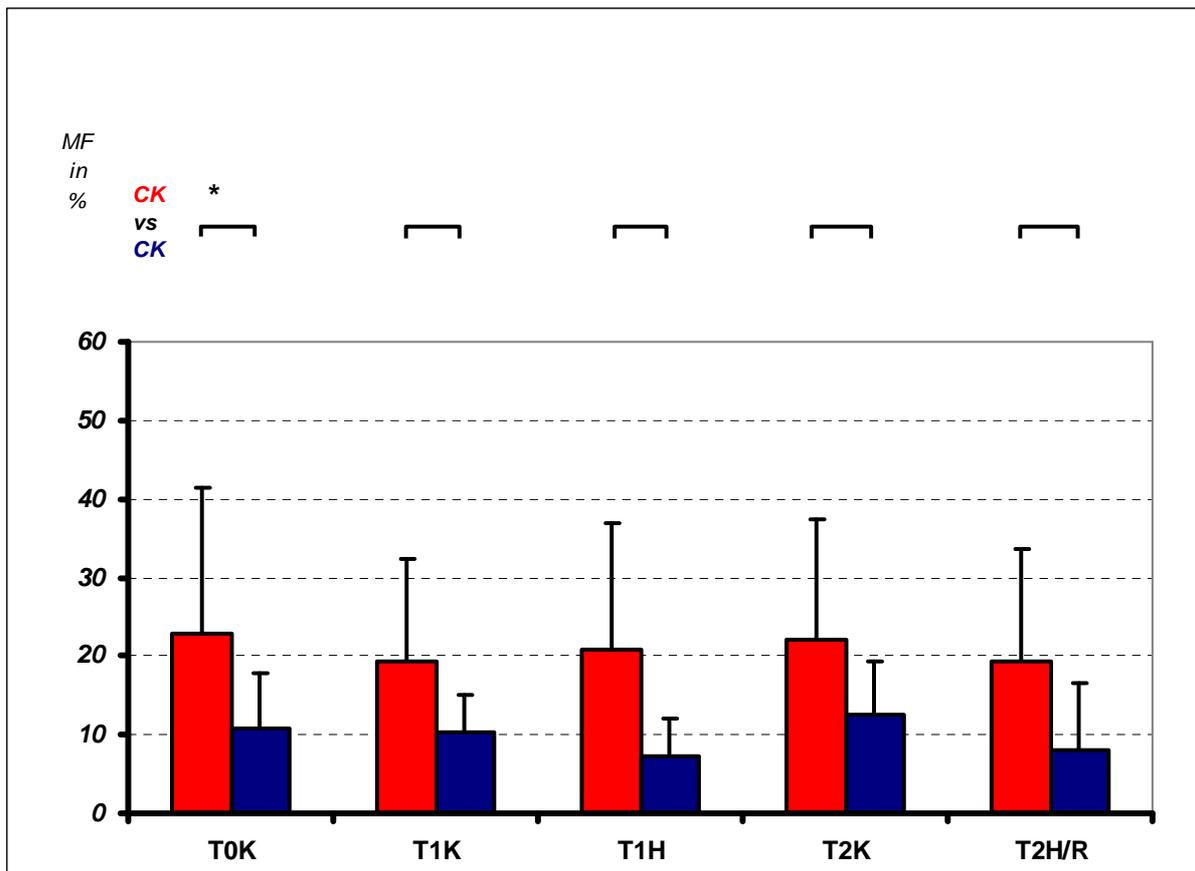


Abbildung 40: Vergleich des Myofibroblasten-Anteils zwischen den Co-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentualer Anteil an Myofibroblasten in der Fibroblasten-Population im Vergleich der Co-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.6 Endothelzell-Anteil

4.6.1 Chronische Wunden

Der Endothelzell-Anteil in der Gruppe der chronischen Wunden in Co-Kultur nahm über die Zeit hinweg gesehen ab (siehe Abb. 41). Er betrug an Tag 0 70% und sank auf 60% an Tag 1 bzw. 56% an Tag 2. Unter Hypoxie ging die Rate nach 24 h auf 51% zurück und stieg nach anschließender Reoxygenierung auf 54% an.

4.6.2 Gut granulierende Wunden

Der Endothelzell-Anteil der gut granulierenden Wunden nahm über die Zeit hinweg gesehen ebenfalls ab (siehe Abb. 41). Er betrug an Tag 0 65% und reduzierte sich auf 55% an Tag 1 bzw. 43% an Tag 2. Unter Hypoxie ging der Anteil nach 24 h auf 39% zurück und fiel nach anschließender Reoxygenierung leicht auf 37% ab.

4.6.3 Vergleich Endothelzell-Anteil chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden

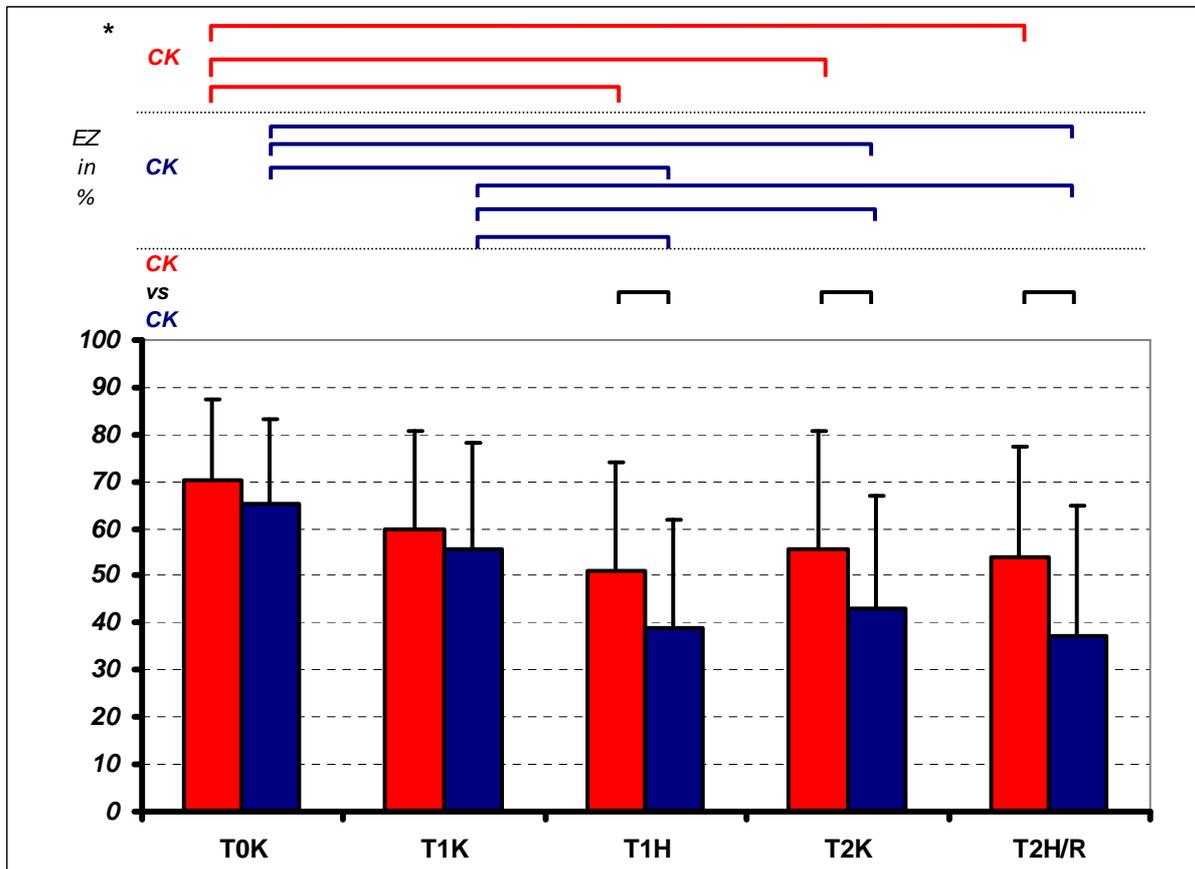


Abbildung 41: Vergleich des Endothelzell-Anteils zwischen den Co-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Prozentualer Anteil an Endothelzellen im Vergleich der Co-Kulturen aus chronischen (■, n=6) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

Der Anteil an Endothelzellen in der Co-Kultur der chronischen Wunden lag signifikant bzw. tendenziell über dem in den gut granulierenden Wunden (siehe Abb. 41). Es ließ sich in beiden Wundklassifikationen ein Abfall des Endothelzell-Anteils in Co-Kultur über die Zeit hinweg feststellen. Darüber hinaus beschleunigte Hypoxie in beiden Gruppen den Rückgang der Endothelzell-Populationen.

4.7 Interleukin-8-Konzentration

4.7.1 Chronische Wunden

4.7.1.1 Mono-Kultur

Die IL-8-Konzentration der Fibroblasten-Mono-Kultur bei chronischen Wunden fiel von initial 5,6 fg pro Zelle an Tag 0 über 1,5 fg pro Zelle nach 24 h auf 0,7 fg pro Zelle an Tag 2 (siehe Abb. 42). Im Vergleich zur Normoxie-Kultur war die IL-8-Konzentration unter Hypoxie mit 3,4 fg pro Zelle nach 24 h und 1,6 fg pro Zelle an Tag 2 nach Reoxygenierung tendenziell erhöht.

4.7.1.2 Co-Kultur

Die IL-8-Konzentration der Co-Kultur fiel von anfangs 6,0 fg pro Zelle an Tag 0 leicht auf 5,9 fg pro Zelle nach 24 h und stieg allerdings bis auf bis zu 9,3 fg pro Zelle an Tag 2 an (siehe Abb. 42). Analog zur Mono-Kultur war die IL-8-Konzentration unter Hypoxie mit 6,7 fg pro Zelle nach 24 h und 16,4 fg pro Zelle an Tag 2 nach Reoxygenierung erhöht.

4.7.1.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

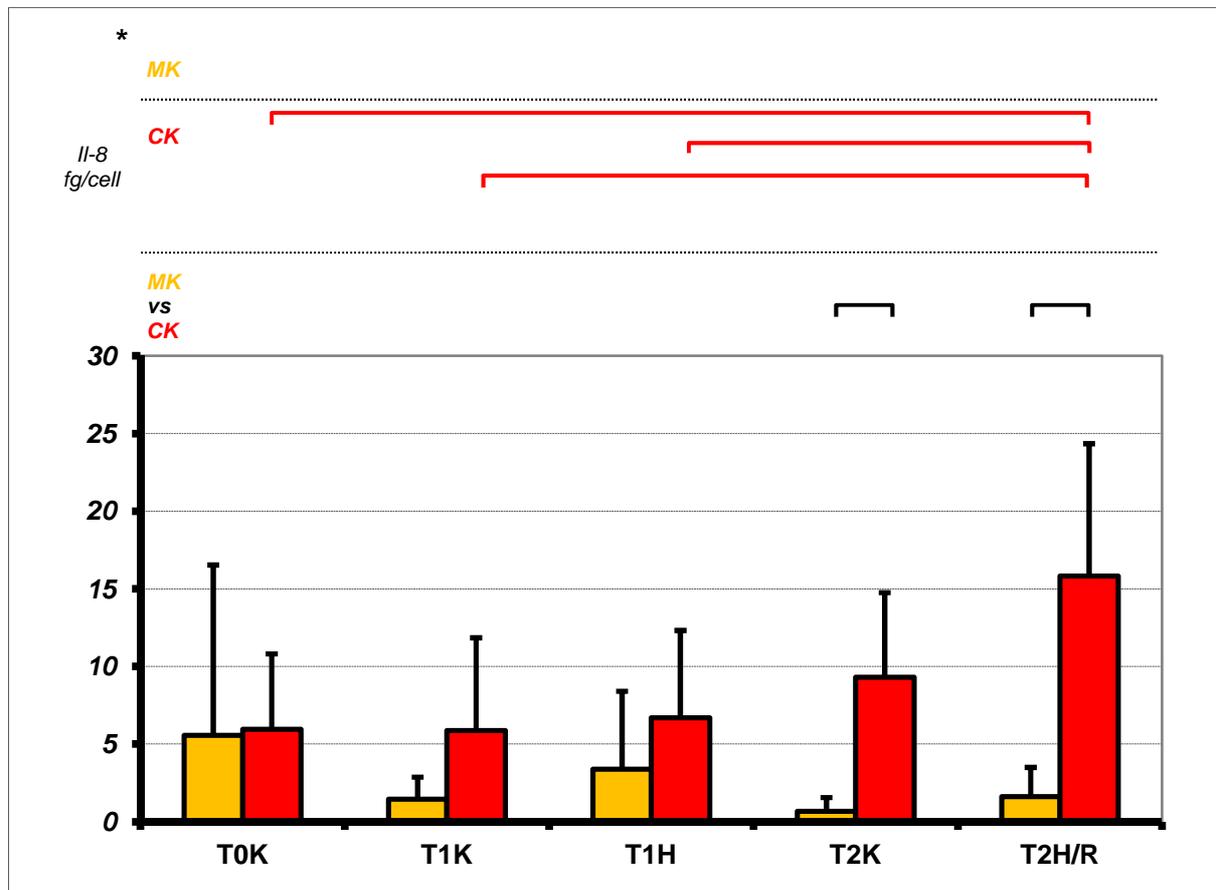


Abbildung 42: Interleukin-8-Konzentration der Mono- und Co-Kulturen aus chronischen Wunden (cW)

Interleukin-8-Konzentration in fg pro Zelle von Mono- (■, n=5) und Co-Kulturen (■, n=5) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In der Co-Kultur lag die IL-8-Konzentration durchweg höher als in Mono-Kultur (siehe Abb. 42). In beiden Kulturen steigt die IL-8-Konzentration der Hypoxie- und der Reoxygenierungskultur gegenüber ihrer normoxischen Kontroll-Gruppe an.

4.7.2 Gut granulierende Wunden

4.7.2.1 Mono-Kultur

Die IL-8-Konzentration der Fibroblasten-Mono-Kultur bei gut granulierenden Wunden stieg von initial 1,7 fg pro Zelle an Tag 0, über 1,9 fg pro Zelle nach 24 h, bis zu 2,4 fg pro Zelle an Tag 2 an (siehe Abb. 43). Im Vergleich zur Normoxie-Kultur erhöhte sich die IL-8-Konzentration unter Hypoxie mit 2,8 fg pro Zelle nach 24 h und 4,9 fg pro Zelle an Tag 2 nach Reoxygenierung.

4.7.2.2 Co-Kultur

Die IL-8-Konzentration der Co-Kultur fiel von anfangs 7,6 fg pro Zelle an Tag 0 auf 5,0 fg pro Zelle an Tag 1 und stieg nochmals leicht auf 5,3 fg pro Zelle an Tag 2 an (siehe Abb. 43). Unter Hypoxie erhöhte sich die IL-8-Konzentration mit 7,3 fg pro Zelle nach 24 h und 11,7 fg pro Zelle an Tag 2 nach Reoxygenierung gegenüber der Normoxie-Kultur.

4.7.2.3 Vergleich Mono-Kultur vs. Co-Kultur

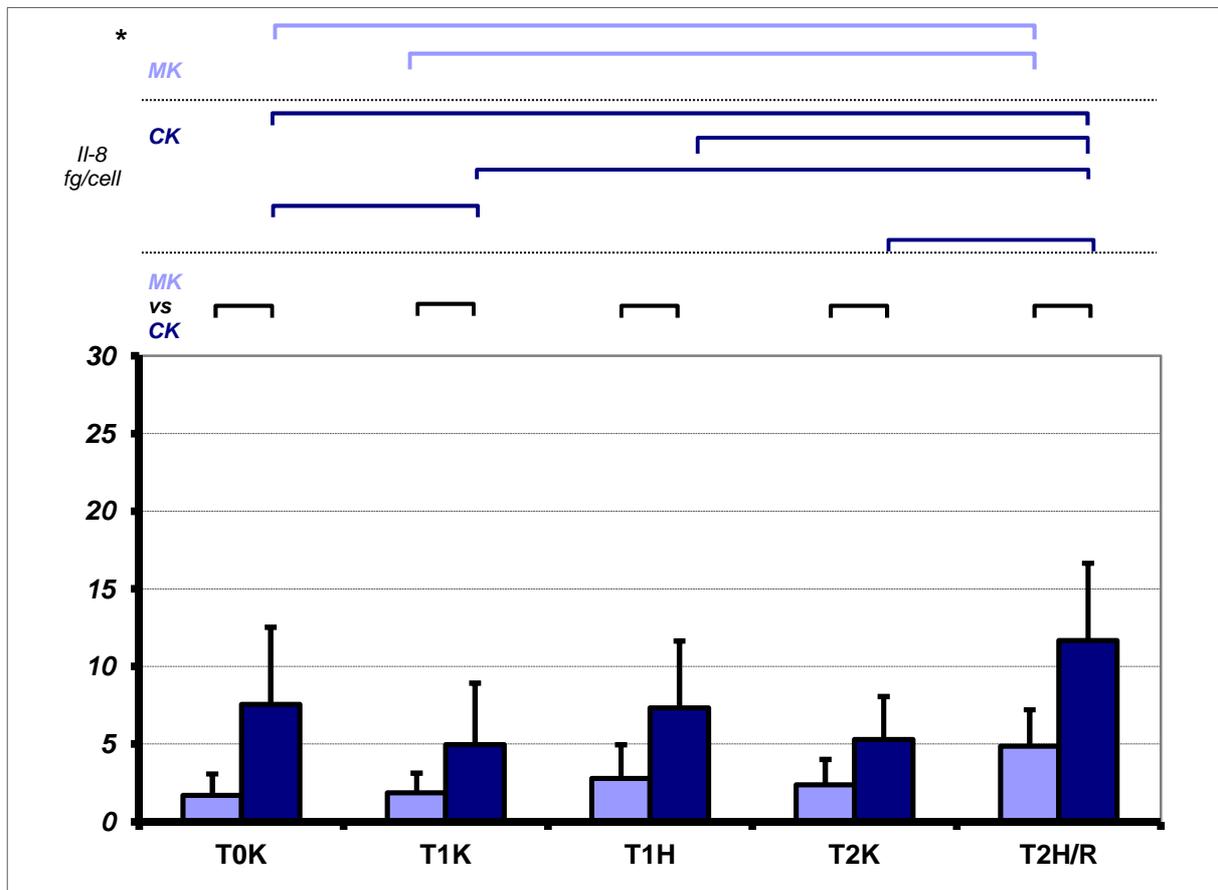


Abbildung 43: Interleukin-8-Konzentration der Mono- und Co-Kulturen aus gut granulierenden Wunden (gG)

Interleukin-8-Konzentration in fg pro Zelle von Mono- (■, n=8) und Co-Kulturen (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

In Co-Kultur lag die IL-8-Konzentration durchweg signifikant höher als in Mono-Kultur (siehe Abb. 43). In beiden Kulturen stieg die IL-8-Konzentration der Hypoxie- und der Reoxygenierungs-Kultur gegenüber ihrer normoxischen Kontroll-Gruppe an.

4.7.3 Vergleich chronische Wunden vs. gut granulierende Wunden

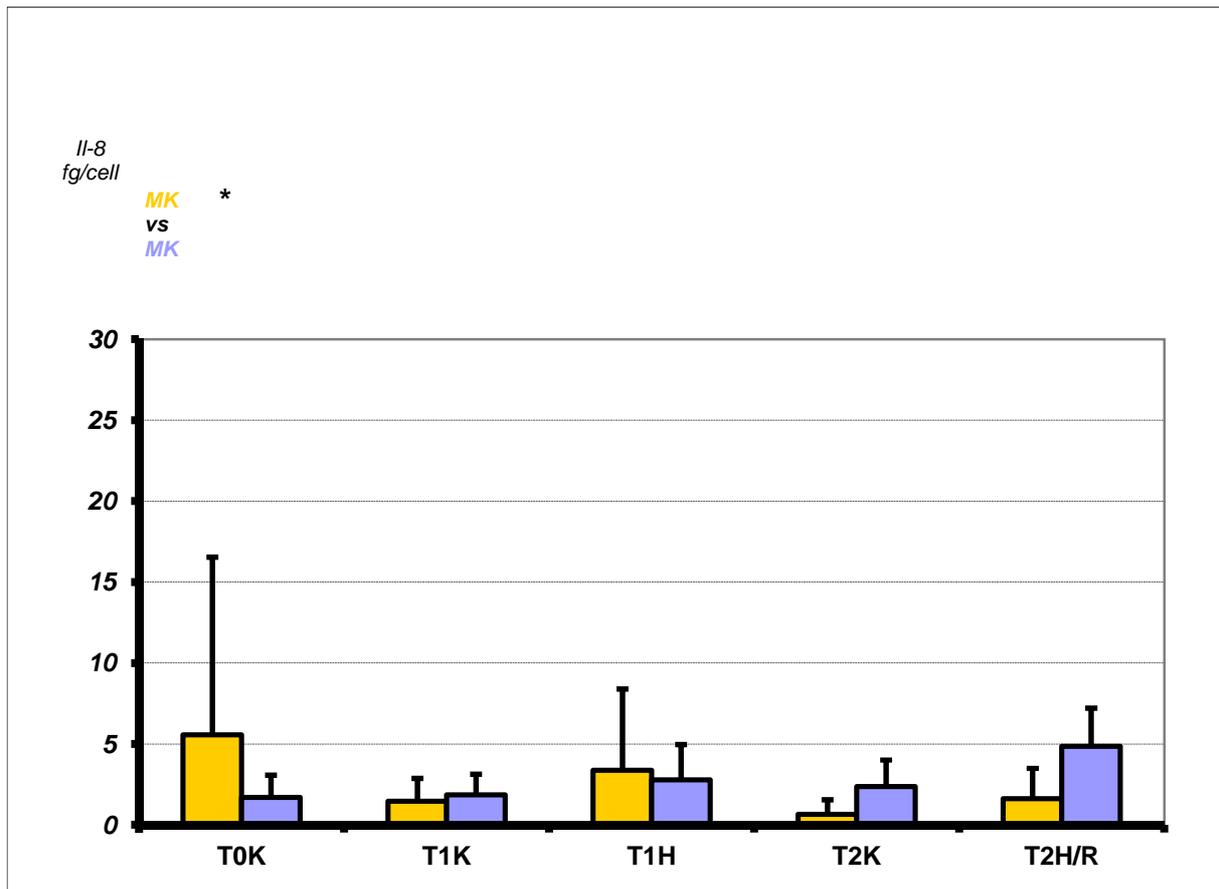


Abbildung 44: Vergleich der Interleukin-8-Konzentration zwischen den Mono-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Interleukin-8-Konzentration in fg pro Zelle im Vergleich der Mono-Kulturen aus chronischen (■, n=5) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; * $p \leq 0,05$.

In Mono-Kultur zeigten sich sowohl in den chronischen als auch in den gut granulierenden Wunden tendenziell erhöhte IL-8-Konzentrationen in den Hypoxie- und Reoxygenierungspräparaten (siehe Abb.44). Während in der Gruppe der chronischen Wunden die IL-8-Konzentration kontinuierlich abnahm, stieg sie in der Gruppe der gut granulierenden Wunden etwas an.

Beide Co-Kulturen reagierten auf Hypoxie- und Reoxygenierung mit einem Konzentrationsanstieg (siehe Abb. 45).

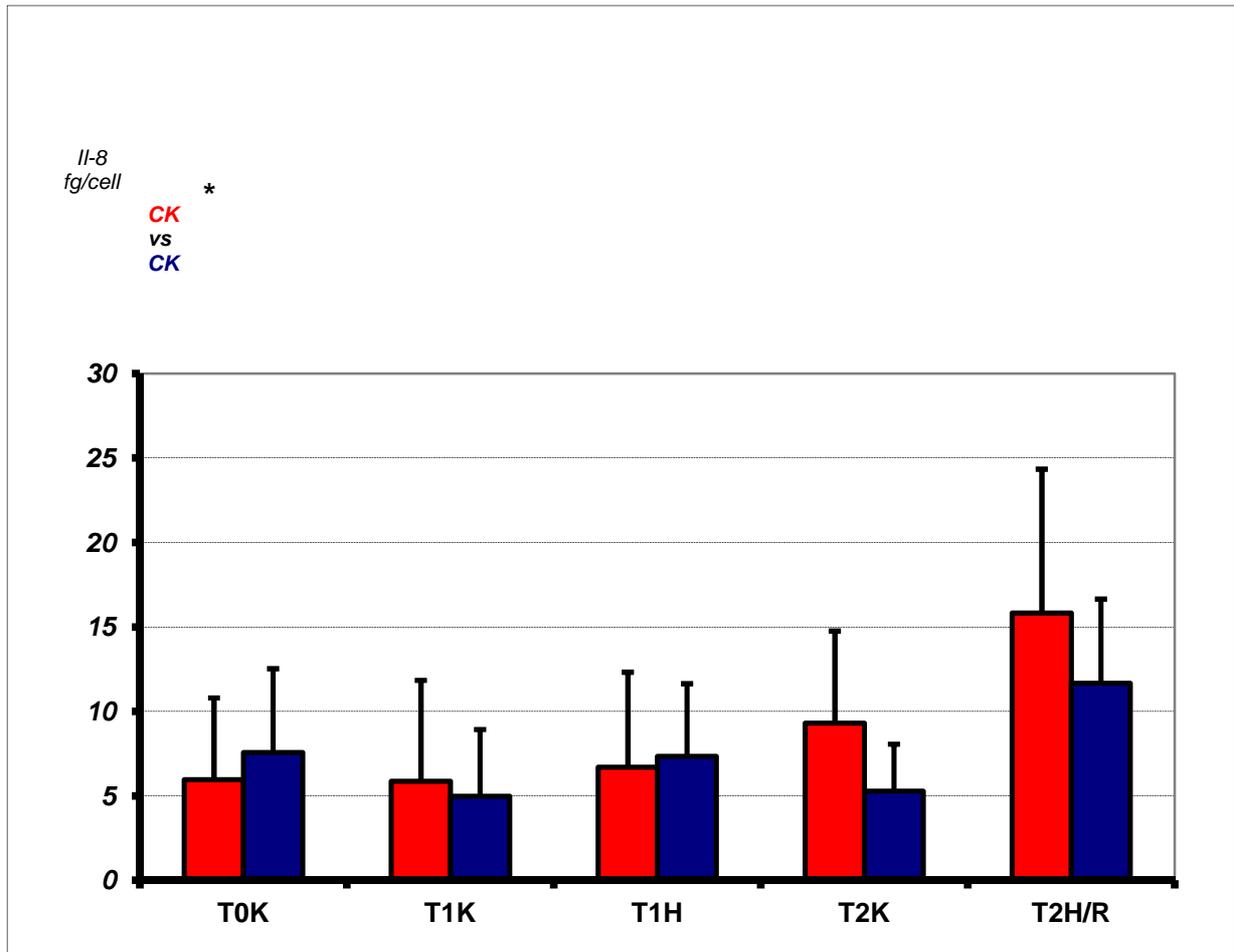


Abbildung 45: Vergleich der Interleukin-8-Konzentration zwischen den Co-Kulturen aus chronischen (cW) und gut granulierenden Wunden (gG)

Interleukin-8-Konzentration in fg pro Zelle im Vergleich der Co-Kulturen aus chronischen (■, n=5) und gut granulierenden Wunden (■, n=8) nach initial 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24 h normoxischer Reoxygenierung (T2H/R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

5. Diskussion

Diese Arbeit führt das bereits standardisierte Modell des zweidimensionalen In-vitro-Wundheilungsassays (CCSWMA) aus NHDF und HDMEC weiter, indem es humane dermale Wundfibroblasten und HDMEC kombiniert, um deren Interaktion darzustellen und zu untersuchen.

Co-Kultur-Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde ein bereits eingeführter Co-Kultur-Assay (Oberringer et al. 2007) derart modifiziert, dass mit seiner Nutzung eine Unterscheidung verschiedener Wundfibroblasten ex vivo möglich sein sollte.

Die Zelldichte in unserem Modell musste so gewählt werden, dass sowohl die initiale In-vitro-Wunde zu Beginn sichtbar, als auch Veränderungen im Verlauf in den jeweils folgenden 48 h feststellbar waren. Das mechanische Erzeugen von Wunden in vitro wurde in der Vergangenheit auf verschiedene Art und Weise durchgeführt: mit Hilfe von Rasierklingen (Burk 1973), Silikonspitzen (Watanabe et al. 1994) oder chemisch mit Lauge (Buisson et al. 1996). Unabhängig von der Methode ließ sich dabei erkennen, dass eine Kombination aus Migration und Proliferation in den zellfreien Bereich hinein den Wundschluss herbeiführt (Calderon et al. 1996). Ziel war es, eine Situation zu schaffen, die der menschlichen In-vivo-Wundheilung in vitro so nahe wie möglich kommt.

Wir verwendeten Pipettenspitzen, um die In-vitro-Wunden herzustellen. In unseren vorangegangenen Arbeiten hatten wir mit einer 1000 µl Eppendorf-Pipettenspitze und mit einer 5 ml Einmal-Plastikpipette gearbeitet, die unterschiedliche Breiten der Wundspalten hervorbrachten (Oberringer et al. 2007). Die resultierenden mittleren Wundspaltbreiten differierten dabei nur geringgradig. Die durch die 5 ml Einmal-Plastikpipette erzeugten Spaltbreiten wiesen eine größere Standardabweichung auf, so dass die 1000 µl Eppendorf-Pipettenspitze für zukünftige Anwendungen geeigneter schien und somit in der vorliegenden Arbeit ausschließlich verwendet wurde.

Als schwierig erwies sich, standardisierte Zelldichten zu Versuchsbeginn zu erreichen, da die humanen Wundfibroblasten und insbesondere die chronischen Wundfibroblasten deutlich schlechter initial in Zellkultur anwachsen und proliferieren als die NHDF. Zusammen mit den sehr konstant proliferierenden HDMEC war es daher nicht möglich, bei Versuchsbeginn immer gleiche Zellzahl-Verhältnisse zwischen den beiden Zelltypen herzustellen. In

Einzelfällen musste vom geplanten Kultivierungsschema mit definierten Zeitpunkten geringfügig abgewichen werden, um zu große Schwankungen auszugleichen.

Um die Komponente Wundfibroblast erweitert, untermauert das Modell insgesamt seinen Anspruch, den Einfluss heilungsrelevanter Parameter auf unterschiedliche Zelltypen überprüfen zu können.

Die experimentellen Parameter dieser Studie waren:

1. Die Migration und die Proliferation verschiedener Zelltypen sowie die MF-Differenzierung bezogen auf die Heilungstendenz der den Wundfibroblasten zugrunde liegenden Wunde.
2. Die Hypoxie als essentieller Faktor zu Beginn der Wundheilung (Trabold et al. 2003) und generelle Einflussgröße, insbesondere bei der Pathogenese von chronischen Wunden.
3. Die Messung des abgegebenen IL-8 als genereller Indikator für entzündliche Prozesse im Rahmen der Wundheilung.
4. Zusätzliche Gruppierung der Patienten nach Alter und Nikotinkonsum.

Proliferation

Der Begriff Proliferation beschreibt in vitro den Vorgang der Zellvermehrung. Zumeist wird zur Quantifizierung dieses Parameters die Zelldichte herangezogen, um aus Zellzählungen zu bestimmten Zeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h) Aussagen über die Dynamik des Zellwachstums zwischen diesen Zeitpunkten treffen zu können (Calderon et al. 1996). In unserem Modell erfassten wir aber mit der MIB-Rate und der errechenbaren Generationszeit zwei weitere Parameter, mit der sich die Proliferation charakterisieren lässt.

Das Ausmaß der Proliferation lässt sich aber nicht nur anhand der Zelldichte berechnen, sondern ist auch von Letzterer abhängig. So wurde in früheren Arbeiten beschrieben, dass die Proliferation von NHDF in vitro umso größer ist, je geringer die Dichte ist (Powell et al. 1999, Masur et al. 1996). Dies bestätigten unsere Wundfibroblasten in Mono-Kultur, gleich welcher Heilungstendenz, die innerhalb der ersten 24 h unter Normoxie die stärkste Proliferation zeigten. Dies stimmte mit den Ergebnissen der vorherigen Arbeiten am Modell überein (Oberringer et al. 2007, Breit et al. 2011).

Die Co-Kultivierung bewirkte im Vergleich zur Mono-Kultivierung eine etwas abgeschwächte Proliferation der Fibroblasten mit einem Maximum bei den gG-Fibroblasten am ersten Tag und bei den cW-Fibroblasten am zweiten. Über die komplette Versuchsdauer hinweg profitierten die Wundfibroblasten aus den gut granulierenden Wunden von der Interaktion mit den HDMEC gegenüber der Mono-Kultivierung. In den cW konnten die Fibroblasten kein Kapital aus dem Zusammenspiel mit den Endothelzellen schlagen, was sich in einer Verlängerung ihrer Generationszeiten bemerkbar machte. Die MIB-Raten waren bei beiden Wundtypen in Co-Kultivierung tendenziell erhöht. Dies erscheint im Hinblick auf die verminderte Proliferation in den cW zwar widersprüchlich, lässt sich jedoch durch die Tatsache relativieren, dass sich MIB-positive Zellen nicht zwangsläufig in der Zellteilung befinden müssen, sondern nur der Ruhezustand (Zellzyklusphase G_0) bei diesen Zellen ausgeschlossen ist. Im Umkehrschluss kann man feststellen, dass cW- und gG-Fibroblasten beide fast den gleichen Anteil an Zellen in Phase G_0 besitzen.

Erwähnenswert ist zudem, dass die Fibroblasten aus den chronischen Wunden in Mono- und Co-Kultur in den zweiten 24 h stärker proliferierten als die aus den gut granulierenden Wunden. Einerseits könnte dies zwar, wie bereits erwähnt, mit den geringeren Zelldichten der cW zusammenhängen, andererseits hatten wir bei unseren vorangegangenen Arbeiten mit NHDF bei weitaus höheren Ausgangszelldichten eine stärkere Proliferation zu verzeichnen.

Eine starke Hemmung des Zellwachstums konnten wir bei den HDMEC in Co-Kultur feststellen. Bei den Co-Kulturen mit Fibroblasten aus der Gruppe der cW stagnierte die Zellzahl der Fibroblasten auf dem Niveau von Tag 0, bei den Co-Kulturen mit Fibroblasten

aus der Gruppe der gG erhöhte sich die Fibroblasten-Zellzahl bis Versuchsende geringfügig um 25%, was insgesamt mit einer Reduktion des Endothelzell-Anteils bei beiden Wundklassifikationen einherging. Die MIB-Rate als Proliferationsmarker lag mit 20-30% positiven Zellen bei den HDMEC konstant deutlich unter der der Fibroblasten (55-75%). Dieser Einfluss der Co-Kultivierung bestätigte nicht nur die Ergebnisse unserer vorherigen Studien, sondern wurde auch schon bei der Interaktion von kardialen Fibroblasten mit humanen Umbilicalvenen-Endothel-Zellen (HUVEC) beschrieben, wobei letztere hierunter eine schlechtere Proliferation zeigten (Zhao & Eghbali-Webb 2001). Auch in weiteren Arbeiten fand man ähnliche Effekte: eine Unterdrückung der Endothelzellproliferation in Co-Kultur mit Perizyten (Orlidge & D' Amore 1987) und umgekehrt eine gesteigerte Monozyten-Proliferation durch co-kultivierte Endothelzellen (Pakala & Benedict 1999).

Migration

Die Migration der beteiligten Zelltypen ist neben der Proliferation essentielle Voraussetzung für den Wundverschluss während der Wundheilung.

Generell kam es über die gesamten 48 h hinweg zu einem signifikanten Spaltschluss in beiden Wundklassifikationen in den Mono- und den Co-Kulturen. Die gut granulierenden Wunden schlossen sich erwartungsgemäß, wenn auch größtenteils nicht signifikant, schneller in beiden Kultivierungen. In vivo wurde bereits eine verminderte Migrationsfähigkeit für die ausbleibende Heilung chronisch venöser Bein-Ulcera (CVU) verantwortlich gemacht (Raffetto et al. 2001, Wall et al. 2008).

Innerhalb der Gruppe der chronischen Wunden scheint die Co-Kultivierung unter Normoxie keine nennenswerten Effekte zu haben, da nach 48 h sowohl Mono- als auch Co-Kultur-Wundspalte zu ca. 60% geschlossen waren. Das Bild bei den gG war durch stärkere Migration am ersten Tag in Mono-Kultur gekennzeichnet, die zu einer Reduktion der Spaltbreite auf knapp die Hälfte führte. Am Versuchsende hatte jedoch die Co-Kultivierung zu gut 3/4 den Wundschluss vollzogen und damit geringfügige Vorteile gegenüber der Mono-Kultivierung. Unsere Daten zeigen, wie schon eine weitere unserer Arbeiten mit NHDF (Breit et al. 2010), ebenfalls keinen erwähnenswerten Effekt der Co-Kultivierung auf die Migration der Fibroblasten. Der schnellere Spaltschluss der gG gegenüber den cW könnte demnach auf die höhere Zelldichte der gG-Kulturen zurückgeführt werden.

Im Vergleich mit unseren vorherigen Studien (Oberringer et al. 2007, Breit et al. 2011) konnte somit die dort gezeigte stärkere Migrationsfähigkeit der NHDF in Mono-Kultivierung nicht durch unsere humanen Wundfibroblasten reproduziert werden. Allerdings könnten jene

Ergebnisse in der dort mehr als 2-fach höheren Zelldichte in der Mono-Kultur im Vergleich zur Co-Kultur begründet sein.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass eine mangelnde Migrationsfähigkeit der beteiligten Fibroblasten für die gestörte Heilung in den untersuchten chronischen Wunden nach unseren Erkenntnissen eher nicht in Frage kommt.

Myofibroblasten-Differenzierung

Bereits 1971 beschrieb Gabbiani differenzierte Fibroblasten im Rahmen der Wundheilung, die er als Myofibroblasten bezeichnete. Sie werden unter anderem durch proinflammatorische Zytokine in der frühen Phase der Wundheilung aktiviert und tragen durch die Bildung von Wachstumsfaktoren, Matrixproteinen und ihrer Fähigkeit zur Steigerung der Wundkontraktion (Hinz 2007, Gabbiani 2003) entscheidend zum Wundheilungsprozess bei. Des Weiteren wird ihr Beitrag zur Angiogenese ausführlich in der Literatur diskutiert (Nakatsu et al. 2003, Berthod et al. 2006, Hughes 2008).

In unseren Versuchen beobachteten wir in beiden Wundklassifikationen in Mono-Kultivierung über die gesamte Versuchsdauer stabile MF-Zahlen, wohingegen sie in Co-Kultivierung anstiegen. Allerdings proliferierten in beiden Kultivierungen die Fibroblasten in Relation stärker, so dass der MF-Anteil in den Mono-Kulturen während der 48 h sank und in den Co-Kulturen auf niedrigerem Ausgangsniveau stabil blieb. Die Co-Kultivierung durch HDMEC scheint also einerseits einen dämpfenden aber andererseits auch stabilisierenden Einfluss auf die Differenzierung von Fibroblasten zu MF zu haben, worauf auch schon andere Publikationen hindeuteten (Powell et al. 1999). Unsere beiden Vorgängerstudien zeichneten sich durch eine kontinuierlich stärker abfallende MF-Differenzierungsrate (MFDR) bei NHDF aus.

In der Gruppe der chronischen Wunden lag die MFDR zu allen Zeitpunkten signifikant über denen der gut granulierenden Wunden, sowohl in Mono- und als auch in Co-Kultur. So war die MFDR auch im Mittel unter Normoxie in Mono- und Co-Kultur in der Gruppe der chronischen Wunden mit 24% bzw. 21% durchweg signifikant höher als in der Gruppe der gut granulierenden Wunden mit 9% bzw. 11%. In den bereits oben genannten Versuchen mit Fibroblasten aus CVU von Raffetto et al. (2001) wurde neben der verminderten Migration auch eine erhöhte MFDR im Vergleich zu gesunden dermalen Fibroblasten festgestellt. Weiterhin bestätigte die Gruppe Ergebnisse anderer Studien, bei denen mit Wundsekret aus CVU versetzte neonatale Fibroblasten sowohl eine signifikante Migrationshemmung zeigten, als auch eine erhöhte MFDR (Bucalo et al. 1993, Mendez et al. 1999). Es darf also

zumindest spekuliert werden, dass die gesteigerte MF-Differenzierung zu einer verminderten Migration in chronischen Wunden führt. In diesem Zusammenhang seien auch Daten erwähnt, die zeigen, dass α -SMA-Expression zu einer verringerten Motilität von Fibroblasten führt (Ronnov-Jessen & Petersen 1996).

Schon in früheren Arbeiten wurde die entscheidende Rolle der MF bei hypertropher Narbenbildung betont und Zusammenhänge zwischen dem Verlust von Endothelzellen und der Zunahme von MF gezogen (Darby et al. 1990, Desmouliere et al. 2005, Karasek 2007). Eventuell spielen ähnliche Vorgänge auch bei unseren Fällen in der Gruppe der in unserem Fall vorliegenden chronischen Wundheilungsstörung eine Rolle.

In den vorangegangenen Arbeiten (Oberringer et al. 2007, Breit et al. 2011) waren erhöhte MFDR unter Hypoxie aufgefallen. Bestätigt wurden diese Resultate in der Literatur durch Untersuchungen der Differenzierung von Adventitia-Fibroblasten aus Lungenarterien, bei denen unter Hypoxie-Bedingungen ebenfalls erhöhte MF-Zahlen gemessen wurden (Short et al. 2004). Allerdings existieren auch Forschungsergebnisse, die der Hypoxie keinen Einfluss auf die MFDR beimessen (Eul et al. 2006) oder gar supprimierende Wirkung zeigen (Modarressi et al. 2010). Die vorliegende Arbeit spiegelt diese differenzierten Ergebnisse wieder: Die cW-Fibroblasten differenzierten unter Hypoxie in Mono- und Co-Kultivierung stärker als unter Normoxie. Bei den gG war tendenziell eher das Gegenteil der Fall, sie exprimierten insbesondere in Co-Kultur unter Sauerstoff-Mangel weniger MF. So könnte man schlussfolgern, dass die cW-Fibroblasten mit ihrem ohnehin schon höheren MF-Anteil unter Hypoxie, die als wichtige Einflussgröße zur Entstehung von chronischen Wunden gilt (Gordillo & Sen 2003, Sen 2009), mit einer Überpräsentation von MF reagieren, was letztendlich auf lange Sicht zu einer gestörten Wundheilung führt. Im Gegensatz dazu stehen Überlegungen, dass die MF in der frühen Phase der Wundheilung unter zumeist hypoxischen Bedingungen die Endothelzellen im Hinblick auf die Angiogenese unterstützen (Powell et al. 1999, Gabbiani 2003).

Es liegt nahe, dass den Fibroblasten der Gruppe der cW ein Mechanismus fehlt, der die Reduktion der MF-Population im Laufe der Heilung reguliert.

Auf die 24-stündige Reoxygenierungsphase nach vorangegangener Hypoxie reagierten beide Wundklassifikationen in Mono- und Co-Kultur mit einer annähernd gleichbleibenden MFDR.

Einfluss der Hypoxie/Reoxygenierung

Hypoxie zählt zu den wichtigen Einfluss- und Triggerfaktoren der frühen Phase der Wundheilung. Milde Hypoxie wird generell als ein Stimulus zu Anpassungsvorgängen im Organismus, wie zum Beispiel der Angiogenese, angesehen, extreme oder chronische Hypoxie führt zu Heilungsstörungen und Zelltod (Sen et al. 2009). Da die Ausprägungsgrade der Hypoxie fließend sind und unterschiedlich definiert werden, sind die Beurteilung und die Interpretation der Literaturergebnisse generell erschwert. Die in unserem Versuchssetup verwendete Hypoxie lässt sich am ehesten mit einer akuten, harten Hypoxie beschreiben.

Reoxygenierung definiert die Phase, die auf eine Zeitspanne der unzureichenden Sauerstoff-Versorgung des Gewebes (meist durch Ischämie verursacht) folgt und bei Ereignissen wie Thrombolyse-Therapie, akutem Nierenversagen oder nach Transplantationen auftritt. Wir erweiterten unser Versuchssetup um diese Einflussgröße, um ihre Auswirkung bzw. ihre Relevanz für die Weichteilheilung zu ermitteln.

Unsere Ergebnisse zeigten bei den hypoxisch kultivierten Mono-Kulturen in den cW und gG eine deutliche Abnahme der Zelldichte um knapp 40% gegenüber der Normoxie. Von der anschließenden Reoxygenierung konnten die cW-Fibroblasten mit einer Zuwachsrate von 25 % stärker profitieren als die gG-Fibroblasten (12%). Im Falle der Co-Kulturen war der Impact der Hypoxie auf die Zelldichte bei den cW mit sogar 4% Zunahme nicht vorhanden und bei den gG mit einer Zellzahl-Reduktion von 16% deutlich abgeschwächt. Die darauffolgende Reoxygenierung bewirkte in den chronischen Wunden eine leichte Reduktion der Zelldichte, während sie in den gut granulierenden Wunden zu einer mäßigen Proliferation führte.

Damit bestätigten sich die Ergebnisse unserer vorherigen Veröffentlichungen prinzipiell. Im genauen Vergleich zeigten sich die Wundfibroblasten gegenüber den NHDF in Mono-, vor allem aber in Co-Kultur widerstandsfähiger gegenüber O₂-Mangelzuständen. Die cW-Fibroblasten scheinen in Co-Kultivierung unter Hypoxie stabiler, was man auf eine Adaption an die eher hypoxischen Bedingungen in vivo ansehen könnte. Andererseits können die gG-Fibroblasten die bessere O₂-Versorgung während der Reoxygenierung in Co-Kultur besser ausnützen, was wohl eher ihren normoxischen Bedingungen in vivo entspricht.

Die co-kultivierten Endothelzellen waren gegenüber den hypoxischen Bedingungen viel vulnerabler als die Wundfibroblasten und ihre Zelldichte reduzierte sich nach 24 h sogar weit unter das Niveau vom Versuchsbeginn. Dabei fiel auf, dass sie, mit cW-Fibroblasten zusammen kultiviert, gegenüber der Normoxie 30% ihrer Zelldichte einbüßten, mit gG-Fibroblasten aber sogar weit über die Hälfte, was in etwa auch dem Ergebnis mit NHDF in Co-Kultur entspricht (Oberringer et al. 2007). In den anschließenden 24 h Reoxygenierung stagnierten die HDMEC-Zellzahlen. In den MIB-Raten schlug sich der starke

Proliferationsabfall der Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen nicht nieder, da sie wie in Normoxie bei ca. 30% lag. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der Zellzyklus bei aktiviertem Ki67 gestoppt wird, also außerhalb G₀, oder erst mit einer gewissen zeitlichen Latenz. Dafür spräche der Abfall der MIB-Rate um gut 30% in den Reoxygenierungs-Präparaten nach 48 h.

Resümierend profitieren die cW-Fibroblasten und Endothelzellen gemeinsam von ihrer Interaktion während der Hypoxie. Im anderen Fall nutzten die gG-Fibroblasten zwar auch die Unterstützung der HDMEC, aber umgekehrt profitieren die Endothelzellen nicht von der Co-Kultivierung.

Die Literatur zeigt für chronische Hypoxie eine Proliferationsabnahme (Siddiqui et al. 1996), für akute Hypoxie eine Zunahme (Falanga & Kirsner 1993, Eul et al. 2005). In Bezug auf die Co-Kultur liegen Studien vor, die von einem protektiven Effekt der Fibroblasten auf die Endothelzellen ausgehen (Zhao & Eghbali-Webb 2001, Velazquez et al. 2002). Dies war in unserem Setup nur in den chronischen Wunden unter Hypoxie zu sehen. Ansonsten überwog eher der schützende Einfluss der HDMEC auf die Fibroblasten.

Neben der Proliferation verschlechterte sich auch die Migration der Fibroblasten unter Hypoxie, was zu einem signifikant schlechteren Spaltschluss führte. In Mono-Kultur hatten beide Wundtypen etwa gleich große Migrationseinbußen zu verzeichnen. In der Reoxygenierungsphase konnten sie das Sauerstoffangebot nutzen und den Wundspalt signifikant verkleinern.

In Co-Kultur konnten die cW-Fibroblasten unter Hypoxie deutlich von der Interaktion mit den HDMEC profitieren und ihr Spaltschluss war auch absolut deutlich weniger eingeschränkt, als der der gG-Fibroblasten. In den 24 h Reoxygenierung verringerten beide Fibroblasten-Klassifikationen deutlich ihre Wundspalte, allerdings in den gut granulierenden Wunden schneller.

Die Co-Kultur fördert also die Migration unter ungünstigen Bedingungen in den cW. Möglicherweise fördern die Endothelzellen in diesem Falle über freigesetzte Mediatoren die Migration der cW-Fibroblasten. Des Weiteren kann die Reoxygenierung vor allem als Migrationsreiz betrachtet werden, da bei nahezu gleichbleibender Zelldichte ein vermehrter Spaltschluss zustande kommt.

Einige Studien, in denen ein migrationsfördernder Effekt der Hypoxie beschrieben wird (Mogford et al. 2002, Li et al. 2007) weichen von unseren Ergebnissen ab. Andere Studien bestätigen jedoch die verminderte Migration der Fibroblasten unter Hypoxie (Lerman et al. 2003).

Einfluss des Nikotinkonsums

Um Hinweise zu finden, ob der Nikotinkonsum Einfluss auf die Heilungstendenz einer Wunde hat, ordneten wir die Patienten unabhängig von ihrer Wundklassifikation einer Raucher-Gruppe oder einer Nichtraucher-Gruppe zu (im Ergebnisteil nur auszugsweise gezeigt, siehe auch Tab. 1). Nebst klinischen Erfahrungen belegt eine Vielzahl von Studien den schädlichen Einfluss von Nikotinkonsum auf die Wundheilung (Freiman et al. 2004, Kuri et al. 2005, Warner 2006).

Bei uns wurde überprüft, ob der Nikotinkonsum in den Patientenakten vermerkt war. Weder Dauer, noch Schweregrad des Konsums wurden berücksichtigt bzw. wären nicht zuverlässig quantifizierbar gewesen. Zusätzlich besteht immer eine gewisse Unsicherheit bei Daten, die auf einer Patientenanamnese basieren, welche unter einer anderen Fragestellung erhoben wurden.

In der Raucher-Gruppe fanden wir im Vergleich zu der Nichtraucher-Gruppe eine bessere Migration in Mono- und Co-Kultur trotz einer etwas geringeren Zelldichte in Co-Kultur. Ähnliche, auf den ersten Blick eher widersprüchliche Ergebnisse finden sich auch in den Arbeiten von Morimoto et al. (2008) und Sorenson et al. (2010), die bei moderatem Nikotinkonsum eine Förderung der Angiogenese und einen schnelleren Wundverschluss nachwiesen.

Die Gesamtzellzahl in Co-Kultivierung war im Gegensatz zur Mono-Kultivierung bei den Nichtrauchern höher. Dies lag an einem deutlich erhöhten Endothelzell-Anteil (mit einer absolut erhöhten Endothelzell-Anzahl), der den geringeren Fibroblasten-Anteil der Nichtraucher-Gruppe in der Summe mehr als kompensierte. Die HDMEC scheinen also von den Nichtraucher-Fibroblasten zu profitieren, wie auch ihre fast durchweg erhöhte MIB-Rate zeigte.

Bei den Raucher-Fibroblasten zeigte sich die MFDR in Mono- und Co-Kultivierung überwiegend stark erhöht. In der Literatur finden sich Arbeiten, die besagen, dass Zigarettenrauch durch Veränderungen im Cytoskelett zu größerer Fibroblasten-Adhäsion und dadurch zu einer verringerten Migration und einem verringerten Wundverschluss führt (Wong & Martins-Green 2004).

Unter der Voraussetzung, dass man den Nikotinkonsum vor Studienbeginn quantifiziert, kann unser Modell prinzipiell geeignet sein, den Einfluss des Nikotins auf die untersuchten Parameter zu überprüfen.

Einfluss des Alters

Die Patienten wurden einer Gruppe mit einem Alter höher als 50 Jahre oder einer Gruppe mit einem Alter kleiner 50 Jahre zugeordnet (im Ergebnisteil nicht gezeigt, siehe auch Tab. 1). Auch hier belegt die Studienlage die klinischen Erfahrungen einer verlangsamten Wundheilung im Alter (Brem et al. 2007, Liu et al. 2008).

Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Daher sei hier das Wichtigste nur kurz zusammengefasst:

Die Gruppe der über 50-Jährigen zeigte bei fast identischer Zelldichte eine geringfügig stärkere Migration. Des Weiteren wiesen Co-Kulturen mit Fibroblasten aus älteren Patienten einen größeren Endothelzell-Anteil auf. In den Wunden der jüngeren Patienten fielen erhöhte Raten des Proliferationsmarkers MIB sowohl bei den Fibroblasten in Mono- und bei den Endothelzellen in Co-Kultur auf.

Interleukin-8-Ausschüttung

IL-8 und seine Rolle in der Wundheilung ist Gegenstand vieler In-vitro- und In-vivo-Studien. Es wird von Leukozyten, aber auch von Endothelzellen und Fibroblasten gebildet (Larsen et al. 1989, Goebeler et al. 1997). Seine Freisetzung in der Wunde wird durch IL-1, TNF- α , Bakterien-Produkte und Hypoxie getriggert. Es induziert die Rekrutierung von Neutrophilen und stimuliert die Migration und Proliferation von Keratinozyten (Gillitzer & Goebeler 2001). Zudem wird über die Beteiligung von IL-8 an der Neoangiogenese spekuliert (Koch et al. 1992, Strieter et al. 1995).

Unsere Ergebnisse zeigten keine generellen Gruppen-Unterschiede in der IL-8-Freisetzung zwischen Fibroblasten aus chronischen und gut granulierenden Wunden.

In den Mono-Kulturen der cW waren die IL-8-Konzentrationen zu Beginn (0 h) absolut am höchsten und zeigten unter Hypoxie und unter Reoxygenierung relative Anstiege. In den Mono-Kulturen der gG waren die Konzentrationen in den Hypoxie-Präparaten relativ zu den normoxischen erhöht. Die absolut höchsten Konzentrationen wurden unter Hypoxie und Reoxygenierung erreicht. Im Vergleich der Gruppen stiegen die IL-8-Konzentrationen in den gG über die Zeit, während sie in den cW sanken.

In den Co-Kulturen wurden aufgrund der deutlich höheren Zellzahlen signifikant höhere IL-8-Konzentrationen (pro Zelle) gemessen als in den Fibroblasten-Mono-Kulturen. Beiden Wundklassifikationen gemeinsam war die erhöhte IL-8-Ausschüttung als Antwort auf Hypoxie und noch ausgeprägter auf Reoxygenierung.

Die Literatur wartet mit vergleichbaren Ergebnissen auf. Für humane dermale Fibroblasten, Lungenfibroblasten und Fibroblast-like Synoviozyten wurde ebenfalls eine Förderung der IL-8-Expression durch Hypoxie beschrieben (Tamm et al. 1998, Galindo et al. 2001, Ahn et al. 2008). Bei den Endothelzellen existieren neben Ergebnissen, die eine Verstärkung der IL-8-Expression durch Hypoxie nachweisen (Karakurum et al. 1994) aber auch gegensätzliche Daten, wo es zu einer Verringerung der IL-8-Produktion unter Hypoxie kam (Loboda et al. 2006).

Diese Ergebnisse wurden schon bei anderen Zelltypen bestätigt: Kupferzellen steigerten ebenfalls ihren IL-8-Release unter Hypoxie und weiter unter Reoxygenierung (Okamura et al. 1999). Ähnliches wird von Monozyten berichtet (Metinko et al. 1992). Leukozyten reagierten auf Hypoxie auch mit einem Konzentrationsanstieg, aber unter Reoxygenierung mit einer Absenkung (Simms & D'Amico 1996, Knowles et al. 1997). Eine weitere Arbeit entdeckte darüber hinaus einen IL-8-Rezeptor-Abfall unter Reoxygenierung bei Leukozyten (Grutkoski et al. 1999).

Die Bedeutung von IL-8 für die gestörte Wundheilung wird in der Literatur differenziert gesehen: Einerseits lassen Studien vermuten, dass zu hohe IL-8-Spiegel mit einer gestörten Wundheilung korrelieren. Zum einen ist IL-8 in fetalen Wunden, die narbenlos abheilen, nur über einen viel kürzeren Zeitraum nachweisbar als bei Erwachsenen (Liechty et al. 2000), zum anderen wurde von inhibitorischen Effekten auf die Keratinozyten-Proliferation, die Kollagen-Vernetzung und die Wundkontraktion bei erhöhtem IL-8 berichtet (Iocono et al. 2000). Andererseits findet man auch Studien, die einer zeitlich verlängerter IL-8-Expression keine pathologische Bedeutung beimessen und ihre bedeutende Rolle für Keratinozyten-Proliferation betonen (Rennekampff et al. 2000).

Wertung, Ausblick und Perspektive

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Modifikation des CCSWMA um die Komponente Fibroblast ex vivo generell für die Überprüfung potenziell diagnostischer Kriterien zur Beurteilung der Heilungstendenz eines Weichteilschadens eignet. Das Modell bildet zunächst einmal die in vivo vorliegenden Unterschiede zwischen chronischen und gut granulierenden Wunden hinsichtlich wichtiger Messgrößen wie Zelldichte und Wundverschluss auch in vitro ab. Die Vorgängerstudien mit NHDF stellten schon die Eignung des CCSWMA unter Beweis, wichtige Stellgrößen wie Hypoxie simulieren und auch den Einfluss weiterer Faktoren wie die Zugabe von Wachstumsfaktoren ins Medium analysieren zu können. Die vorliegende Studie erbrachte zudem den Beweis, bei schlecht standardisierbaren Zellpopulationen (wie humane Fibroblasten aus verschiedenen Wunden eines sehr heterogenen Patientenkollektivs), zellbiologische Unterschiede der Fibroblasten erfassen zu können. In weiteren Versuchen können durch die Diversifizierung weitere Einflussfaktoren und Parameter überprüft werden. Das Modell kann in Zukunft auch einen wesentlichen Beitrag zur Vermeidung von Tiermodellen leisten.

Konkret zeigen die Ergebnisse, dass die MFDR zukünftig als prognostischer Marker für die Heilungstendenz einer Wunde herangezogen werden könnte. Hierfür muss im Rahmen von Folgestudien die Diskriminierung weiterer Eingangsgrößen wie Begleiterkrankungen, Alter, Geschlecht und Nikotinkonsum gelingen. Diese ist unbedingte Voraussetzung, um den Impact einer jeden Stellgröße auf den Wundheilungsprozess möglichst genau bemessen zu können, damit die individuell vorliegenden Verhältnisse der jeweiligen Wunde erfassbar werden.

Fernziel muss es sein, mehrere Parameter der Fibroblasten ex vivo charakterisieren zu können, um durch frühzeitige Einschätzung des Heilungsverlaufs ein individuell angepasstes therapeutisches Konzept zu entwickeln.

6. Anhang

6.1 Geräte

Tabelle 6: *Liste der benutzten Geräte und Hersteller.*

Gerät	Hersteller
Auswertung	
Axiovert 2 Plus	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Celloshaker Variospeed Variotime	Renner GmbH, Darmstadt (D)
Digital Still Camera, Model DSC-S75	Sony, Tokyo (JPN)
Photometer: Titertek Multiskan MCC/340 Typ 347, Ser. No. 3470 134018	Labsystems, Helsinki (FIN)
Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Zellkultur	
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau (D)
Brutschrank Typ B12	Heraeus, Hanau (D)
Einfrierkammer, Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Cat. No. 5100-0001	Nalgene, New York (USA)
Eppendorf Research Pipetten 0,5 -10 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Pipetten 10 -100 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Pipetten 100 -1000 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Picture Monitor, Model PM 9050, Ser.No. 09880	Ikegami Tsushinki Co., LTD., Tokyo (JPN)
Pipettus-Akku Hirschmann Laboratories	Hirschmann GmbH, Eberstadt (D)
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau (D)
Wasserbad TWB12	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach (D)
Zentrifuge Hermle Z400K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen (D)

6.2 Materialien

6.2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Auflistung der benutzten Verbrauchsmaterialien und Hersteller.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Endothelzell-Kultivierung	
Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC), Cat. No. C-12210	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Endothelial Cell Growth Medium MV, Cat. No. C-22022	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
SupplementMix Endothelial Cell Growth Medium MV, Cat. No. C-39225	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Fibroblasten-Kultivierung	
Wundbiopsien	
Quantum 333 for Fibroblasts, Cat. No. U15-813	PAA, Pasching (A)
Primärantikörper [anti human]	
Factor VIII Related Antigen/von Willebrand FactorAb-1, Rabbit Polyclonal Antibody, Cat. No. 12880	dianova GmbH, Hamburg (D)
Anti-Ki-67 Antigen Code No. M7240	Dakocytomation, Glostrup (DK)
Monoclonal Anti- α Smooth Muscle Actin, Product No. A 2547	SIGMA, Saint Louis (USA)
Sekundärantikörper	
Cy3-conjugated AffiniPure F(ab) ₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG Code No. 111-166-045	dianova GmbH, Hamburg (D)
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG Code No. 115-095-003	dianova GmbH, Hamburg (D)
ELISA	
IL-8 Microplate, one plate of 96 Wells, Catalog No. S80000C, Part 890462	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
IL-8-Conjugate 11,5 ml Catalog No. S80000C, Part 890465	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
IL-8-Standard 10 ng Catalog No. S80000C, Part 890466	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Assay Diluent RD-85, 11 ml Catalog No. S80000C, Part 895877	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Calibrator Diluent RD5P Concentrate, 21 ml, Catalog No. S80000C, Part 895151	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Wash Buffer Concentrate, 21 ml Catalog No. S80000C, Part 895003	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Stop Solution, 6 ml Catalog No. S80000C, Part 895032	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Plate Covers	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Aqua dest., Reinstwasseranlage Arium 661	Sartorius AG, Göttingen (D)
Deckgläser 24 x 50 mm, Cat. No. 631-0146	VWR international, Darmstadt (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe (D)
Einmal-Pasteurpipette 1 ml Kontrollnr. 10021141	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Ethanol min. 99,9% Vol., Sorte 642	Berkel, Ludwigshafen (D)
Gas, zertifiziertes, 95% N ₂ , 5% CO ₂	Messer, Griesheim (D)
Glycerol, Kat. Nr. 3783.1	Carl Roth GMBH, Karlsruhe (D)
Isopropanol, 70%	Berkel, Ludwigshafen (D)
Kulturflasche groß, steril, 75 cm ² , 250 ml, Cat. No. 658 170	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Kulturflasche klein, steril, 25 cm ² , 50 ml, Cat. No. 680 160	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Küvetten aus Glas, Kat. Nr. H 550.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Kryoröhrchen PP mit Schraubverschluss, steril, Revision 01-840576	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Methanol, Kat. Nr. 4627.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid), Catalog No. H-1200	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Objektträger 76 x 26 mm, geschnitten mit Mattrand (siehe 3.6.1)	Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
PBS Phosphate Buffered Saline, Tablets, No. BR0014G	Oxoid Limited, Hampshire (GB)

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
5 ml sterile Einmal-Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
10 ml sterile Einmal-Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg (D)
QuadriPERM: steril, Cat. No. 96077308	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Reagenzröhrchen steril, PP-Test tubes, 50 ml, Cat. No. 227261	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Trypsin EDTA, UV-inaktiviert (1:250), 1-fach Konzentrat Kat. Nr. L11-66	PAA Laboratories GmbH, Cölbe (D)
Tween 20, Art. Nr. 91272	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)

6.2.2 Vorbereitung der Objektträger für die Zellkultur

Vor dem Gebrauch der Objektträger im Versuch mussten diese einer speziellen Vorbehandlung unterzogen werden. Je 18 Objektträger wurden in eine Glasschaukel gesetzt und diese wiederum in ein Becherglas mit einem Volumen von 2 Litern, welches fünf Glasschaukeln Platz bot. Die Objektträger wurden in einem Wasser-Glasreinigungsseifen-Gemisch über Nacht getränkt. Am nächsten Morgen erfolgte eine 2-stündige Auswaschung unter fließendem Wasser. Im Anschluss wurden die Objektträger für 1 h mit 1% HCl behandelt.

Nach einer weiteren einstündigen Wässerung wurden die Objektträger mit 1% NaOH versetzt. Diesem Schritt folgte eine 2-stündige Auswaschung. Danach wurde zuerst eine Spülung mit destilliertem Wasser und daraufhin eine weitere mit 96%-igem Ethanol durchgeführt. Anschließend trockneten die Objektträger im Trockenschrank, danach wurden sie mitsamt den Glasschaukeln in Alufolie gepackt und bei 200 °C 2 h lang sterilisiert.

6.3 Verbrauchslösungen

Einfriermedium

Eine 5%-ige DMSO-Lösung wurde hergestellt, indem 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) in 19 ml Endothelzellmedium gegeben wurde. Dieses wurde in 20 Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Medien

- 1) Zu 500 ml Endothelzellmedium wurden jeweils 27,3 ml EndothelzellSupplementMix zugefügt.
- 2) Quantum 333-Fibroblastenmedium.
- 3) Co-Kultur-Medium in einem Mischungsverhältnis bestehend aus 3 Teilen Endothelzellzellmedium und einem Teil Quantum 333-Fibroblastenmedium.

6.4 Literaturverzeichnis

1. **Ahn JK, Koh EM, Cha HS, Lee YS, Kim J, Bae EK et al.** Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced expressions of IL-8, MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 834-9.
2. **Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A et al.** Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 1067-8.
3. **Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL.** Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1045-9.
4. **Baggiolini M, Dewald B, Moser B.** Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; 55: 97-179.
5. **Baggiolini M.** Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-8.
6. **Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD et al.** CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 1-8.
7. **Berthod F, Germain L, Tremblay N, Auger FA.** Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J Cell Physiol* 2006; 207: 491-8.
8. **Bickel M.** The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 1993; 64: 456-60.
9. **Bleeker-Rovers CP, Rennen HJ, Boerman OC, Wymenga AB, Visser EP, Bakker JH et al.** 99mTc-labeled interleukin 8 for the scintigraphic detection of infection and inflammation: first clinical evaluation. *J Nucl Med* 2007; 48: 337-43.
10. **Breit S, Bubel M, Pohlemann T, Oberringer M.** Erythropoietin ameliorates the reduced migration of human fibroblasts during in vitro hypoxia. *J Physiol Biochem* 2011; 67: 1-13.
11. **Brem H, Tomic-Canic M, Entero H, Hanflik AM, Wang VM, Fallon JT et al.** The synergism of age and db/db genotype impairs wound healing. *Exp Gerontol* 2007; 42: 523-31.
12. **Brinkhous KM, Sandberg H, Garris JB, Mattsson C, Palm M, Griggs T et al.** Purified human factor VIII procoagulant protein: comparative hemostatic response after infusions into hemophilic and von Willebrand disease dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 8752-6.
13. **Bucalo B, Eaglstein WH, Falanga V.** Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. *Wound Repair Regen* 1993; 1: 181-6.
14. **Buisson AC, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E et al.** Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. *J Cell Physiol* 1996; 166: 413-26.
15. **Burk RR.** A factor from a transformed cell line that affects cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; 70: 369-72.
16. **Calderon M, Lawrence WT, Banes AJ.** Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro. *J Surg Res* 1996; 61: 343-7.
17. **Clark RA.** Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13: 701-25.

18. **Cross SS.** Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. D. McCormick H. Chong, C. Hobbs, C. Datta & P. A. Hall. *Histopathology* 1993; 22: 355-360. *Histopathology* 2002; 41: 172.
19. **Darby I, Skalli O, Gabbiani G.** Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63: 21-9.
20. **Desmouliere A, Gabbiani G.** Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during pathological situations: the role of extracellular matrix and cytokines. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994; 29: 195-203.
21. **Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G.** Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 7-12.
22. **Duan ZG, Yang WM.** [Analysis of cytokines (IL-2, IL-8, IL-10) in the expressed prostatic secretions of chronic prostatitis]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2005; 11: 201-3.
23. **Endl E, Gerdes J.** The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000; 257: 231-7.
24. **Eneroth M, Persson BM.** Risk factors for failed healing in amputation for vascular disease. A prospective, consecutive study of 177 cases. *Acta Orthop Scand* 1993; 64: 369-72.
25. **Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R.** Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol* 1998; 153: 1849-60.
26. **Eul B, Rose F, Krick S, Savai R, Goyal P, Klepetko W et al.** Impact of HIF-1alpha and HIF-2alpha on proliferation and migration of human pulmonary artery fibroblasts in hypoxia. *FASEB J* 2006; 20: 163-5.
27. **Falanga V, Kirsner RS.** Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells. *J Cell Physiol* 1993; 154: 506-10.
28. **Fernandez MF, Ginsberg MH, Ruggeri ZM, Batlle FJ, Zimmerman TS.** Multimeric structure of platelet factor VIII/von Willebrand factor: the presence of larger multimers and their reassociation with thrombin-stimulated platelets. *Blood* 1982; 60: 1132-8.
29. **Franz AR, Steinbach G, Kron M, Pohlandt F.** Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using interleukin-8 and C-reactive protein as markers of bacterial infections. *Pediatrics* 1999; 104: 447-53.
30. **Furie MB, Randolph GJ.** Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol* 1995; 146: 1287-301.
31. **Gabbiani G, Ryan GB, Majne G.** Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 27: 549-50.
32. **Gabbiani G.** The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003; 200: 500-3.
33. **Galindo M, Santiago B, Alcami J, Rivero M, Martin-Serrano J, Pablos JL.** Hypoxia induces expression of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL-8 in human dermal fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 36-41.
34. **Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H.** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-5.

35. **Gillitzer R, Goebeler M.** Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 513-21.
36. **Goebeler M, Yoshimura T, Toksoy A, Ritter U, Brocker EB, Gillitzer R.** The chemokine repertoire of human dermal microvascular endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 445-51.
37. **Gordillo GM, Sen CK.** Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *Am J Surg* 2003; 186: 259-63.
38. **Gosain A, DiPietro LA.** Aging and wound healing. *World J Surg* 2004; 28: 321-6.
39. **Gown AM, Vogel AM, Gordon D, Lu PL.** A smooth muscle-specific monoclonal antibody recognizes smooth muscle actin isozymes. *J Cell Biol* 1985; 100: 807-13.
40. **Gratz S, Rennen HJ, Boerman OC, Oyen WJ, Burma P, Corstens FH.** (99m)Tc-interleukin-8 for imaging acute osteomyelitis. *J Nucl Med* 2001; 42: 1257-64.
41. **Greiling D, Clark RA.** Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 7): 861-70.
42. **Grutkoski PS, Graeber CT, D'Amico R, Keeping H, Simms HH.** Regulation of IL-8RA (CXCR1) expression in polymorphonuclear leukocytes by hypoxia/reoxygenation. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 171-8.
43. **Hinz B.** Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 526-37.
44. **Hughes CC.** Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 204-9.
45. **Iocono JA, Colleran KR, Remick DG, Gillespie BW, Ehrlich HP, Garner WL.** Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds. *Wound Repair Regen* 2000; 8: 216-25.
46. **Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M et al.** Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 1564-70.
47. **Karasek MA.** Does transformation of microvascular endothelial cells into myofibroblasts play a key role in the etiology and pathology of fibrotic disease? *Med Hypotheses* 2007; 68: 650-5.
48. **Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM.** Chemokines as mediators of neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1928-36.
49. **Kinner B, Zaleskas JM, Spector M.** Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2002; 278: 72-83.
50. **Kirkpatrick CJ, Krump-Konvalinkova V, Unger RE, Bittinger F, Otto M, Peters K.** Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomol Eng* 2002; 19: 211-7.
51. **Knowles R, Keeping H, Graeber T, Nguyen K, Garner C, D'Amico R et al.** Cytokine control of PMN phagocytosis: regulatory effects of hypoxemia and hypoxemia-reoxygenation. *Am J Physiol* 1997; 272: C1352-C1364.
52. **Kocak H, Oner-Iyidogan Y, Kocak T, Oner P.** Determination of diagnostic and prognostic values of urinary interleukin-8, tumor necrosis factor-alpha, and leukocyte arylsulfatase-A activity in patients with bladder cancer. *Clin Biochem* 2004; 37: 673-8.

53. **Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM et al.** Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; 258: 1798-801.
54. **Kuri M, Nakagawa M, Tanaka H, Hasuo S, Kishi Y.** Determination of the duration of preoperative smoking cessation to improve wound healing after head and neck surgery. *Anesthesiology* 2005; 102: 892-6.
55. **Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, Matsushima K.** Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 1989; 68: 31-6.
56. **Lebrun E, Tomic-Canic M, Kirsner RS.** The role of surgical debridement in healing of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 2010; 18: 433-8.
57. **Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC.** Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol* 2003; 162: 303-12.
58. **Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK.** Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis* 2005; 8: 63-71.
59. **Li W, Li Y, Guan S, Fan J, Cheng CF, Bright AM et al.** Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J* 2007; 26: 1221-33.
60. **Liechty KW, Kim HB, Adzick NS, Crombleholme TM.** Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 866-72.
61. **Liu L, Marti GP, Wei X, Zhang X, Zhang H, Liu YV et al.** Age-dependent impairment of HIF-1alpha expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. *J Cell Physiol* 2008; 217: 319-27.
62. **Il-Muller D, Tilgen W.** [Established and current procedures in wound healing]. *Hautarzt* 2005; 56: 411-22.
63. **Loboda A, Jazwa A, Jozkowicz A, Molema G, Dulak J.** Angiogenic transcriptome of human microvascular endothelial cells: Effect of hypoxia, modulation by atorvastatin. *Vascul Pharmacol* 2006; 44: 206-14.
64. **Luster AD.** Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-45.
65. **Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S.** Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 4219-23.
66. **Mendez MV, Raffetto JD, Phillips T, Menzoian JO, Park HY.** The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound fluid: A potential mechanism for senescence in venous ulcers. *J Vasc Surg* 1999; 30: 734-43.
67. **Metinko AP, Kunkel SL, Standiford TJ, Strieter RM.** Anoxia-hyperoxia induces monocyte-derived interleukin-8. *J Clin Invest* 1992; 90: 791-8.
68. **Modarressi A, Pietramaggiore G, Godbout C, Vigato E, Pittet B, Hinz B.** Hypoxia Impairs Skin Myofibroblast Differentiation and Function. *J Invest Dermatol* 2010.
69. **Mogford JE, Tawil N, Chen A, Gies D, Xia Y, Mustoe TA.** Effect of age and hypoxia on TGFbeta1 receptor expression and signal transduction in human dermal fibroblasts: impact on cell migration. *J Cell Physiol* 2002; 190: 259-65.

70. **Morimoto N, Takemoto S, Kawazoe T, Suzuki S.** Nicotine at a low concentration promotes wound healing. *J Surg Res* 2008; 145: 199-204.
71. **Moulin V, Castilloux G, Jean A, Garrel DR, Auger FA, Germain L.** In vitro models to study wound healing fibroblasts. *Burns* 1996; 22: 359-62.
72. **Mukai K, Schollmeyer JV, Rosai J.** Immunohistochemical localization of actin: applications in surgical pathology. *Am J Surg Pathol* 1981; 5: 91-7.
73. **Nakatsu MN, Sainson RC, Aoto JN, Taylor KL, Aitkenhead M, Perez-del-Pulgar S et al.** Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1. *Microvasc Res* 2003; 66: 102-12.
74. **Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T.** A new in vitro wound model based on the co-culture of human dermal microvascular endothelial cells and human dermal fibroblasts. *Biol Cell* 2007; 99: 197-207.
75. **Okamura K, Noshima S, Esato K.** Cytokine release during hypoxia reoxygenation by Kupffer cells in rats with obstructive jaundice. *Surg Today* 1999; 29: 730-4.
76. **Orlidge A, D'Amore PA.** Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1987; 105: 1455-62.
77. **Pakala R, Benedict CR.** Endothelial cells regulate the proliferation of monocytes in vitro. *Atherosclerosis* 1999; 147: 25-32.
78. **Pannekoek H, Voorberg J.** Molecular cloning, expression and assembly of multimeric von Willebrand factor. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2: 879-96.
79. **Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB.** Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277: C1-C9.
80. **Raffetto JD, Mendez MV, Marien BJ, Byers HR, Phillips TJ, Park HY et al.** Changes in cellular motility and cytoskeletal actin in fibroblasts from patients with chronic venous insufficiency and in neonatal fibroblasts in the presence of chronic wound fluid. *J Vasc Surg* 2001; 33: 1233-41.
81. **Rennekampff HO, Hansbrough JF, Kiessig V, Dore C, Sticherling M, Schroder JM.** Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J Surg Res* 2000; 93: 41-54.
82. **Rennen HJ, Bleeker-Rovers CP, van Eerd JE, Frielink C, Oyen WJ, Corstens FH et al.** 99mTc-labeled interleukin-8 for scintigraphic detection of pulmonary infections. *Chest* 2004; 126: 1954-61.
83. **Ronnov-Jessen L, Petersen OW.** A function for filamentous alpha-smooth muscle actin: retardation of motility in fibroblasts. *J Cell Biol* 1996; 134: 67-80.
84. **Rossi D, Zlotnik A.** The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-42.
85. **Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ.** Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 1979; 279: 636-8.
86. **Scharf H.-P., Rüter A., Pohlemann T., Marzi I., Kohn D., Günther K.-P.** (2008) Orthopädie und Unfallchirurgie. Urban & Fischer/Elsevier GmbH.

87. **Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD et al.** The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993; 123: 513-22.
88. **Sen CK.** Wound healing essentials: let there be oxygen. *Wound Repair Regen* 2009; 17: 1-18.
89. **Shahzad A, Knapp M, Lang I, Kohler G.** Interleukin 8 (IL-8) - a universal biomarker? *Int Arch Med* 2010; 3: 11.
90. **Short M, Nemenoff RA, Zawada WM, Stenmark KR, Das M.** Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C416-C425.
91. **Siddiqui A, Galiano RD, Connors D, Gruskin E, Wu L, Mustoe TA.** Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: acute versus chronic hypoxia. *Wound Repair Regen* 1996; 4: 211-8.
92. **Silverstein P.** Smoking and wound healing. *Am J Med* 1992; 93: 22S-4S.
93. **Simms H, D'Amico R.** Regulation of polymorphonuclear leukocyte cytokine receptor expression: the role of altered oxygen tensions and matrix proteins. *J Immunol* 1996; 157: 3605-16.
94. **Sorensen LT, Toft BG, Rygaard J, Ladelund S, Paddon M, James T et al.** Effect of smoking, smoking cessation, and nicotine patch on wound dimension, vitamin C, and systemic markers of collagen metabolism. *Surgery* 2010; 148: 982-90.
95. **Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J et al.** The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; 270: 27348-57.
96. **Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P.** The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* 2001; 9: 66-76.
97. **Tamm M, Bihl M, Eickelberg O, Stulz P, Perruchoud AP, Roth M.** Hypoxia-induced interleukin-6 and interleukin-8 production is mediated by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor in primary human lung cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 653-61.
98. **Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA.** Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 349-63.
99. **Trabold O, Wagner S, Wicke C, Scheuenstuhl H, Hussain MZ, Rosen N et al.** Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing. *Wound Repair Regen* 2003; 11: 504-9.
100. **Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM.** Wound healing: immunological aspects. *Injury* 2006; 37 Suppl 1: S5-12.
101. **Velazquez OC, Snyder R, Liu ZJ, Fairman RM, Herlyn M.** Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *FASEB J* 2002; 16: 1316-8.
102. **Voggenreiter G, Dold** (2004) Wundtherapie. Thieme, Stuttgart New York
103. **Wall IB, Moseley R, Baird DM, Kipling D, Giles P, Laffafian I et al.** Fibroblast dysfunction is a key factor in the non-healing of chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2526-40.

104. **Warner DO.** Perioperative abstinence from cigarettes: physiologic and clinical consequences. *Anesthesiology* 2006; 104: 356-67.
105. **Watanabe S, Hirose M, Yasuda T, Miyazaki A, Sato N.** Role of actin and calmodulin in migration and proliferation of rabbit gastric mucosal cells in culture. *J Gastroenterol Hepatol* 1994; 9: 325-33.
106. **Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW.** Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest* 1977; 60: 390-404.
107. **Weitkamp JH, Reinsberg J, Bartmann P.** Interleukin-8 (IL-8) preferable to IL-6 as a marker for clinical infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 1401.
108. **Wong LS, Martins-Green M.** Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. *Wound Repair Regen* 2004; 12: 471-84.
109. **Zhang W, Chen H.** [The study on the interleukin-8 (IL-8)]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2002; 19: 697-702.
110. **Zhao L, Eghbali-Webb M.** Release of pro- and anti-angiogenic factors by human cardiac fibroblasts: effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538: 273-82.

6.5 Publikationen

Veröffentlichte Artikel:

Ein Manuskript, das zu großen Teilen auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beruht, ist seit Mai 2012 bei der Zeitschrift Cells Tissues Organs unter Begutachtung.

Veröffentlichte Tagungsbeiträge:

Vortrag:

Schwarz F, Jennewein M, Bubel M, Holstein J, Pohlemann T, Oberringer M: Korreliert das Wachstums- und Differenzierungsverhalten von humanen Wundfibroblasten in vitro mit der Heilungstendenz einer Wunde? Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. German Medical Science GMS Publishing House, <http://www.egms.de/static/en/meetings/dkou2009/09dkou696.shtml>; Düsseldorf (2009)

Poster:

Oberringer M, Ames C, Jennewein M, Schwarz F, Bubel M, Holstein J, Mayer RD, Pohlemann T: The dilemma of enhanced proliferation and stress - Cytogenetic features of fibroblasts during regeneration. 33. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie. European Journal of Cell Biology 89S1, Suppl. 60: 64 (2010)

6.6 Danksagung

Bei dieser Arbeit gebührt vielen Menschen ein besonderer Dank, die mich bei der Anfertigung unterstützt haben.

Besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann aussprechen, der mir die Möglichkeit gegeben hat, mich in seinem Labor mit einer wissenschaftlichen Thematik zu befassen.

Großer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Oberringer, für das Heranführen an die wissenschaftlichen Vorgehens- und Arbeitsweisen und die sehr gute, lehrreiche Betreuung während der Doktorarbeit.

Daneben möchte ich den Mitarbeitern des molekular- und zellbiologischen Forschungslabors der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie für ihre Unterstützung und gute Zusammenarbeit danken.

Ein ganz herzlicher Dank gebührt meinen Eltern, meiner Familie und meiner Freundin, die mich während meines gesamten Studiums immer unterstützt und damit auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

6.7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Florian Schwarz, Albert-Weisgerber-Allee 44, 66386 St. Ingbert
geboren am 27.11.82 in Gießen
ledig, kinderlos

Schulbildung/Zivildienst

1989-1993	Grundschule in Niederwürzbach
1993-2002	Von der Leyen-Gymnasium in Blieskastel mit Abschluss Abitur
2002-2003	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in St. Ingbert anschließend 1 Monat zusätzlich auf Honorarbasis

Hochschulbildung

ab Oktober 2003	Studium an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes (Heimatuniversität)
2003-2005	Vorklinik (Studiensemester 1-4) mit Abschluss 1. Staatsexamen
2005-2006	Klinik (Studiensemester 5-6)
2006-2007	ERASMUS-Auslandsjahr (Studiensemester 7-8) in La Laguna (Spanien)
2007-2008	Klinik (Studiensemester 9-10) an Heimatuniversität
2009	Praktisches Jahr in Sulzbach in Chirurgie und Innerer Medizin sowie in Olten (Schweiz) im Wahlfach Orthopädie
2010	Erlangung der Approbation nach Abschluss des 2. Staatsexamens im Juni

Famulaturen in den Bereichen Anästhesie, Gynäkologie und Unfallchirurgie

Beruflicher Werdegang

Seit Oktober 2010 Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung an der Marienhaus-Klinik St. Josef Kohlhof in Neunkirchen

