

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

Direktor: Prof. Dr. Tim Pohlemann

**Charakterisierung der Eigenschaften von
Fibroblasten aus Morbus Dupuytren in
Mono- und Co-Kultur**

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

2017

vorgelegt von:

Arne Philip Feistel

geboren am 11. Oktober 1983

in Zweibrücken

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

In Dankbarkeit meinen lieben Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
1. Zusammenfassung	1
Summary	3
2. Einleitung	5
2.1 Morbus Dupuytren	5
2.1.1 Historie und Epidemiologie	5
2.1.2 Anatomie	6
2.1.3 Ätiologie	7
2.1.4 Klinik	8
2.1.5 Stadieneinteilung nach Tubiana	9
2.1.6 Mikroskopische Stadieneinteilung nach Luck	10
2.1.7 Therapie	11
2.2 Der Myofibroblast	13
2.3 Endothelzellen und Bedeutung der Hypoxie	15
2.4 Bedeutung der Zytokine	16
2.5 Co-Kultur-Modell	18
2.6 Ziel der Arbeit	19
3. Material und Methodik	20
3.1 Zellkultivierung	20
3.1.1 Allgemeines Setup	20
3.1.2 Fibroblasten aus Morbus Dupuytren	21
3.1.2.1 Patientenkollektiv	21
3.1.2.2 Probenaufbereitung	23
3.1.2.3 Zellexpansion	24
3.1.3 Normale humane dermale Fibroblasten	25
3.1.3.1 Anlegen einer Master Cell Bank	25
3.1.3.2 Zellexpansion	25
3.1.4 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	26
3.1.4.1 Anlegen einer Master Cell Bank	26
3.1.4.2 Zellexpansion	26
3.2 Experimentelles Setup	27

3.2.1	Versuchsdurchführung	27
3.2.2	Hypoxie	30
3.2.3	Fixierung der Zellen	31
3.3	Immunzytochemie	33
3.3.1	Grundlagen der Immunzytochemie	33
3.3.2	Färbeprotokoll	34
3.3.3	Antikörper	35
3.3.3.1	Alpha-Smooth-Muscle-Actin	35
3.3.3.2	Von-Willebrand-Faktor	36
3.3.3.3	Ki-67/MIB-1	37
3.3.4	Kern-Gegenfärbung	38
3.4	Mikroskopische Auswertung	39
3.4.1	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie	39
3.4.2	Grundprinzipien der mikroskopischen Auswertung	41
3.4.3	Migration	41
3.4.4	Proliferation: Zelldichte	42
3.4.5	Proliferation: Ki-67/MIB-1	43
3.4.6	Myofibroblasten-Differenzierungsrate	43
3.4.7	Apoptose	44
3.5	Durchflusszytometrie	46
3.5.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	46
3.5.2	Apoptoseassay	46
3.5.3	Färbeprotokoll	48
3.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	49
3.6.1	Prinzip des ELISAs	49
3.6.2	Quantitative Analyse von PDGF AA	49
3.7	Multiplex Immunoassay	51
3.7.1	Prinzip des Multiplex Immunoassays	51
3.7.2	Zytokin-Analytik	52
3.8	Statistik	52
4.	Ergebnisse	53
4.1	Spaltschluss	53
4.1.1	DF-Kulturen	53
4.1.2	NHDF-Kulturen	54
4.1.3	DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen	55
4.1.4	HDMEC-Kulturen	56

4.2 Proliferation: Zelldichte	58
4.2.1 DF-Kulturen	58
4.2.2 NHDF-Kulturen	59
4.2.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen	60
4.2.4 HDMEC-Kulturen	62
4.3 Proliferation: Ki-67/MIB-1	63
4.3.1 Fibroblasten	63
4.3.1.1 DF-Kulturen	63
4.3.1.2 NHDF-Kulturen	64
4.3.1.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen	65
4.3.2 Endothelzellen	67
4.4 Myofibroblasten-Differenzierungsrate	69
4.4.1 DF-Kulturen	69
4.4.2 NHDF-Kulturen	70
4.4.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen	71
4.5 Apoptose: Mikronuklei	73
4.5.1 Fibroblasten	73
4.5.1.1 DF-Kulturen	73
4.5.1.2 NHDF-Kulturen	74
4.5.1.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen	75
4.5.2 Endothelzellen	77
4.6 Apoptose: Annexin V / 7-AAD	78
4.6.1 Fibroblasten	78
4.6.1.1 DF-Kulturen	78
4.6.1.2 NHDF-Kulturen	79
4.6.1.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen	79
4.6.2 Endothelzellen	79
4.7 Apoptose: Mikronuklei vs. Annexin V / 7-AAD	80
4.7.1 Fibroblasten	80
4.7.2 Endothelzellen	81
4.8 PDGF AA-Freisetzung	83
4.9 Zytokine im Multiplex Immunoassay	85
5. Diskussion	86
5.1 Methoden	86
5.2 Ergebnisse	91
5.3 Schlussfolgerungen	99

6. Anhang	101
6.1 Geräte	101
6.2 Materialien	102
6.2.1 Verbrauchsmaterialien	102
6.2.2 Vorbereitung von Glasobjektträgern für die Zellkultur	105
7. Literaturverzeichnis	106
8. Publikationen	117
9. Danksagung	118
10. Lebenslauf	119

Abkürzungen

Abbildung	Abb.
Alpha-Smooth-Muscle-Actin	α -SMA
7-Amino-Actinomycin D	7-AAD
Basic Fibroblast Growth Factor	bFGF
5-Bromo-2'-Desoxyuridin	BrdU
Co-Culture Scratch-Wound Migration Assay	CCSWMA
Co-Kultur	CK
Cusanus Trägergesellschaft Trier mbH	ctt e.V.
Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)	DNA
4',6'-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid	DAPI
Dimethylsulfoxid	DMSO
Dupuytrenfibroblasten (Fibroblasten aus M. Dupuytren)	DF
Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ELISA
Epidermal Growth Factor	EGF
Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylendiamintetraacetat)	EDTA
Fluorescein-Isothiocyanat	FITC
Fluorescence-Activated Cell Sorting	FACS
Gesamtzellzahl	GZZ
Gesichtsfeld	GF
Goat-anti-mouse	GaM
Goat-anti-rabbit	GaR
Granulocyte-Colony Stimulating Factor	G-CSF
Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor	GM-CSF
Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	HDMEC
Hypoxia-inducible Factor 1-alpha	HIF-1 α
Interferon- γ	IFN- γ
Interferon- γ -induced Protein 10	IP-10
Interleukin	IL
Ki-67-Antigen	Ki-67
Ki-67/MIB-1-Antikörper	Ki-67/MIB-1
Lactatdehydrogenase	LDH
Ligamentum	Lig.
Macrophage Inflammatory Protein-1 β	MIP-1 β
Master Cell Bank	MCB
Messenger RNA	mRNA

Millimeter Quecksilbersäule	mmHg
Monocyte Chemoattractant Protein 1	MCP-1
Mono-Kultur	MK
Morbus Dupuytren	M. Dupuytren
Myofibroblasten	MF
Myofibroblasten-Differenzierungsrate	MFDR
Normale humane dermale Fibroblasten	NHDF
Passage einer Zellkultur	P
Phosphate Buffered Saline	PBS
Phosphate Buffered Saline/0,5% Tween 20	PBST
Phycoerythrin	PE
Platelet-Derived Growth Factor	PDGF
Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1	PECAM-1
Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted	RANTES
Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)	RNA
Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)	BSA
Rounds per minute	rpm
Streptavidin-Phycoerythrin	SA-PE
Tabelle	Tab.
Tag 0 Normoxie	T0K
Tag 1 Hypoxie	T1H
Tag 1 Normoxie	T1K
Tag 2 Hypoxie und Reoxygenierung	T2HR
Tag 2 Normoxie	T2K
Transforming Growth Factor α	TGF α
Transforming Growth Factor β_1	TGF β_1
Tumor Necrosis Factor	TNF
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF
Von-Willebrand-Faktor	vWF

1. Zusammenfassung

Beim Morbus Dupuytren handelt es sich um eine Fibromatose der Palmaraponeurose, die zu einer Beugekontraktur der Finger führt. Die Entstehung der Flexionskontraktur ist multikausal und ist sowohl von genetischen Prädilektionsfaktoren, dem Vorhandensein internistischer Erkrankungen als auch von Umwelteinflüssen abhängig. Die wechselseitige Beeinflussung von Fibroblasten aus Morbus Dupuytren, den sog. Dupuytrenfibroblasten und Endothelzellen durch direkte Zell-Zell-Interaktion und über die Zytokinregulation wird bei der Entstehung des Morbus Dupuytren diskutiert. Als pathognomonisch gilt das gehäufte Vorkommen von Myofibroblasten im palmaren Bindegewebe von Patienten mit einem Morbus Dupuytren. Myofibroblasten tragen über den kontraktile Apparat zur Ausbildung der typischen Kontrakturen eines oder mehrerer Finger bei.

Im Rahmen einer partiellen Fasziektomie bei Patienten mit einem Morbus Dupuytren wurden Dupuytrenfibroblasten isoliert und sowohl in Mono-Kultur als auch in Co-Kultur zusammen mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen kultiviert. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Co-Kultur-Wounding-Modell wurden unterschiedliche Charakteristika von Dupuytrenfibroblasten gegenüber normalen humanen dermalen Fibroblasten in Bezug auf die Parameter Migration, Proliferation, myofibroblastoide Differenzierung, Apoptose, Platelet-Derived Growth Factor AA- und Zytokin-Freisetzung nach Normoxie und Hypoxie herausgearbeitet. Durch Fixierung der Zellen an Tag 0, nach 24 h Normoxie bzw. Hypoxie und nach 48 h Normoxie bzw. Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung konnte überprüft werden, ob Dupuytrenfibroblasten im Vergleich zu normalen humanen dermalen Fibroblasten ein spezifisches Muster bzgl. der o. g. Parameter zeigen.

Nach der initialen Erzeugung eines Wundspalts wurde die Zellmigration durch die Vermessung des Spaltschlusses im zeitlichen Verlauf ermittelt. Sowohl die Proliferationsrate als auch die Myofibroblasten-Differenzierungsrate konnten mit Hilfe von Immunfärbungen bestimmt werden und die Unterscheidung von Endothelzellen und Fibroblasten in Co-Kultur erfolgen. Die Apoptoserate wurde mikroskopisch anhand der Ausbildung von Mikronuklei quantifiziert und zusätzlich die Rate frühapoptotischer Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Menge von Platelet-Derived Growth Factor AA in den Zellkulturüberständen wurde mit einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay ermittelt und die Freisetzung weiterer Zytokine mit einem Multiplex Immunoassay bestimmt.

Dupuytrenfibroblasten und normale humane dermale Fibroblasten zeigten bei Mono- und Co-Kultivierung einen ähnlichen Spaltschluss im zeitlichen Verlauf, mit einer signifikanten Hemmung der Migration in den Hypoxie-Kulturen gegenüber den Normoxie-Kulturen. Die Proliferationsrate (Ki-67/MIB-1) der Dupuytrenfibroblasten in Mono- und Co-Kultur war

gegenüber den normalen humanen dermalen Fibroblasten stets tendenziell erniedrigt. Hypoxie führte in allen Kulturen zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation im Vergleich zur Normoxie, mit der tendenziell niedrigsten Proliferationsrate in den Co-Kulturen von Dupuytrenfibroblasten. Die anschließende Reoxygenierung bewirkte einen signifikanten Anstieg der Proliferation in allen Kulturen.

Ausschließlich in den Co-Kulturen von Dupuytrenfibroblasten mit Endothelzellen war die Myofibroblasten-Differenzierungsrate stabil. Sowohl in den Mono-Kulturen als auch den Co-Kulturen von normalen humanen dermalen Fibroblasten fiel die Myofibroblasten-Differenzierungsrate im zeitlichen Verlauf tendenziell ab.

Die Apoptoserate der Dupuytrenfibroblasten und der normalen humanen dermalen Fibroblasten lag an den Tagen 0, 1 und 2 unter Normoxie bei weniger als 0,5%. Nach Hypoxie kam es in allen Zellkulturen zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur Normoxie, mit der geringsten Rate in den Co-Kulturen von Dupuytrenfibroblasten (4%).

Dupuytrenfibroblasten und normale humane dermale Fibroblasten in Mono-Kultur setzten keinen Platelet-Derived Growth Factor AA frei. Bei Co-Kultivierung von Dupuytrenfibroblasten mit Endothelzellen kam es im Gegensatz zu den Co-Kulturen mit normalen humanen dermalen Fibroblasten zu einem tendenziellen Anstieg der Platelet-Derived Growth Factor AA-Konzentration in den Zellkulturüberständen im zeitlichen Verlauf, mit tendenziell erhöhten Konzentrationen in den Hypoxie-Kulturen gegenüber den Normoxie-Kulturen. Dupuytrenfibroblasten in Mono-Kultur setzten nach 24 h Normoxie insgesamt 21 unterschiedliche Zytokine frei. Es zeigte sich der Trend, dass Dupuytrenfibroblasten im Mittel Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (9,26 fg/Zelle), Interleukin-6 (7,48 fg/Zelle) und Vascular Endothelial Growth Factor (6,86 fg/Zelle) am stärksten freisetzten.

Mit dem verwendeten In-vitro-Modell konnten Dupuytrenfibroblasten bzw. normale humane dermale Fibroblasten zusammen mit Endothelzellen kultiviert werden. Es konnten Unterschiede und Gemeinsamkeiten der verschiedenen Zelltypen in Bezug auf Migration, Proliferation, myofibroblastoide Differenzierung, Apoptose und Zytokinfreisetzung aufgezeigt werden. Die wechselseitigen Effekte bei Co-Kultivierung der Dupuytrenfibroblasten bzw. normalen humanen dermalen Fibroblasten mit Endothelzellen sowie der Einfluss der Hypoxie bzw. anschließenden Reoxygenierung auf die ausgewählten Parameter konnte dargestellt werden.

Das Co-Kultur-Wounding-Modell könnte daher in zukünftigen Studien unter Einbeziehung weiterer Parameter und einer größeren Fallzahl verwendet werden, um prognostische Marker zu etablieren, welche zuverlässige Rückschlüsse auf die Zellaktivität und die damit verbundene Krankheitsprogression beim Morbus Dupuytren erlauben.

1. Summary

Dupuytren's disease is a palmar fibromatosis which leads to flexion deformity of the fingers. The origin of the flexion contracture is caused by multiple impacts and depends on genetic predilection factors, the existence of internistic diseases and environmental influences. The mutual influence of fibroblasts from patients with Dupuytren's disease (Dupuytren's fibroblasts) and endothelial cells by both, direct cell-cell interaction and cytokine regulation, is discussed to play a key role in the development of Dupuytren's disease. High occurrence of myofibroblasts which are found in the palmar fascial tissue is a pathognomonic sign. Contractile forces by the cytoskeleton of myofibroblasts lead to typical contractures of one or more fingers.

Patients suffering from Dupuytren's contracture were treated by limited fasciectomy and Dupuytren's fibroblasts were isolated and cultured to create mono-cultures and co-cultures with human dermal microvascular endothelial cells. A co-culture wound model was used in the current study which was considered to be an effective tool to verify different characteristics of Dupuytren's fibroblasts compared to normal human dermal fibroblasts by the parameters migration, proliferation, myofibroblastoid differentiation, apoptosis, platelet-derived growth factor AA and cytokine release under normoxic and hypoxic conditions. It was possible to demonstrate that Dupuytren's fibroblasts present a specific pattern of the used parameters compared to normal human dermal fibroblasts by fixing the cells on day 0, after 24 h of normoxia or hypoxia and after 48 h of normoxia or hypoxia and subsequent reoxygenation.

After initially inducing a scratch wound, cell migration was analysed by measuring the scratch wound closure over time. Using immunocytochemical stainings we were able to determine proliferation rate as well as myofibroblast differentiation rate and identifying endothelial cells in co-culture with fibroblasts. The rate of apoptosis was quantified by the appearance of micronuclei using microscopy and early phase of apoptosis was additionally determined by flow cytometry. An enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the amount of platelet-derived growth factor AA in the cell culture supernatants and a multiplex immunoassay was applied in order to characterise the cytokine release.

Wound closure in mono- and co-cultures of Dupuytren's fibroblasts and normal human dermal fibroblasts was similar over time. There was a significant inhibition of migration in hypoxic cultures compared to normoxic cultures.

Dupuytren's fibroblasts in mono- and co-culture showed a generally decreased proliferation rate (Ki-67/MIB-1) compared to normal human dermal fibroblasts. In all cultures hypoxia led

to a significant inhibition of proliferation compared to normoxic conditions and the lowest proliferation rate by trend was detected in co-cultures of Dupuytren's fibroblasts. Subsequent reoxygenation caused a significant increase of proliferation in all cultures.

Only for co-cultures of Dupuytren's fibroblasts with endothelial cells the myofibroblast differentiation rate seemed to be stable. Throughout the cultivation period normal human dermal fibroblasts revealed a tending decrease of myofibroblast differentiation rate, both in mono- and co-cultures.

The rate of apoptosis of Dupuytren's fibroblasts and normal human dermal fibroblasts was at test day 0, 1 and 2 under normoxia below 0.5%. The rate of apoptosis was significantly increased in all cell cultures after hypoxia compared to normoxia and the lowest number of apoptotic cells was detected in co-cultures of Dupuytren's fibroblasts (4%).

Dupuytren's fibroblasts and normal human dermal fibroblasts in mono-culture did not release platelet-derived growth factor AA. In contrast to co-cultures of normal human dermal fibroblasts, there was a tending increase of platelet-derived growth factor AA-concentration in cell culture supernatants of co-cultures of Dupuytren's fibroblasts together with endothelial cells over time and concentration detected in hypoxic cultures was increased by trend compared to normoxic cultures.

After 24 h of normoxia Dupuytren's fibroblasts in mono-culture released 21 different cytokines in total. In general, the tendency shows, that Dupuytren's fibroblasts released mostly granulocyte macrophage-colony stimulating factor (9.26 fg/cell), interleukin-6 (7.48 fg/cell) and vascular endothelial growth factor (6.86 fg/cell).

The in vitro model established in this study allows for co-culture of Dupuytren's fibroblasts and normal human dermal fibroblasts with endothelial cells. It has been revealed that there are different and common features of the different cell types referring to migration, proliferation, myofibroblastoid differentiation, apoptosis and cytokine release. Alternating effects of co-culturing Dupuytren's fibroblasts and normal human dermal fibroblasts together with endothelial cells as well as the influence of hypoxia and subsequent reoxygenation on the chosen parameters were demonstrated.

The co-culture wound model therefore could be used in future studies by taking additional parameters and a higher case number into account to establish prognostic markers which allow reliable conclusions on cell activity and related Dupuytren's disease progression.

2. Einleitung

2.1 Morbus Dupuytren

2.1.1 Historie und Epidemiologie

Der Morbus Dupuytren (M. Dupuytren) ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, welche über eine Fibromatose der Palmaraponeurose zu einer Verkürzung des palmaren Bandapparates führt und das klinische Bild der Beugekontraktur mit derben bindegewebigen Strängen und Knoten bedingt. Die Prädilektionsstellen der voranschreitenden Fibrosierung betreffen vor allem Ring-, Klein- und Mittelfinger, selten auch Zeigefinger und Daumen (Rayan 2007; Müller et al. 2008).

Die Erstbeschreibung des M. Dupuytren erfolgte bereits Anfang des 17. Jahrhunderts durch Felix Platter. So beschrieb Platter im Jahre 1614 in seinem Werk „Observationum in hominis affectibus“ die Erkrankung als Folge einer Beugesehnenverküzung (Platter 1614). Es dauerte weitere zweihundert Jahre, bis der Pariser Chirurg Baron Guillaume Dupuytren 1831 eine detaillierte Beschreibung der involvierten Strukturen und der möglichen Entstehung der Erkrankung lieferte und so zum Namensgeber der Beugekontraktur wurde (Dupuytren 1831). Unter Berücksichtigung der weltweiten Ausbreitungsgebiete gilt der M. Dupuytren als eine Erkrankung der Wikinger und Kelten (McFarlane 2002). Betrachtet man die Länder mit der höchsten Prävalenz, so zeigt sich ein vermehrtes Auftreten der Beugekontraktur auf dem nordeuropäischen Kontinent sowie ein geringeres auf Kontinenten mit Einwanderern aus dem nordeuropäischen Kulturraum, wie Australien und Nordamerika (Early 1962; Elliot 1999). Dagegen zeigen Afrika, der asiatische Raum und Südamerika eine minimale Prävalenz (Early 1962; Brenner et al. 2001; McFarlane 2002). Die Prävalenz der benignen Fibromatose in der weißen Bevölkerung schwankt zwischen 4-6% (Murrell et al. 1987). In Deutschland beträgt die Anzahl der Betroffenen 1,9 Mio. Menschen (Brenner et al. 2001). Die Inzidenz des M. Dupuytren in Deutschland liegt bei 2,3 % (Brenner et al. 2001).

Obwohl die Dupuytren-Kontraktur in jedem Lebensalter auftreten kann, zeigt sich ein Anstieg der Prävalenz mit zunehmendem Lebensalter. Bei den Männern liegt der Höhepunkt der Krankheitsrate im 6. Lebensjahrzehnt. Frauen erkranken im Schnitt 10-15 Jahre später als Männer, mit einem Häufigkeitsgipfel im 7. Lebensjahrzehnt. Das Geschlechterverhältnis (m:w) der Erkrankten im 6. Lebensjahrzehnt beträgt in Deutschland 7:1 und gleicht sich mit einem Geschlechterverhältnis von 2:1 bei den 90-jährigen aneinander an (Early 1962; Brenner & Rayan 2003).

2.1.2 Anatomie

Der Palmarfaszienkomplex stellt eine dreidimensionale Haltestruktur dar und untergliedert sich in drei Hauptsegmente: Die von der Beugeseite des Unterarmes in die Handfläche einstrahlende Palmarfaszie, die sich wiederum in einen ulnaren, zentralen (= Palmaraponeurose) und radialen Anteil untergliedert und ihren Ursprung im Musculus palmaris longus hat. Distal davon befindet sich die Digitopalmarfaszie, welche in die Digitalfaszie übergeht (Rayan 1999). Die Stabilitätssicherung der Palmaraponeurose wird durch ein Fasersystem gewährleistet, das sich aus longitudinalen, transversalen und vertikalen Fasern zusammensetzt (Brenner & Rayan 2003). Die longitudinalen Fasern (Fasciculi longitudinales) sind nach Legueu und Juvara in prä-tendinöse und intertendinöse Bänder zu unterscheiden (Legueu & Juvara 1892). Oberflächlich verlaufende longitudinale Fasern verankern sich distal der Metacarpophalangealgelenke in der Dermis und führen beim M. Dupuytren zur Bildung der pathognomonischen Grübchen und Noduli (McGrouther 1982). Tiefer gelegene longitudinale Fasern, das sog. Spiralband nach Gosset, verlaufen streckseitig des Ligamentum (Lig.) natatorium, inserieren seitlich der Finger und gehen in die Fingerfaszie über (McFarlane 1974). Diese längs verlaufenden Fasern sind mitverantwortlich für die Entstehung des sog. prä-tendinösen Stranges beim M. Dupuytren (Brenner & Rayan 2003). Die tiefste Schicht der Longitudinalfasern nimmt einen annähernd vertikalen Verlauf und inseriert in enger räumlicher Beziehung zu den Strecksehnen (McGrouther 1982). Die transversalen Fasern (Fasciculi transversales) bilden unter anderem das Lig. natatorium (= Lig. metacarpale transversum superficiale), das einen Teil der Digitopalmarfaszie darstellt, Nerven und Gefäße überspannt und somit Schutz gewährleistet (Tubiana et al. 1982). Die vertikalen Fasern durchlaufen das subkutane Fettgewebe und bilden eine zum Handmittelpunkt hin stärker werdende Verknüpfung der Palmaraponeurose mit der Haut (Rayan 2007).

Durch die dreidimensionale Verankerung der Palmaraponeurose gewährleistet diese einen Schutz der vielbeanspruchten Haut und der darunter befindlichen Strukturen der Handinnenfläche gegenüber mechanischer Krafteinwirkung und schützt die in der Tiefe verlaufenden vaskulären und nervalen Strukturen (Ritter 1973; Rayan 2007).

2.1.3 Ätiologie

Der M. Dupuytren stellt eine multifaktorielle Systemerkrankung dar. Der Hauptprädispositionsort ist die Palmaraponeurose. Inwieweit die lange als Ursache deklarierten (Mikro-) Traumata (Liss & Stock 1996; Livingstone & Field 1999) eine Rolle in der Entstehung der Fibromatose spielen ist noch zu klären. Ein signifikanter Unterschied in der Inzidenz der Palmarfibromatose beim Vergleich von „Kopfarbeitern“ mit „Handarbeitern“ konnte nicht erbracht werden. Jedoch wiesen Schwerarbeiter eine ausgeprägtere Beugekontraktur auf, als Patienten mit mittelgradiger oder geringer handwerklicher Betätigung (Early 1962; Brenner et al. 2001; Berger & Hierner 2009). Ein Anstieg der Inzidenz zeigte sich bei Probanden, welche mittelschwere handwerkliche Arbeiten verrichteten (Early 1962).

Zudem wird ein Alkoholabusus als Triggerfaktor diskutiert. Die durch chronischen Alkoholkonsum hervorgerufene Degeneration der Palmaraponeurose bedingt eine lokale Hypoxie. Dadurch wird eine adäquate Oxidation langkettiger Fettsäuren in der Palmaraponeurose von Dupuytrenpatienten verhindert und ein erhöhter Octanoat Spiegel sowie die Ansammlung kurzkettiger Fettsäuren hervorgerufen. Diese pathologischen Stoffwechselprodukte lagern sich u.a. in der Palmarfaszie ab. Die lokale Hypoxie bedingt u.a. eine Proliferation von Fibroblasten im Palmargewebe von Dupuytrenpatienten (Rabinowitz et al. 1983).

Der Zusammenhang zwischen Nikotinabusus und dem gehäuften Auftreten des M. Dupuytren ist über die Verbindung zur mikrovaskulären Verschlusskrankheit gegeben. Die Okklusion mikrovaskulärer Strukturen führt zu einer lokalen Hypoxie, welche wiederum die Entstehung von Sauerstoffradikalen bedingt (Murrell et al. 1987; Murrell et al. 1990). Diese Sauerstoffradikale können die Fibroblastenproliferation fördern (Murrell 1991; Burge et al. 1997). Diabetiker weisen eine mit der Erkrankungsdauer zunehmende Inzidenz des M. Dupuytren auf (Noble et al. 1984). Die Inzidenz des M. Dupuytren ist auch bei Menschen mit Epilepsie deutlich erhöht. Des Weiteren weisen Epileptiker auffallend häufig beidseitige Kontrakturen mit ähnlichem Kontraktionsmuster auf (Early 1962).

Die erhöhte Inzidenz bei Kaukasiern und die Geschlechterprävalenz zugunsten von Männern macht eine genetische Disposition wahrscheinlich. Neben einer autosomal-rezessiven Vererbung wird ein autosomal-dominanter Erbgang mit einer unterschiedlichen Penetranz in den beiden Geschlechtern diskutiert (McFarlane 1997). Gewebeproben aus der Palmarregion, die bei Dupuytrenpatienten entnommen wurden, zeigten sowohl strukturelle als auch numerische Chromosomenanomalien (Wurster-Hill et al. 1988).

2.1.4 Klinik

Wichtig für die Diagnosestellung des M. Dupuytren ist neben einer gründlichen Familienanamnese und Erörterung der prädisponierenden Faktoren die Inspektion der betroffenen Extremitäten und die Erhebung eines palpatorischen Befundes (Bruch & Trentz 2008; Müller et al. 2008).

Die Erkrankung präsentiert sich anfänglich mit einer veränderten Plastizität der Haut im Bereich der distalen Hohlhand, bedingt durch die Verdickung der vertikalen Verbindungsfasern zwischen Haut und Palmaraponeurose, den Grapow-Fasern. Durch Veränderung der prä-tendinösen Bänder finden sich im weiteren Verlauf grubchenförmige Einziehungen oder singuläre Knoten. Bei zunehmender Progression der Erkrankung kommt es zur Ausbildung der pathognomonischen Stränge, die im weiteren Verlauf die typische Beugekontraktur bedingen (Brenner & Rayan 2003; siehe Abb. 1). Neben den typischen Flexionskontrakturen der Finger weist die Erkrankung gehäuft ektope Lokalisationen mit Fibromatosen auf. Dazu zählen Fingerknöchelpolster, die Fibromatose der Plantaraponeurose (M. Ledderhose) und die Penisfibromatose (Peyronie-Krankheit). Zumeist liegt eine positive Familienanamnese vor (Rayan 2007).

Eine Unterscheidung des klassischen M. Dupuytren von der sogenannten „Non-Dupuytren's disease“ der Palmarfaszie ist notwendig, da sich hieraus unterschiedliche Krankheitsverläufe und Therapieoptionen ergeben (Rayan & Moore 2005). Die „Non-Dupuytren's disease“ betrifft Patienten verschiedenster Herkunft ohne Hinweis auf eine familiäre Beteiligung. Die Betroffenen sind in allen Altersklassen zu finden und berichten häufig über ein vorangegangenes Trauma der betroffenen Hand. Die Kontraktur findet sich häufig einseitig (Rayan & Moore 2005; Rayan 2007). Differentialdiagnostisch sind u.a. Erkrankungen zu beachten, die Kontrakturen und Hautveränderungen nach sich ziehen, wie Narben (post-traumatisch), Morbus Sudeck, Hyperkeratose, Knochenkallus, Neoplasien (z.B. pigmentierte villonoduläre Synovitis, epitheloides Sarkom etc.), palmare Ganglien, Zysten, Tendovaginitis stenosans und Arthritiden (Rayan & Moore 2005; Rayan 2007; Müller et al. 2008).

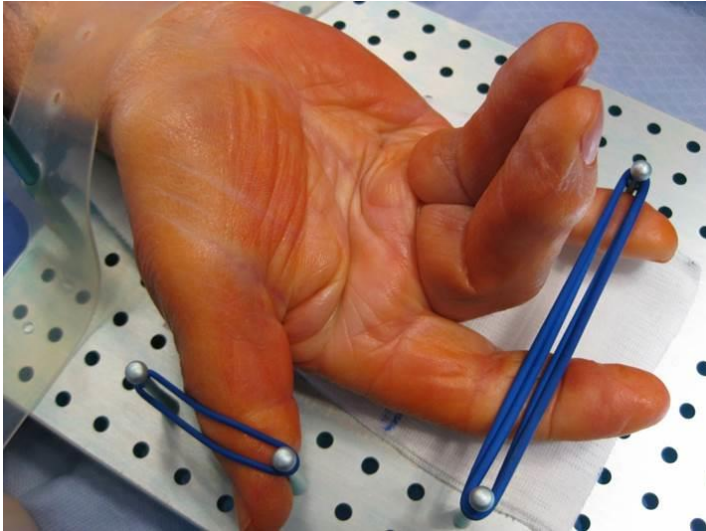


Abbildung 1:

Typische Beugekontraktur der rechten Hand mit Befall des Mittel- und Ringfingers und sichtbarem Strang im Segment IV (mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Rolf-Dieter Mayer).

2.1.5 Stadieneinteilung nach Tubiana

Der Stadieneinteilung des M. Dupuytren liegt nach Tubiana eine makroskopische Segmentierung der Hand in 5 Bereiche zugrunde (Tubiana & Michon 1961). Jedes Segment repräsentiert einen Finger und das dazugehörige proximal verlaufende Hohlhandareal. Das Stadium spiegelt die Gesamtkontraktur des Metacarpophalangealgelenks sowie des proximalen und distalen Interphalangealgelenks im jeweiligen Segment wider. Das jeweilige Stadium klassifiziert eine schrittweise Gesamtkontraktur von 45° eines einzelnen Segments. Das Vorkommen eines Knotens ohne Beugekontraktur wird mit N (Nodus) vermerkt. Dies ermöglicht die separate Einteilung des M. Dupuytren in 6 Stadien für jedes Segment einer Hand (siehe Tab. 1).

Die Stadieneinteilung nach Tubiana hat sich im klinischen Gebrauch durchgesetzt und fand auch in dieser Arbeit zur Einteilung des Schweregrads der Beugekontrakturen bei den Patienten Anwendung.

Tabelle 1: Klassifikation der Dupuytren-Kontraktur nach Tubiana.

Stadium nach Tubiana	Grad der Gesamtkontraktur in einem Segment
Stadium 0	Keine Kontraktur oder Knotenbildung
Stadium N	Tastbarer Knoten aber keine Kontraktur
Stadium I	Kontraktur von 1°- 45°
Stadium II	Kontraktur von 46°- 90°
Stadium III	Kontraktur von 91°- 135°
Stadium IV	Kontraktur >135°

2.1.6 Mikroskopische Stadieneinteilung nach Luck

Neben der o.g. klinischen Stadieneinteilung ist auch eine mikroskopische Einteilung operativ entnommener Gewebeproben der Palmarfaszie von Dupuytrenpatienten nach Luck (Luck 1959) möglich, welche 3 Phasen unterscheidet:

Proliferationsstadium

Das Proliferationsstadium beinhaltet die Bildung eines gut vaskularisierten, bindegewebigen Knotens, der reich an Myofibroblasten (MF) und Fibroblasten ist und einen geringen Anteil an Kollagen und extrazellulärer Matrix besitzt (Otto 2004). Klinisch kann ein derber Knoten getastet werden.

Involutionsstadium

In diesem Stadium richten sich die Fibroblasten längs der Zugkräfte und parallel zueinander aus (Luck 1959). Des Weiteren verschiebt sich das Verhältnis von Fibroblasten zu extrazellulärer Matrix mit Zunahme des Kollagenanteils (Luck 1959; Gabbiani & Majno 1972). Die Fibroblasten selbst weisen in diesem Stadium eine charakteristische Trias auf. In den Fibroblasten entwickelt sich ein intrazytoplasmatisches Fasersystem (Gabbiani et al. 1972; Gabbiani & Majno 1972) bestehend aus Aktin-Mikrofilamenten (Gabbiani 1992), das sich parallel der Zugkräfte und längs der Zellen ausrichtet und das Zytoplasma verdrängt. Der Zellkern verformt sich und weist Einkerbungen auf. Es kommt zu einer Veränderung der Zelloberfläche, die durch die Ausbildung von Desmosomen sowohl eine enge Verknüpfung der Fibroblasten untereinander als auch mit Endothelzellen erlaubt (Gabbiani et al. 1972). Aufgrund der morphologischen Charakteristika wurden diese Zellen als MF bezeichnet

(Gabbiani et al. 1972; Gabbiani & Majno 1972; Shum & McFarlane 1988). Klinisch präsentiert sich die charakteristische Beugekontraktur mit Ausbildung des typischen Strangs.

Residualstadium

Im Residualstadium kommt es zur Apoptose der MF und es verbleibt ein fibrotischer, kollagenreicher, hypertropher Narbenstrang, der die Kontraktur aufrecht erhält und eine Extension unmöglich macht (Luck 1959; Otto 2004). Auf welche Weise die Apoptose induziert wird ist noch unklar. Diskutiert wird ein Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsabfall spezifischer Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor β_1 (TGF β_1), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor α (TGF α) und Tumor Necrosis Factor (TNF; Desmoulière et al. 1995).

Der M. Dupuytren ist eine selbstlimitierende Erkrankung, die schubförmig oder chronisch progredient verlaufen kann (Otto 2004). Die Beugekontraktur kann sich innerhalb eines kurzen Zeitraums entwickeln oder sich erst nach vielen Jahren ausbilden und sog. Phasen des Stillstands annehmen (Brenner & Rayan 2003). Eine direkte Korrelation zwischen klinischer und mikroskopischer Stadieneinteilung ist somit nur bedingt möglich.

2.1.7 Therapie

Konservative Therapie

Im Stadium 0-I nach Tubiana empfiehlt sich eine konservative Therapie (Müller et al. 2008). Solange die betroffene Hand nur minimale Kontrakturen aufweist und der Patient nicht über eine ausgeprägte Funktionseinschränkung berichtet, sind konservative Maßnahmen indiziert (Bisson et al. 2003; Rayan 2007). Zu den konservativen Therapiekonzepten zählen die lokale Anwendung von Kalziumkanalblockern wie Verapamil und Nifedipin (Rayan et al. 1996), Vitamin E (Berger & Hierner 2009), Kortison oder Dimethylsulfoxid (DMSO; Berger & Hierner 2009), sowie die Unterspritzung mit enzymatisch wirksamen Medikamenten wie Hyaluronidase und Trypsin (Bassot 1965; Hueston 1971). Ebenfalls wird eine Kombination aus lokaler Injektion einer Kollagenase in das fibrosierte Areal und eine anschließende mechanische Extension mittels eines Fixateur externe beschrieben. Die Kollagenase bewirkt eine Reduktion der mechanischen Spannung im fibrotischen Gewebe und ermöglicht die Ruptur des Narbenstranges (Badalamente & Hurst 2007; Hurst et al. 2009). Ferner kommen fakultativ Ultraschalltherapie und Physiotherapie zur Anwendung (Berger & Hierner 2009). Im Stadium I-II nach Tubiana wird die Radiotherapie als das Mittel der Wahl proklamiert (Adamietz et al. 2001).

Sämtliche der oben angegebenen Therapieverfahren sind mit einer hohen Rezidivrate und potentiellen Komplikationen verbunden. Eine deutliche Verminderung der Krankheitsprogression auf lange Sicht ist oft nicht möglich (Brenner & Rayan 2003; Rayan 2007; Berger & Hierner 2009).

Chirurgische Therapie

Die Indikation für eine chirurgische Intervention besteht, wenn der subjektive Leidensdruck des Patienten bei progredienter Beugekontraktur zu hoch wird oder eine Funktionseinschränkung bei Alltagstätigkeiten vorliegt (Brenner & Rayan 2003).

Die Fasziotomie stellt ein minimalinvasives Verfahren dar, in dem es durch die Durchtrennung des die Kontraktur verursachenden Stranges zu einer Wiederherstellung der Funktionalität des betroffenen Fingers kommt. Indiziert ist dieses Verfahren vor allem bei multimorbiden Patienten und Situationen, in denen ein großer operativer Eingriff kontraindiziert ist (Brenner & Rayan 2003).

Die Nadelfasziektomie stellt ebenfalls ein minimalinvasives Verfahren dar, bei dem unter Lokalanästhesie und der Verwendung einer Kanüle eine Strangunterbrechung durchgeführt wird (Badois et al. 1993).

Die partielle Fasziektomie oder „limited fasciectomy“, welche von Hueston (1961) beschrieben wurde, stellt heute die Methode der Wahl dar (Hueston 1961; Berger & Hierner 2009). Neben der Strangexzision erfolgt die chirurgische Entnahme des umgebenden Fasziengewebes, sowie der vertikal verlaufenden Fasern (Freehafer & Strong 1963; Berger & Hierner 2009).

Die radikale Fasziektomie nach McIndoe ist indiziert, solange noch keine ausgeprägten Funktionseinschränkungen bestehen und die Haut der Hohlhand nicht betroffen ist (McIndoe & Beare 1958; Krebs 1975). Bei diesem radikalen Verfahren wird die Palmaraponeurose mit ihren pathologischen und gesunden Anteilen en-bloc entfernt. Im direkten Vergleich mit der partiellen Fasziektomie geht dieses Verfahren jedoch mit einer erhöhten Komplikationsrate (Wundheilungsstörung mit Nekrosen der Haut, Blutergüsse und Sudeck-Syndrom) einher (Zachariae 1967).

Fakultativ kann der Fasziektomie die „Continuous elongation technique“, eine Extensionsbehandlung des betroffenen Fingers, z.B. mittels Schiene oder Fixateur externe, vorausgehen. Dieses Verfahren kann Deformitäten der Finger präoperativ kurzzeitig beheben, den operativen Eingriff erleichtern und somit bevorstehende Amputationen verhindern (Jensen et al. 1993; Bailey et al. 1994; Brenner & Rayan 2003).

2.2 Der Myofibroblast

Die MF spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese des M. Dupuytren. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit zu glatten Muskelzellen wurden diese Zellen als MF bezeichnet (Gabbiani et al. 1972). MF finden sich in den unterschiedlichsten Geweben wie Lungensepten (Kapanci et al. 1992), Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi; Böck et al. 1972), Lymphknoten (Toccanier-Pelte et al. 1987), Milz (Toccanier-Pelte et al. 1987), Leber (Ballardini et al. 1988) oder der Capsula der Nebennierenrinde (Bressler 1973). Den MF des M. Dupuytren kommt eine tragende Rolle bei der Entstehung der Dupuytren'schen Kontraktur zu.

MF weisen, ähnlich wie Fibroblasten, einen ausgeprägten Golgi-Apparat und ein prominentes raues endoplasmatisches Retikulum auf (Gabbiani et al. 1972; Gabbiani & Majno 1972). Im Unterschied zu Fibroblasten besitzen MF jedoch Eigenschaften ähnlich zu glatten Muskelzellen. MF besitzen ein Zytoskelett aus parallel angeordneten Alpha-Smooth-Muscle-Actin (α -SMA)-Mikrofilamenten (Gabbiani et al. 1972; Gabbiani & Majno 1972). MF weisen in der Zelloberfläche Desmosomen bzw. Gap Junctions auf, die eine Zell-Zell-Interaktion erlauben (Gabbiani et al. 1972). Trotz der strukturellen Ähnlichkeit mit glatten Muskelzellen ist eine Differenzierung der MF aus Fibroblasten wahrscheinlich (Gabbiani et al. 1972; Eddy et al. 1988; Darby et al. 1990; Welch et al. 1990; Rayan & Tomasek 1994; Masur et al. 1996). Gestützt wird diese Hypothese durch die vergleichende Analyse etlicher Proteine in Fibroblasten, MF und glatten Muskelzellen. Eine Zwischenstufe der Entwicklung zwischen Fibroblasten und ausdifferenzierten MF stellen die Proto-MF dar. Deren kontraktile Apparat gleicht dem der Fibroblasten, bestehend aus verschiedenen Aktinisoformen unter Aussparung des α -SMA. Erst der differenzierte MF exprimiert α -SMA (Tomasek et al. 2002). Der kontraktile Apparat glatter Muskelzellen besteht konstitutiv aus α -SMA und Smooth-Muscle-Myosin (Rayan & Tomasek 1994). Glatte Muskelzellen liegen einer Basallamina auf und stehen in Kontakt mit dem Typ IV Kollagen der extrazellulären Matrix. Das Protein Laminin fehlt bei Fibroblasten und MF gänzlich (Tomasek et al. 1987; Eddy et al. 1988). An seine Stelle tritt das Protein Fibronectin. Dieses interagiert mit Aktin im Zellinneren und dem Typ I und III Kollagen der extrazellulären Matrix und bildet mit anderen Proteinen den sogenannten Fibronexus, der sowohl eine Interaktion über die Zellmatrix als auch die für MF typische Zell-Zell-Interaktion gewährleistet (Halliday & Tomasek 1995). Dieser Fibronexus sichert die Übertragung intrazellulärer Kräfte auf die extrazelluläre Matrix und umgekehrt (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka 1996; Chicurel et al. 1998).

Als Marker der Zelldifferenzierung der MF aus Fibroblasten galten lange Desmin und Vimentin (Schürch et al. 1984). Desmin galt als Marker der Zellen, die von glatten

Muskelzellen abstammen (Brenner & Rayan 2003). Vimentin dagegen galt als Marker von Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Fibroblasten (Franke et al. 1978). Vimentin findet sich jedoch sowohl in Fibroblasten (Schmid et al. 1982), MF (Schürch et al. 1984) als auch glatten Muskelzellen (Schmid et al. 1982). Desmin ließ sich zunächst nicht in MF, sondern nur in glatten Muskelzellen nachweisen (Schmid et al. 1982; Schürch et al. 1984). Im zeitlichen Verlauf gelang der Nachweis von Desmin jedoch auch in Nicht-Muskelzellen. Dazu zählen u.a. Podozyten (Stamenkovic et al. 1986) und Endothelzellen (Fujimoto & Singer 1986). Skalli et al. konnten ein heterogenes Muster der Zusammensetzung des Zytoskeletts von MF u.a. mit dem Nachweis von Desmin aufzeigen (Skalli et al. 1989). Die Zusammensetzung des Zytoskeletts von MF in Bezug auf Desmin und Vimentin variiert derart, dass diese als Zellmarker heute ungeeignet erscheinen (Gabbiani 1992). Da α -SMA ausschließlich bei differenzierten MF und nicht bei den Vorläuferzellen wie den Fibroblasten oder den Proto-MF zu finden ist, eignet es sich als sensitiver Marker zur Unterscheidung von Fibroblasten und MF (Serini & Gabbiani 1999; Tomasek et al. 2002).

Zwei wichtige Stimuli können die Differenzierung des Fibroblasten zum MF bedingen: eine anhaltende mechanische Spannung in der extrazellulären Matrix (Halliday & Tomasek 1995) und die Freisetzung von PDGF (Tomasek et al. 2002). Die Freisetzung von PDGF konnte bereits aus Fibroblasten (Antoniades et al. 1991; Terek et al. 1995; Alman et al. 1996; Heldin & Westermark 1999) und Endothelzellen (Collins et al. 1987; Hsieh et al. 1991; Heldin & Westermark 1999) belegt werden. Fibroblasten produzieren eine kollagenreiche Matrix, mit der sie über Fibronectin verknüpft sind, zudem lagern sie sich parallel zu den bestehenden Zugkräften an (Petroll et al. 1993). $TGF\beta_1$ induziert die Synthese großer Mikrofilamentenbündel aus α -SMA in MF (Desmoulière et al. 1993; Vaughan et al. 2000; Hinz et al. 2001). Es folgt die Entwicklung ausgeprägter Aktin-Mikrofilamente, sogenannter „stress fibers“ (Petroll et al. 1993; Halliday & Tomasek 1995).

Die Entstehung der Dupuytren'schen Kontraktur erfolgt durch das Kontrahieren von MF und die Kraftübertragung auf die Extrazellulärmatrix gemäß der Gleit-und-Verankerungs-Theorie (Welch et al. 1990; Tomasek et al. 2002). Als erstes kommt es zu einer Kontraktion im Zellinneren, ausgehend von der Wechselwirkung zwischen α -SMA und Non-Smooth-Muscle-Myosin. Diese Spannungsveränderung im Inneren der MF wird über die Fibronexi an die extrazelluläre Matrix übertragen und an benachbarte MF weitergeleitet, deren „stress fibers“ sich kontrahieren (Tomasek et al. 1987; Tomasek et al. 2002). Neues Kollagen, vorrangig Typ III, wird produziert, um die extrazelluläre Matrix in ihrem gegenwärtigen Zustand zu verankern (Welch et al. 1990). Über eine positive Rückkopplung kommt es erneut zur Kontraktion der MF.

2.3 Endothelzellen und Bedeutung der Hypoxie

Der Begriff Hypoxie setzt sich zusammen aus dem Präfix „hypo“ und dem Substantiv „oxygenium“ und steht für einen relativen Sauerstoffmangel (Bühling et al. 2004). Für die Entstehung des M. Dupuytren werden verschiedene Faktoren diskutiert, welche alle zu einer lokalen Hypoxie im fibrotischen Bindegewebe der Handinnenfläche führen. Die lokale Hypoxie ist das Resultat von Gewebedestruktion, einem progredient verlaufenden Gefäßverschluss und der Ablagerung und Interaktion pathologischer Stoffwechselprodukte wie Methylester, freiem Cholesterol sowie kurzkettigen Fettsäuren und Octanoat (Brenner & Rayan 2003).

Die Palmaraponeurose ist ein gut perfundiertes Areal, das von vielen Gefäßen versorgt wird (Schrader et al. 1997). Endothelzellen spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, der Ausbildung von Gefäßlumen sowie der Freisetzung vasoaktiver Substanzen und nehmen damit eine zentrale Rolle in der Sauerstoffversorgung von Geweben ein (Schmidt et al. 2005). Als einer der wichtigsten Regulatoren der Angiogenese und Endothelzellproliferation gilt der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF; Schmidt et al. 2005). Endothelzellen sind in der Lage, durch die Freisetzung von PDGF sowohl die Migration von glatten Muskelzellen (Schmidt et al. 2005) als auch die Migration (Heldin & Westermark 1999), Proliferation (Terek et al. 1995) und Differenzierung (Tomasek et al. 2002) von Fibroblasten zu beeinflussen.

Durch die mikrovaskuläre Gefäßokklusion kommt den Endothelzellen eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Dupuytren'schen Kontraktur zu (Comtet & Bourne-Branchu 1986). Bedingt durch Alter, Geschlecht, genetische Prädisposition und Erkrankungen wie Diabetes kommt es durch das Vorrücken von Endothelzellen in das Mikrogefäßlumen zu einer sukzessiven Okklusion der Gefäße, welche die Palmaraponeurose durchziehen (Kischer & Speer 1984; Brenner & Rayan 2003). Diese Gefäßlumeneinengung resultiert in einer lokalen Hypoxie (Kischer & Speer 1984). In dem hypoxischen Gewebe kommt es zu einem gesteigerten Abbau von Adenosintriphosphat und folglich zu einem Anstieg der Abbauprodukte Hypoxanthin und Xanthin. Zudem ist die Aktivität des Enzyms Xanthinoxidase, als auch seine Verstoffwechslung aus der Hypoxanthindehydrogenase gesteigert (Brenner & Rayan 2003). Die höchste Konzentration der Hypoxanthindehydrogenase findet sich beim Menschen in den Endothelzellen der Kapillaren (Brenner & Rayan 2003). Vergleicht man die Konzentration von Hypoxanthin in den Palmarfaszien von Dupuytrenpatienten mit der Konzentration von Hypoxanthin in den Palmarfaszien einer Kontrollgruppe, zeigt sich bei den Dupuytrenpatienten eine 6-fach höhere Konzentration (Murrell et al. 1987).

Hypoxanthindehydrogenase und Xanthinoxidase sind für die Verstoffwechslung von

Hypoxanthin zu Xanthin und in einem Folgeschritt zu Urat verantwortlich. In beiden Reaktionen dient Sauerstoff als Elektronenakzeptor. So entstehen als Nebenprodukt dieses Stoffwechsels freie Radikale, Superoxidionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (OH \cdot -Radikale; Murrell et al. 1987). In hohen Dosen haben diese Radikale v.a. eine toxische Wirkung auf Perizyten und bewirken indirekt eine Proliferation von Fibroblasten (Murrell et al. 1987, Murrell et al. 1990). Fibroblasten reagieren mit einer überschießenden Produktion von Kollagen sowie einer Freisetzung weiterer freier Radikale, was wiederum zu einer Gewebedestruktion und einem konsekutiven Anstieg der Hypoxie führt (Murrell et al. 1990).

Da die Hypoxie in der Pathogenese des M. Dupuytren, wie auch in der normalen Wundheilung, eine zentrale Rolle einnimmt und maßgeblichen Einfluss auf die Geweberegeneration besitzt, ist es sinnvoll, die Auswirkung der Hypoxie auf die beteiligten Zellen zu untersuchen. So gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Grad der Fibroblastenproliferation, der stimulierenden freien Radikalkonzentration und der Dauer der Hypoxie. Während kurzfristige Hypoxie die Proliferation der Fibroblasten triggert (Falanga & Kirsner 1993; Eul et al. 2006), werden diese durch chronische Hypoxie in ihrer Proliferation gehemmt (Siddiqui et al. 1996). Die in diesem experimentellen Modell angewandte Hypoxie kann mit einer Dauer von 24 h und einem Sauerstoffpartialdruck im Zellkulturmedium ≤ 5 mmHg als eine akute und starke Hypoxie angesehen werden.

2.4 Bedeutung der Zytokine

Der Platelet-Derived Growth Factor AA (PDGF AA) gehört zur PDGF-Familie. Diese Wachstumsfaktoren stellen Dimere aus Polypeptidketten dar, welche über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Je nach Kombination der Polypeptide liegen sie als Hetero- oder Homodimere vor (Heldin & Westermark 1999). PDGF wurde zum ersten Mal in Thrombozyten nachgewiesen (Kohler & Lipton 1974; Antoniades et al. 1979). PDGF spielt eine wichtige Rolle in der Chemotaxis (Deuel & Huang 1984). Der Wachstumsfaktor besitzt eine kurze Halbwertszeit in Plasma und unterliegt einer autokrinen und parakrinen Sekretion (Bowen-Pope et al. 1984; Terek et al. 1995). Die Freisetzung von PDGF erfolgt unter anderem aus Fibroblasten (Paulsson et al. 1987; Antoniades et al. 1991; Terek et al. 1995), glatten Muskelzellen (Nilsson et al. 1985), Endothelzellen (Collins et al. 1987) und Epithelzellen (Antoniades et al. 1991).

PDGF stellt ein starkes Mitogen für Zellen, besonders für Fibroblasten und glatte Muskelzellen dar (Heldin & Westermark 1999). Eine wichtige Aufgabe kommt PDGF in der

Wundheilung zu (Deuel & Huang 1984; Antoniades et al. 1991). So induziert PDGF einen Anstieg der Zellproliferation (Ross 1987; Terek et al. 1995), eine damit verbundene Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Synthese (Canalis 1981; Owen et al. 1982; Ross 1987) und eine gesteigerte Typ III Kollagen-Synthese (Terek et al. 1995). Neben der gesteigerten Migration bewirkt PDGF eine Ausrichtung von Aktinfilamenten entlang der Längsachse in MF und stimuliert deren Kontraktion (Clark et al. 1989).

Auch Gewebedestruktion und anhaltender mechanischer Stress induzieren die Freisetzung von PDGF (Antoniades et al. 1991; Wilson et al. 1993; Alman et al. 1996). Fibrotische Dysplasien, benigne Fibromatosen und Tumore weisen eine erhöhte Genexpression von PDGF B auf (Alman et al. 1995). Terek et al. konnten nachweisen, dass es sich bei den Zellen, die PDGF B sezernieren, um Fibroblasten handelt (Terek et al. 1995). Hypoxie triggert in Endothelzellen die Genexpression von PDGF B (Kourembanas et al. 1997).

Badalamente et al. wiesen das Vorkommen von PDGF in der Palmarfaszie von Patienten mit einem M. Dupuytren nach (Badalamente et al. 1992). Des Weiteren konnte ein Anstieg der messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression der A- und B-Ketten des Wachstumsfaktors in Zusammenhang mit mechanischem Stress in Gewebe aus Patienten mit einem gesicherten M. Dupuytren belegt werden, wohingegen kein Anstieg in Palmarfaszien von Gesunden zu verzeichnen war (Alman et al. 1996).

Neben PDGF existieren weitere Zytokine, die Fibroblasten aus M. Dupuytren und damit die Entstehung der Dupuytren'schen Kontraktur beeinflussen (Alioto et al. 1994). Der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) bewirkt neben einer gesteigerten Fibroblastenproliferation (Alioto et al. 1994) auch eine Stimulation der Angiogenese (Cross & Claesson-Welsh 2001). Als Folge der Freisetzung von bFGF aus Endothelzellen kommt es u.a. zu einer übermäßigen Kollagenproduktion der Fibroblasten, wodurch es zur Fibrosierung der Palmarfaszie kommt (Alioto et al. 1994).

TGF β_1 kommt eine Schlüsselrolle in der Differenzierung der MF zu. So stimuliert TGF β_1 neben der Synthese der kontraktiven Mikrofilamentbündel aus α -SMA (Desmoulière et al. 1993; Vaughan et al. 2000; Hinz et al. 2001) ebenfalls die übermäßige Produktion von kollagenhaltigem Bindegewebe durch Fibroblasten und MF und eine daraus resultierende Fibromatose (Petrov et al. 2002). Zusätzlich bewirkt TGF β_1 über eine autokrine Freisetzung von PDGF AA aus Fibroblasten eine Stimulation der Zellproliferation (Battegay et al. 1990).

Der Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) besitzt neben seiner Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen einen stimulierenden Einfluss auf die Fibroblastenproliferation und die Ausbildung von α -SMA in MF (Rubbia-Brandt et al. 1991). Darüber hinaus stimuliert GM-CSF die Migration und Proliferation von Endothelzellen (Bussolino et al. 1989).

Untersuchungen von Palmarfaszien mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion erbrachten den Nachweis des gehäuften Vorkommens der mRNAs von Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), PDGF A und B, TGF β und bFGF bei Dupuytrenpatienten im Vergleich zu Gesunden (Baird et al. 1993). IL-1 stimuliert wie TGF β ₁ und GM-CSF die Proliferation von Fibroblasten (Postlethwaite et al. 1984).

VEGF scheint als wichtiger Induktor der Angiogenese durch Stimulation der Migration und Proliferation von Endothelzellen eine wichtige Rolle in der Entstehung der Beugekontraktur zuzukommen (Hoeben et al. 2004). So konnten Holzer et al. anhand von immunhistochemischen Untersuchungen eine erhöhte Expression von VEGF, VEGF-Rezeptor 1 und 2 und dem Hypoxia-inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α) in der Palmaraponeurose von Dupuytrenpatienten während der Involutionsphase nachweisen (Holzer et al. 2013).

2.5 Co-Kultur-Modell

Da die Entstehung der Palmarfibromatose ausschlaggebend vom Verhalten und der Interaktion der Fibroblasten, MF und Endothelzellen beeinflusst wird, könnte die Betrachtung der Interaktion dieser Zelltypen mit einem geeigneten experimentellen Modell das Verständnis der Krankheitsgenese unterstützen.

Diese Arbeit orientiert sich an einem etablierten In-vitro-Co-Kultur-Modell, das die Betrachtung der Zellinteraktionen durch gemeinsames Kultivieren von Fibroblasten, MF und Endothelzellen ermöglicht. Grundlage ist der sog. Co-Culture Scratch-Wound Migration Assay (CCSWMA; Oberringer et al. 2007). Dazu wurde die Co-Kultivierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) mit normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) um einen Wundheilungsassay erweitert. Zusätzlich war es mit dem hier weiterentwickelten In-vitro-Co-Kultur-Modell möglich, Dupuytrenfibroblasten (DF) sowohl in Mono-Kultur (MK) als auch in Co-Kultur (CK) zusammen mit HDMEC zu kultivieren. Die in dieser Arbeit verwendeten DF entstammen der Palmaraponeurose von Patienten mit einem M. Dupuytren (\geq II° nach Tubiana). In der aktuellen Arbeit wurde die Auswirkung einer 24-stündigen Hypoxie auf die Parameter Migration, Proliferation, MF-Differenzierung und Zytokin-Freisetzung untersucht.

Ziel des hier vorgestellten Co-Kultur-Wounding-Modells ist die vergleichende Analyse der Reaktion von DF und NHDF auf Hypoxie und zu identifizieren, inwieweit Unterschiede in der Zellantwort von DF und NHDF auf eine Co-Kultivierung mit HDMEC bestehen. Des Weiteren kann die Response der Endothelzellen auf Hypoxie und auf die Co-Kultivierung mit DF bzw. NHDF dargestellt werden.

2.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Weiterentwicklung und Nutzung des In-vitro-Co-Kultur-Modells zur Charakterisierung der Zell-Response der unterschiedlichen Zelltypen im Rahmen ihrer Interaktion und auf einen typischen Stimulus des M. Dupuytren (Hypoxie).

1. Ist es möglich, aus M. Dupuytren gewonnene Fibroblasten und Endothelzellen (HDMEC) zusammen in einem Co-Kultur-Wounding-Modell zu kultivieren?
2. Sind die Parameter Migration, Proliferation, myofibroblastoide Differenzierung, Apoptose, Zytokinrelease und der Vergleich Mono- und Co-kultivierter DF geeignet, charakteristische Unterschiede zu NHDF aufzuzeigen?
3. Zeigen DF und NHDF eine unterschiedliche Antwort auf experimentelle Hypoxie?
4. Zeigen DF und NHDF eine unterschiedliche Antwort beim Kontakt mit HDMEC?
5. Zeigen HDMEC eine unterschiedliche Antwort beim Kontakt mit DF bzw. NHDF?
6. Inwieweit lassen sich die in vitro gewonnenen Erkenntnisse auf die In-vivo-Situation beim M. Dupuytren übertragen?

3. Material und Methodik

3.1 Zellkultivierung

3.1.1 Allgemeines Setup

Das Ausgangsmaterial für diese Arbeit stellten DF aus reseziertem Gewebe von Patienten mit einem klinisch gesicherten M. Dupuytren sowie kommerziell erhältliche, primäre Fibroblasten und HDMEC der Firma Promocell dar. Nach Expansion wurden die Zellen 24 h vor dem Start des Experiments in Form von MK bzw. CK auf jeweils 7 Objektträger (OT) überführt. Die CK bestanden aus HDMEC zusammen mit DF oder NHDF. Zu Versuchsbeginn (Tag 0) wurden Mikrowunden durch Scratches induziert. Jeweils 1 Kontrollpräparat der MK und CK wurde an Tag 0 (T0K) fixiert (siehe Abb. 2). Parallelpräparate wurden an Tag 1 nach Hypoxie (T1H, $pO_2 \leq 5\text{mmHg}$) sowie an Tag 2 nach anschließender Reoxygenierung (T2HR) zusammen mit den jeweiligen Kontrollen (T1K, T2K) fixiert. Des Weiteren wurde bei einem Teil der Experimente an Tag 1 jeweils ein zusätzlich angelegtes Parallelpräparat nach Normoxie (T1K) und nach Hypoxie (T1H) entnommen und die Rate frühapoptotischer Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. An den einzelnen Versuchstagen wurden vor Fixierung der Präparate Zellkulturüberstände entnommen, um die Konzentration von PDGF AA im zeitlichen Verlauf mittels ELISA bestimmen zu können und um den Zytokinrelease der DF in MK nach 24 h Normoxie (T1K) mit einem Multiplex Immunoassay zu ermitteln.

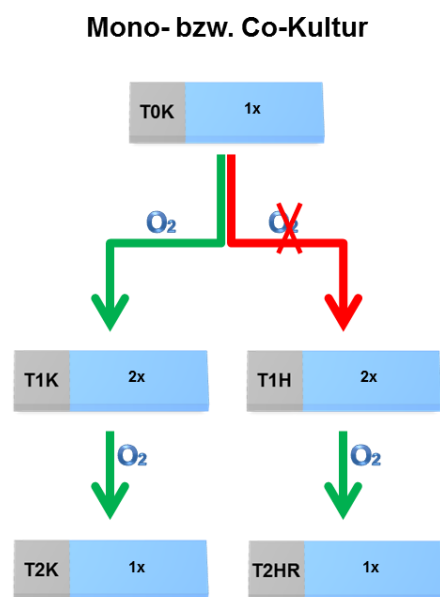


Abbildung 2:
Probenschema.

3.1.2 Fibroblasten aus Morbus Dupuytren

3.1.2.1 Patientenkollektiv

Alle Gewebeproben wurden Patienten mit einem klinisch gesicherten M. Dupuytren ab einem Tubiana-Stadium II° entnommen (n=8). Die Gewebeentnahme erfolgte bei allen Probanden mittels einer partiellen Fasziektomie (siehe Abb. 3). Nach der obligatorischen Hautdesinfektion und dem Anlegen einer Oberarmblutsperre wurde eine treppenförmige Hautinzision im Bereich der Fibrosierung vorgenommen. Anschließend erfolgte unter dem Einsatz einer Lupenbrille die Abpräparation des fibrotischen Gewebes. Eine Unterscheidung in Knoten und Stränge bei der Entnahme erfolgte nicht. Die Operationen wurden von Ärzten des Caritas-Krankenhauses Dillingen durchgeführt. Die Ethikvoten der Ethik-Kommision der Ärztekammer des Saarlandes und des Vorstandes der Cusanus Trägergesellschaft Trier mbH (ctt e.V.) liegen vor.

Das Geschlechterverhältnis (m:w) im Untersuchungskollektiv betrug 7:1. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs betrug 67 Jahre, wobei der jüngste Patient 54 und der älteste Patient 77 Jahre alt war. Die Erkrankungsdauer divergierte zwischen 1 Jahr und 20 Jahren. Bei 4 der 8 Probanden lag ein Alkoholabusus von mehr als 54 g Ethanol pro Tag vor. Auffallend viele Studienteilnehmer zeigten Nebenerkrankungen wie Adipositas (n=4), eine arterielle Hypertonie (n=4), eine Hypercholesterinämie (n=3) oder kardiale Erkrankungen (n=3). Nur 2 der 8 Probanden wiesen keine relevanten Nebenerkrankungen auf. Nur von einer Person wurden Angaben bzgl. eines Nikotinabusus gemacht (60 pack years). Die Beugekontraktur wies bei 5 Patienten einen schubförmigen Verlauf auf und zeigte sich bei 3 Patienten chronisch progredient. Die Lokalisationen der Beugekontrakturen befanden sich in den Segmenten der Mittel- bis Kleinfinger. Bei 5 Patienten trat der M. Dupuytren links auf, nur 2 Probanden wiesen eine Beugekontraktur rechts auf und nur eine Person einen beidseitigen Befall. Bei 3 Patienten war es nach einem vorangegangenen operativen Eingriff zu einem erneuten Auftreten der Beugekontraktur im Bereich anderer Segmente gekommen. Die Resektion des Untersuchungsmaterials erfolgte ausschließlich aus Bereichen ohne vorangegangenen operativen Eingriff.

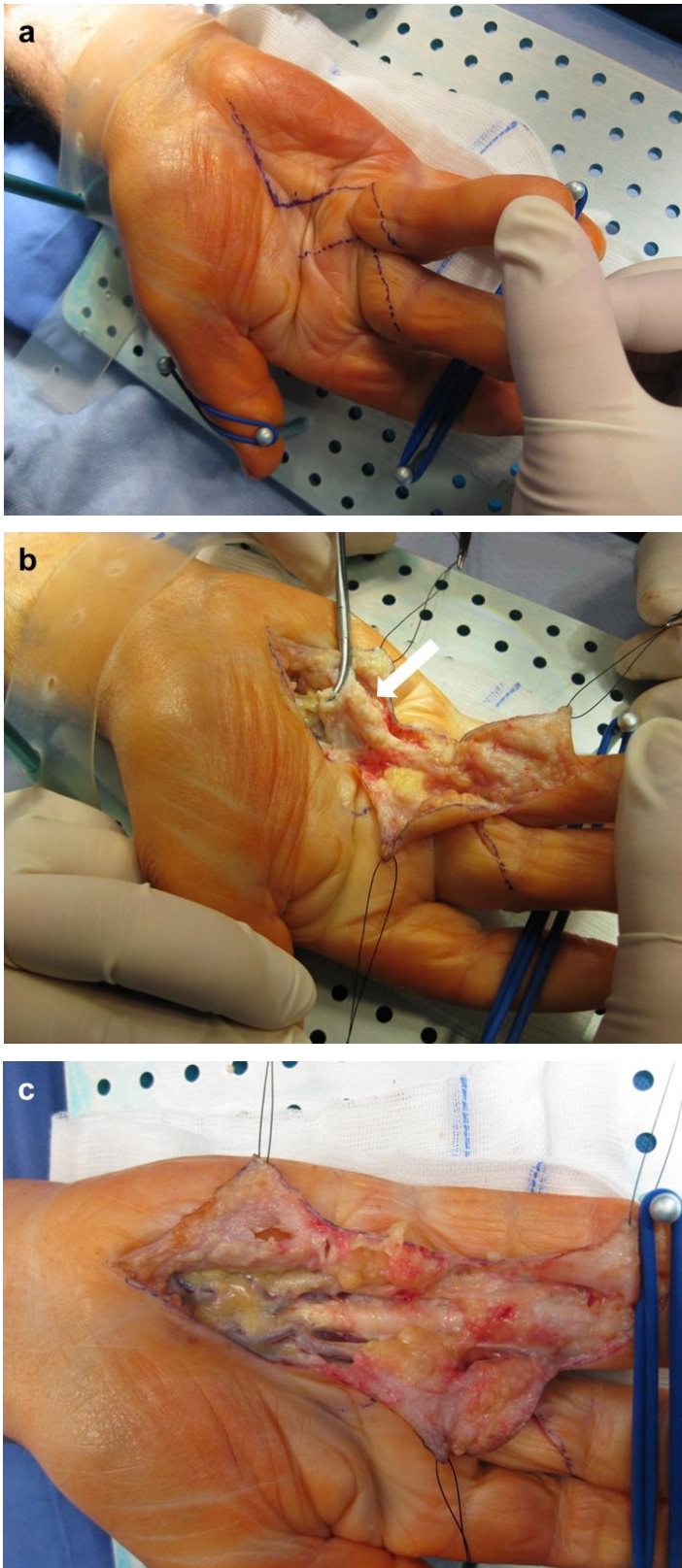


Abbildung 3:
Partielle Fasziektomie bei M. Dupuytren mit Befall des III. und IV. Strahles mit dem typischen fibrotischen Strang. (a) Einzeichnung der treppenförmigen Schnitfführung und Darstellung des OP-Gebiets vor (b) und nach (c) chirurgischer Entfernung des fibrotischen Strangs (Pfeil; mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Rolf-Dieter Mayer).

3.1.2.2 Probenaufbereitung

Nach der Probengewinnung erfolgte die Überführung in ein Aufbewahrungsgefäß mit Quantum 333-Medium (Q333-Medium). Da eine Zellexpansion sowie biochemische Untersuchungen im weiteren Versuchsablauf geplant waren, wurden alle Schritte unter möglichst keimarmen Bedingungen durchgeführt. Dazu zählten sowohl das Tragen von Einweg-Handschuhen, Hände- und Arbeitsflächendesinfektion als auch die Verwendung steriler Einmalartikel und das Abflammen mehrfach verwendeter Instrumentarien vor deren Gebrauch.

Es erfolgte die Herstellung einer Lösung von Kollagenase Typ II (100 IU/ml) und Q333-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin. Die Resektate wurden mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert und in eine T25-Kulturflasche unter Zugabe von 5 ml der Kollagenase-Lösung überführt. Der anschließende Kollagenaseverdau erfolgte über Nacht in einem Brutschrank bei Standardzellkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂, 97% Luftfeuchtigkeit). Durch wiederholtes Pipettieren wurden die Zellen aus ihrem Verbund gelöst und bei 1250 rpm für 3 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Mediumüberstands erfolgten eine Waschung mit Q333-Medium und eine erneute Zentrifugation. Abschließend wurde der Mediumüberstand abpipettiert und die Zellen in 2 ml Q333-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert und in Passage 0 (P0) in eine T25-Kulturflasche überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und die weitere Kultivierung ab diesem Zeitpunkt ohne Zugabe von Penicillin/Streptomycin.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden nach standardisierten Protokollen expandiert und in P4 kryokonserviert. Alle weiteren Zellexpansionen gingen aus der Kryokultur hervor. Vor dem Erreichen der vollständigen Konfluenz in P0 erfolgte das Absaugen des Mediums aus der T25-Kulturflasche, gefolgt von einer zweimaligen Spülung mit 5 ml Phosphate Buffered Saline (PBS). Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA und einer 3-minütigen Einwirkzeit in einem Brutschrank bei Standardzellkulturbedingungen. Die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 3 ml Q333-Medium neutralisiert. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 min bei 1250 rpm zentrifugiert. Der enzymhaltige Mediumüberstand wurde abpipettiert und die verbleibenden Zellen in 10 ml Q333-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine T75-Kulturflasche überführt. Die Unterkultivierungen erfolgten im weiteren Verlauf nach dem oben beschriebenen Prinzip, jedoch unter Verwendung von 10 ml PBS und 5 ml Trypsin-EDTA. Die Wirkung des Trypsins wurde dementsprechend mit 5 ml Q333-Medium neutralisiert. Die Zellexpansion erfolgte bis P3 unter Verwendung von 10 ml Q333-Medium je T75-Kulturflasche.

Nach Erreichen eines Konfluenzgrades von ca. 80% in P3 wurden die Zellen abtrypsinisiert und nach Zentrifugation in 1 ml Q333-Medium mit 5% DMSO resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Um eine zellschonende Kryokonservierung zu gewährleisten wurden die Kryoröhrchen in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierkammer (Mr. Frosty[®] Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene[®]) bei -80°C zwischengelagert. Diese Einfrierkammer gewährleistet ein kontinuierliches Abkühlen der Zellen um 1°C/min. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank (-196°C) überführt.

3.1.2.3 Zellexpansion

Zu Beginn der Zellexpansion für den Versuch wurden kryokonservierte DF (P4) in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. 1 ml Zellsuspension wurde in 8 ml Q333-Medium resuspendiert und die Zellen zu gleichen Anteilen auf 3 x T25-Kulturflaschen verteilt (siehe Tab. 2). Am Folgetag wurde der Mediumüberstand dekantiert und ein Mediumwechsel mit 5 ml Q333-Medium je Kulturflasche durchgeführt. Am 3. Tag erfolgte die Unterkultivierung auf 3 x T75-Kulturflaschen (P5) in jeweils 10 ml Q333-Medium. Am Tag 6 wurde ein Mediumwechsel mit 10 ml Q333-Medium durchgeführt. Am 9. Tag wurden die Zellen einer T75-Kulturflasche auf 2 x T75-Kulturflaschen unter Verwendung von jeweils 10 ml Q333-Medium in P6 unterkultiviert, wobei die Zellen der verbliebenen 2 Kulturflaschen für weitere Untersuchungen kryokonserviert wurden. Ein weiterer Mediumwechsel mit 10 ml Q333-Medium erfolgte am Tag 10. Nach erfolgreicher Zellexpansion und Überführung der DF einer T75-Kulturflasche auf 7 OT am Tag 14, begann am Tag 15 das Experiment wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben. Die DF der zweiten T75-Kulturflasche dienten dem Ansetzen der CK.

Tabelle 2: Standardisierte Expansion kryokonservierter Fibroblasten aus M. Dupuytren.

Tag	Fibroblasten aus M. Dupuytren
0	Ansetzen der Kryokultur in 3 x T25-Kulturflaschen (P4)
1	Mediumwechsel
3	Unterkultivierung auf 3 x T75-Kulturflaschen (P5)
6	Mediumwechsel
9	<ul style="list-style-type: none"> • Unterkultivierung einer T75-Kulturflasche auf 2 x T75-Kulturflaschen (P6) • Kryokonservierung von 2 x T75-Kulturflaschen (P6)
10	<ul style="list-style-type: none"> • Mediumwechsel • Überführung der Kryokulturen in den Stickstofftank
14	<ul style="list-style-type: none"> • Ansetzen der MK: Überführen der DF einer T75-Kulturflasche auf 7 OT • Ansetzen der CK: Verwendung u.a. der DF einer T75-Kulturflasche

3.1.3 Normale humane dermale Fibroblasten

3.1.3.1 Anlegen einer Master Cell Bank

Ausgehend von einer NHDF-Kultur der Firma Promocell wurde eine Master Cell Bank (MCB) angelegt. Die NHDF wurden nach Herstellerangaben ausgesät. Die Zellexpansion erfolgte bis P4 zur Anlage einer MCB. Die NHDF wurden in Q333-Medium mit 5% DMSO in P5 kryokonserviert. Unterkultivierung und Mediumwechsel mit Q333-Medium wurden nach Standardprotokoll durchgeführt.

3.1.3.2 Zellexpansion

Die Expansion der kryokonservierten NHDF (P5) erfolgte zeitlich parallel zur Expansion der DF, mit dem Unterschied, dass zu Beginn der Expansion die Zellen eines Kryoröhrchens in 5 ml Q333-Medium resuspendiert und gleichmäßig auf 2 x T25-Kulturflaschen übertragen wurde (siehe Tab. 3). Die weitere Zellexpansion erfolgte gemäß Punkt 3.1.2.3.

Tabelle 3: Standardisierte Expansion kryokonservierter NHDF.

Tag	NHDF
0	Ansetzen der Kryokultur in 2 x T25-Kulturflaschen (P5)
1	Mediumwechsel
3	Unterkultivierung auf 2 x T75-Kulturflaschen (P6)
6	Mediumwechsel
9	<ul style="list-style-type: none"> • Unterkultivierung einer T75-Kulturflasche auf 2 x T75-Kulturflaschen (P7) • Kryokonservierung einer T75-Kulturflasche (P7)
10	<ul style="list-style-type: none"> • Mediumwechsel • Überführung der Kryokulturen in den Stickstofftank
14	<ul style="list-style-type: none"> • Ansetzen der MK: Überführen der NHDF einer T75-Kulturflasche auf 7 OT • Ansetzen der CK: Verwendung u.a. der NHDF einer T75-Kulturflasche

3.1.4 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen

3.1.4.1 Anlegen einer Master Cell Bank

Ausgehend von einer HDMEC-Kultur der Firma Promocell wurde eine MCB angelegt. Die HDMEC wurden nach Herstellerangaben ausgesät. Das Endothelzell-Medium setzt sich aus 500 ml Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell GmbH) und 27,2 ml SupplementMix (PromoCell GmbH) zusammen. Die Zellexpansion erfolgte bis P5 zur Anlage einer MCB. Die HDMEC wurden in Endothelzell-Medium mit 5% DMSO in P6 kryokonserviert. Unterkultivierung und Mediumwechsel erfolgten mit Endothelzell-Medium nach Standardprotokoll.

3.1.4.2 Zellexpansion

Die Expansion der HDMEC erfolgte 6 Tage nach Beginn der Zellexpansion der DF bzw. NHDF. Dazu wurde eine Kryokultur von HDMEC (P6) bei 37°C in einem Wasserbad erwärmt. Die Zellsuspension aus dem Kryoröhrchen wurde in 5 ml Endothelzell-Medium resuspendiert und zu gleichen Anteilen auf 2 x T25-Kulturflaschen überführt (siehe Tab. 4). Nach 24 h schloss sich ein Mediumwechsel mit 5 ml Endothelzell-Medium an. An Tag 3 fand bei 80%-iger Konfluenz die Unterkultivierung auf jeweils 2 x T75-Kulturflaschen in P7 statt.

Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel mit 10 ml Endothelzell-Medium durchgeführt. Nach 8-tägiger Expansion wurden die HDMEC aus 2 x T75-Kulturflaschen auf 7 OT als MK überführt oder dienten dem Ansetzen der CK zusammen mit DF bzw. NHDF.

Tabelle 4: Standardisierte Expansion kryokonservierter HDMEC.

Tag	HDMEC
0	Ansetzen der Kryokultur in 2 x T25-Kulturflaschen (P6)
1	Mediumwechsel
3	Unterkultivierung auf 2 x T75-Kulturflaschen (P7)
4	Mediumwechsel
8	<ul style="list-style-type: none"> • Wahlweise Ansetzen der MK: Überführen der HDMEC aus 2 x T75-Kulturflaschen auf 7 OT • Wahlweise Ansetzen der CK: Überführen der HDMEC aus 2 x T75-Kulturflaschen zusammen mit DF oder NHDF einer T75-Kulturflasche auf 7 OT

3.2 Experimentelles Setup

3.2.1 Versuchsdurchführung

Um die Vergleichbarkeit der MK und der CK zu gewährleisten, erfolgte ab dem 14. Kultivierungstag die Verwendung eines einheitlichen CK-Mediums, bestehend aus Endothelzell-Medium und Q333-Medium im Verhältnis 3:1. Die Herstellung der MK aus DF bzw. NHDF erfolgte durch die Resuspendierung der Zellen einer T75-Kulturflasche in 35 ml CK-Medium. Je 5 ml der Zellsuspension wurden auf einen der 7 OT in QuadriPERM-Schalen überführt. Die CK setzten sich aus der verbliebenen zweiten T75-Kulturflasche mit DF (siehe 3.1.2.3) bzw. NHDF (siehe 3.1.3.2) sowie den HDMEC aus 2 x T75-Kulturflaschen (siehe 3.1.4.2) zusammen. Die Zellen wurden gemeinsam in 35 ml CK-Medium resuspendiert. Auch hier wurden die Zellen zu gleichen Teilen auf 7 OT überführt.

Während die Herstellung der MK von DF bzw. NHDF, sowie der entsprechenden CK parallel abliefen, wurden die MK von HDMEC separat angesetzt. Der Ablauf unterschied sich nicht von der oben dargestellten Vorgehensweise. Nach Abtrypsinierung und Zentrifugation der Zellen wurden die HDMEC aus 2 x T75-Kulturflaschen in 35 ml CK-Medium resuspendiert und auf 7 OT ausgesät.

24 h nach Ansetzen der Kulturen erfolgte an Tag 0 das „Wounding“. Hierzu wurde mittels einer 1000 µl-Pipettenspitze durch manuelles Entfernen der Zellen ein „Wundspalt“ produziert (Oberringer et al. 2007). Dazu wurde die Spitze der Pipette geradlinig über den Zellrasen geführt (siehe Abb. 4 und 5).

Zur Bestimmung der Ausgangsparameter an Tag 0 (T0K) erfolgte direkt im Anschluss an das „Wounding“ die Fixierung jeweils eines OT der entsprechenden Kulturen (MK von HDMEC: n=4; MK und CK von DF: n=8; MK und CK von NHDF: n=4; siehe Abb. 2). Im Anschluss wurden 3 OT jeder Kultur für 24 h hypoxisch begast. In der Hypoxiekammer bedingte ein gleichmäßiger Gasfluss von 1l/min (95% N₂, 5% CO₂) eine O₂-Sättigung ≤ 5 mmHg im Zellkulturmedium (Oberringer et al. 2005). Eine Überprüfung der verminderten O₂-Sättigung im Zellkulturmedium erfolgte mittels einer Lycox-Sonde (Lycox, GMS, Kiel-Mielkendorf, Deutschland; Purins et al. 2010). Parallel zu den Hypoxie-Präparaten wurden 3 Kontroll-Präparate unter Normoxie (O₂-Sättigung > 130 mmHg im Zellkulturmedium) in einem Brutschrank bei Standardzellkulturbedingungen inkubiert. An Tag 1 wurde jeweils ein OT der Hypoxie-Kultur (T1H) und Normoxie-Kultur (T1K) fixiert. Ein weiterer OT jeder Kultur wurde für 24 h unter Normoxie in einem Brutschrank inkubiert. Bei einem Teil der Experimente (MK von HDMEC: n=4; MK und CK von DF: n=3; MK und CK von NHDF: n=4) wurden die zusätzlichen OT-Kulturen von T1K und T1H zur Quantifizierung frühapoptotischer Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie verwendet. An Tag 2 wurden Parallelpräparate nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung (T2HR) zusammen mit den Kontrollpräparaten (T2K) fixiert.

Von den Kulturen wurde jeweils vor Fixierung der OT 2 x 1 ml des Zellkulturüberstands entnommen und bei -80°C gelagert. Mit einem ELISA wurde in den gewonnenen Zellkulturüberständen die Konzentration von PDGF AA analysiert (MK von HDMEC: n=4; MK und CK von DF: n=6; MK und CK von NHDF: n=4). Zusätzlich wurde der Zytokinrelease von DF in MK an T1K (n=8) in die Zellkulturüberstände mit einem Multiplex Immunoassay bestimmt. Tabelle 5 zeigt die chronologische Reihenfolge des Experiments.

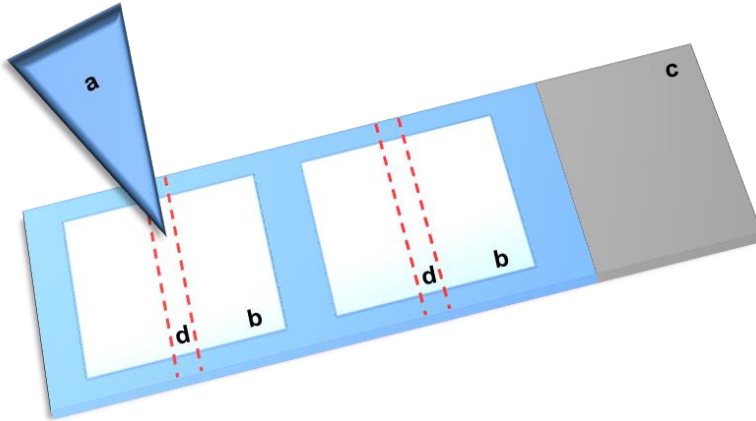


Abbildung 4:

Wounding mittels Pipettenspitze.

Durch das Führen einer 1000 μl -Pipettenspitze (a) über die späteren Färbefelder (b) des Glasobjektträgers (c) wird ein Wundspalt (d) im Zell-Monolayer erzeugt.

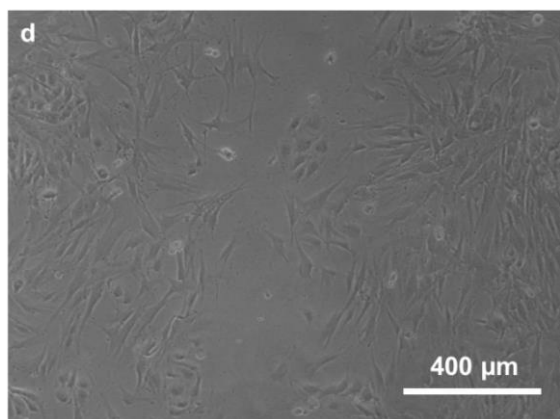
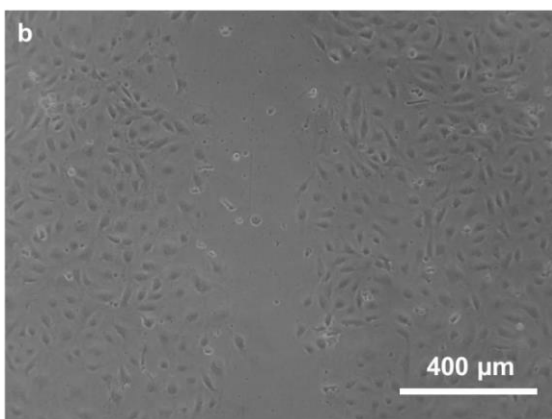
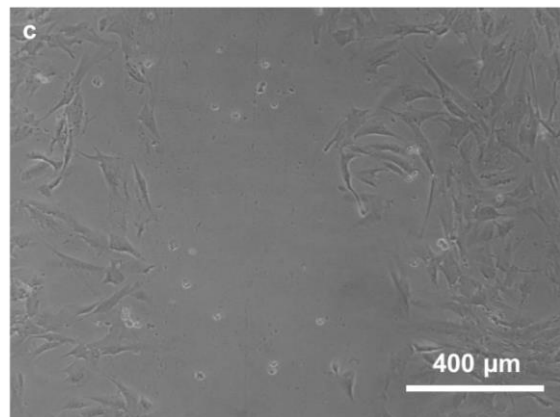
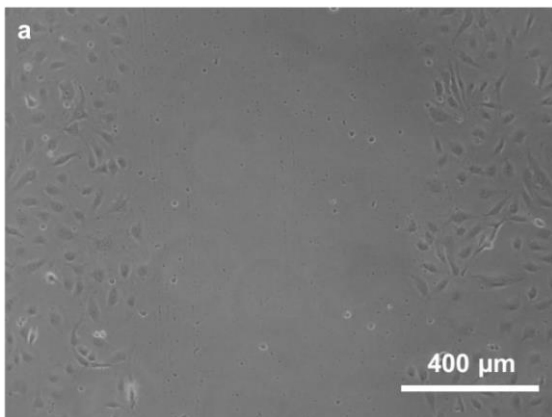


Abbildung 5:

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von HDMEC in MK 24 h (a) und 48 h (b) nach Erzeugung des Wundspalts sowie von Fibroblasten aus M. Dupuytren in MK 24 h (c) und 48 h (d) nach Erzeugung des Wundspalts.

Tabelle 5: Experimentelles Setup.

Tag 0	<ul style="list-style-type: none"> • Wounding • Entnahme des Mediumüberstands (2 x 1 ml) • Fixierung der T0K-Präparate
Tag 1	<ul style="list-style-type: none"> • Entnahme des Mediumüberstands (2 x 1 ml) • Quantifizierung der Rate frühapoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Hypoxie und Normoxie • Fixierung von jeweils einem T1K- und T1H-Präparat
Tag 2	<ul style="list-style-type: none"> • Entnahme des Mediumüberstands (2 x 1 ml) • Fixierung von jeweils einem T2K- und T2HR-Präparat

3.2.2 Hypoxie

Die Hypoxie-Kulturen (T1H) und die Hypoxie-Kulturen mit anschließender Reoxygenierung (T2HR) befanden sich für 24 h unter dem Einfluss der Hypoxie. Dazu wurden die OT in eine Kunststoff-Kammer eingestellt, die sich in einem Wärmeschrank befand (siehe Abb. 6 und 7). Dieser Versuchsaufbau gewährleistete eine Temperatur von 37°C und einen Sauerstoffpartialdruck im Zellkulturmedium von ≤ 5 mmHg.

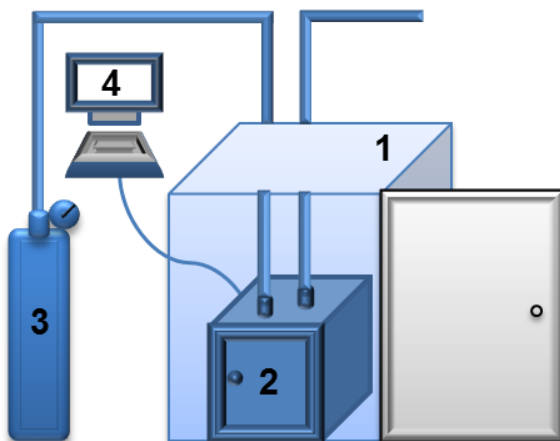


Abbildung 6:

Schematischer Aufbau des Hypoxie-Setups.

1 Wärmeschrank, 2 Hypoxiekammer, 3 N₂/CO₂-Zufuhr,
4 Messung der Sauerstoffsättigung (Lycocx-Sonde).

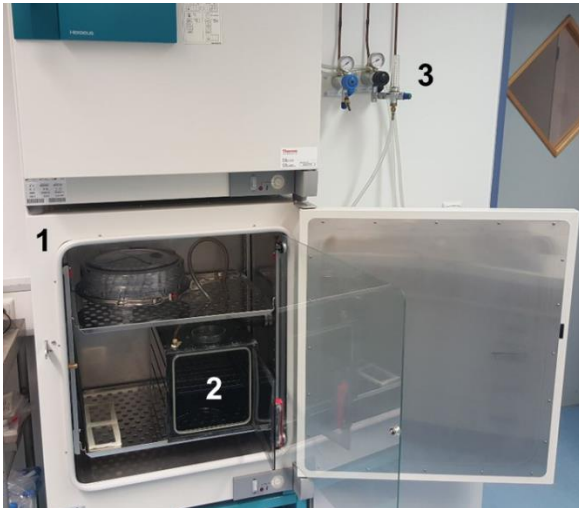


Abbildung 7:

Hypoxie-Setup.

1 Wärmeschrank, 2 Hypoxiekammer, 3 N₂/CO₂-Zufuhr.

3.2.3 Fixierung der Zellen

Nach Abpipettieren des Zellkulturüberstands erfolgte eine 2-malige Waschung mit 5 ml PBS. Die OT wurden anschließend für 5 min in eine Kaliumchloridlösung (0,05 mol/l) eingestellt und in einem Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Die hypotone Kaliumchloridlösung führt zu einer Zellquellung. Dies ermöglicht eine optimale Aufnahme der Antikörper bei der nachfolgenden immunzytochemischen Färbung.

Als nächster Schritt folgte die eigentliche Fixierung. Dazu wurden die OT für 10 min bei -20°C in Methanol eingestellt. Zuletzt erfolgte das Eindecken der OT mit einem Gemisch aus Glycerol und PBS (9+1) und die Lagerung bei -20°C.

Abbildung 8 zeigt Bilder der Zellkulturen vor Fixierung an Tag 1 des Experiments. Im Gegensatz zu den MK der DF und NHDF zeigen die CK zusätzlich HDMEC, die in Clustern vorliegen.

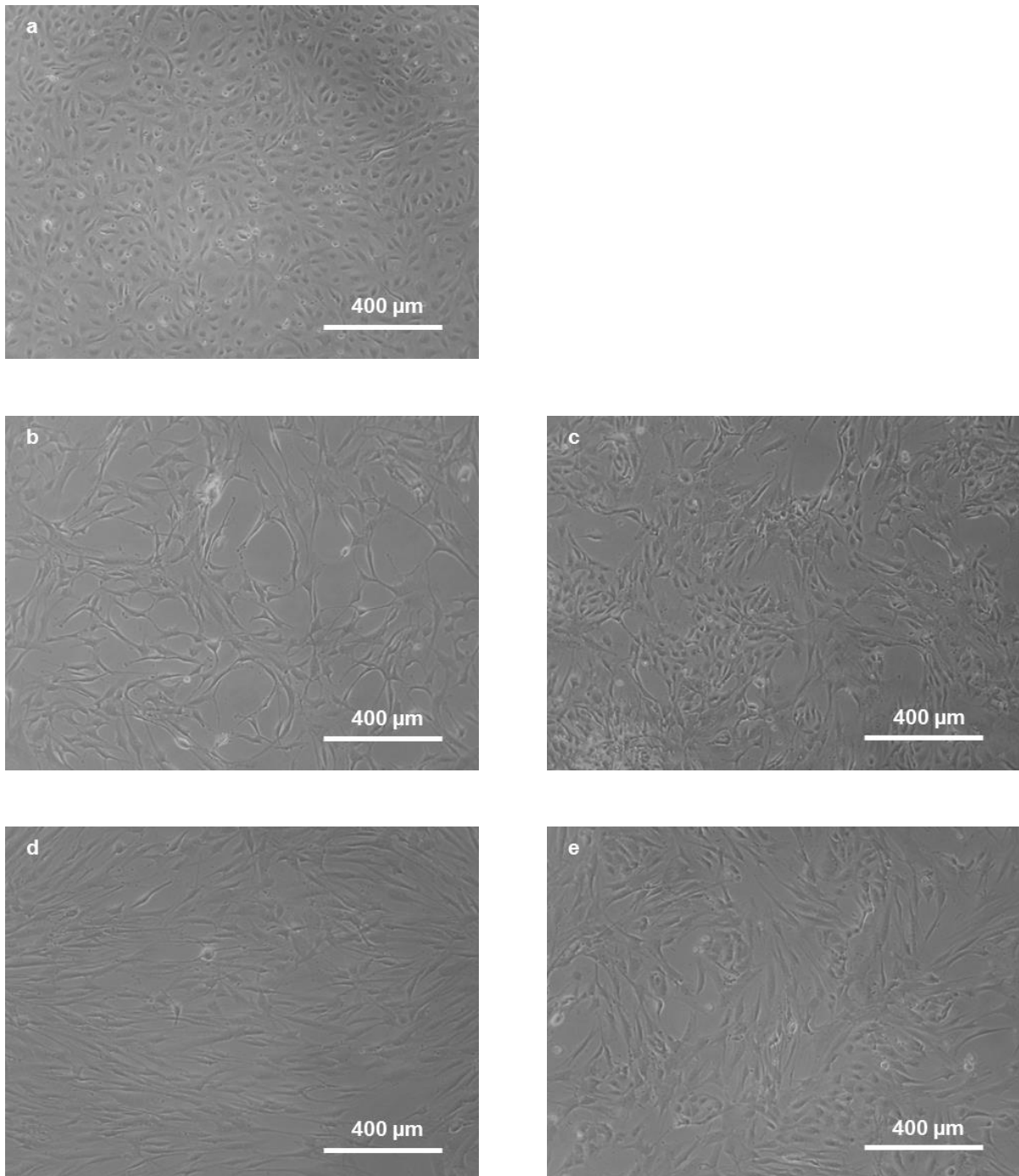


Abbildung 8:
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen an Tag 1 von HDMEC in MK (a), Fibroblasten aus M. Dupuytren in MK (b) und CK mit HDMEC (c) sowie NHDF in MK (d) und CK mit HDMEC (e).

3.3 Immunzytochemie

3.3.1 Grundlagen der Immunzytochemie

Zweck der indirekten immunzytochemischen Färbung ist die Detektion und Visualisierung eines Antigens. Die Detektion des Antigens erfolgt mittels eines spezifischen Primärantikörpers, an den wiederum ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper bindet. Im ersten Schritt dieser sog. Sandwich-Technik werden Zellen mit den Primärantikörpern, die in dieser Studie aus der Maus bzw. aus dem Kaninchen stammen, inkubiert. Antikörper, die keinen Immunkomplex mit dem dazugehörigen Antigen bilden, werden in einem folgenden Waschprozess entfernt. Im zweiten Schritt wird der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper hinzugefügt, der aus einer weiteren Tierspezies (Ziege) stammt. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, so dass der Immunkomplex aus Antigen und den gebundenen Primär- und Sekundärantikörpern unter einem Fluoreszenzmikroskop detektierbar ist (Hof & Dörries 2005).

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein spezifischer Marker von Endothelzellen (Piper 1990). Zur Markierung der HDMEC diente der aus Kaninchen stammende anti-human-vWF-Antikörper. Zur Visualisierung des Primärantikörpers eignet sich der Indocarbocyanin konjugierte Sekundärantikörper goat-anti-rabbit-Cy3TM (GaR-Cy3TM), dessen Emissionsmaximum im Wellenlängenbereich von 570 nm liegt und somit rot fluoresziert (El-Shishtawy et al. 2013). Dieser Sekundärantikörper bindet spezifisch aus Kaninchen stammende Immunglobuline und dient in dieser Arbeit der Visualisierung von HDMEC.

Zur immunzytochemischen Färbung der MF diente ein gegen α -SMA gerichteter Primärantikörper aus der Maus. Die Detektion dieses Primärantikörpers erfolgte mit dem Sekundärantikörper goat-anti-mouse-Fluorescein-Isothiocyanat (GaM-FITC), der mit einem Emissionsmaximum von 520 nm grün fluoresziert (Shinoguchi et al. 1991).

Zur Markierung proliferierender Zellen wurde der aus der Maus gewonnene Antikörper Ki-67/MIB-1 verwendet (Gerdes et al. 1984). Die Visualisierung erfolgte wie bei α -SMA ebenfalls mit dem Sekundärantikörper GaM-FITC.

Abschließend wurden alle Zellkerne durch das Eindecken der Präparate mit Eindeckmedium mit 4',6'-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) blau gegengefärbt. DAPI interkaliert in die DNA und besitzt ein Emissionsmaximum von 461 nm (Atale et al. 2014).

3.3.2 Färbeprotokoll

Sämtliche Färbeschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Fünf OT eines Versuchs wurden zusammen gefärbt. Nach vorsichtiger Entfernung der Deckgläser von den OT wurden diese in eine Färbeküvette eingestellt. Die OT wurden dreimal für jeweils 5 min in PBS/0,5% Tween 20 (PBST) gewaschen. Die OT wurden in 2 Färbefelder „A“ und „B“ unterteilt (siehe Abb. 9). Die Antikörper wurden nach einer Verdünnung in 0,1% Rinderserumalbumin (BSA)/PBS primär auf Deckgläser pipettiert und diese anschließend auf die jeweiligen OT aufgebracht.

Da die HDMEC auf den Färbefeldern „A“ und „B“ detektiert werden sollten, erfolgte zunächst noch keine Unterscheidung der beiden Färbefelder. Gleichmäßig wurden jeweils 75 µl des vWF-Antikörpers (rabbit-anti-human, 1:500 in 0,1% BSA/PBS) auf 5 Deckgläser (24 x 50 mm) pipettiert und die OT eingedeckt. Die Inkubationszeit betrug 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer. Die nicht gebundenen Antikörper wurden in einem 3 x 5-minütigen Waschschrift mit PBST entfernt. Nun wurden jeweils 75 µl des Sekundärantikörpers GaR-Cy3™ (goat-anti-rabbit, 1:200 in 0,1% BSA/PBS) auf 5 Deckgläser (24 x 50 mm) aufgebracht und die OT eingedeckt. Die OT wurden erneut für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Es folgte ein 3 x 5-minütiger Waschschrift in einer Färbeküvette mit PBST.

Zur Visualisierung der MF auf Färbefeld „A“ wurden jeweils 15 µl des Primärantikörpers gegen α -SMA (mouse-anti-human, 1:800 in 0,1% BSA/PBS) auf 5 Deckgläser (18 x 18 mm) aufgebracht. Parallel wurden jeweils 15 µl des Antikörpers gegen Ki-67/MIB-1 (mouse-anti-human, 1:100 in 0,1% BSA/PBS) auf 5 weitere Deckgläser (18 x 18 mm) für Färbefeld „B“ pipettiert. Nach Aufbringen der Deckgläser auf die OT folgten eine 30-minütige Inkubation und eine weitere Waschung (3 x 5 min) in PBST. Da beide letztgenannten Primärantikörper aus Mäusen stammen, war es möglich, jeweils 75 µl des Sekundärantikörpers GaM-FITC (goat-anti-mouse, 1:100 in 0,1% BSA/PBS) auf ein Deckglas (24 x 50 mm) für beide Färbefelder der OT zu pipettieren. Es schlossen sich eine 45-minütige Inkubation und die nachfolgende Waschung (3 x 5 min) in PBST an.

Die Fixierung der OT erfolgte für 5 min in PBS/4% Paraformaldehyd auf einem Schüttler. Anschließend folgte eine Waschung für 5 min in PBS. Im nächsten Schritt wurde den Präparaten mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe das Wasser entzogen. Nacheinander wurden die OT für jeweils 4 min in einer Küvette mit 70%-, 80%- und zuletzt 90%-igem Ethanol eingestellt und trockneten danach bei Raumtemperatur. Zum Schluss erfolgte die Kern-Gegenfärbung mit DAPI-haltigem Eindeckmedium (Vector Laboratories).

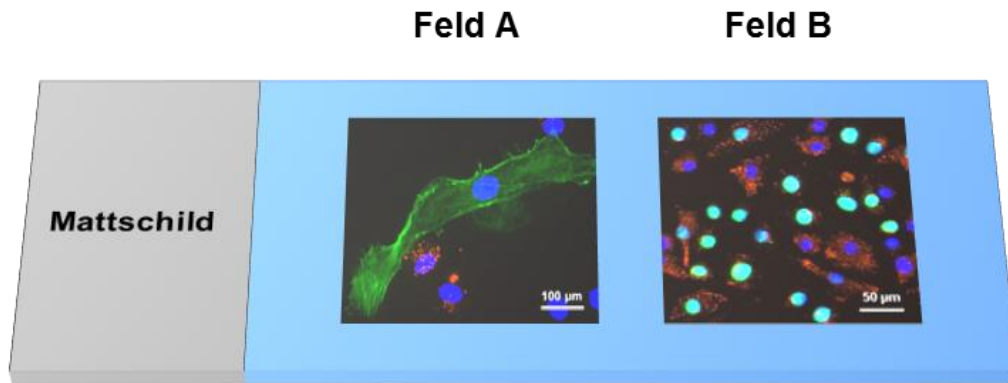


Abbildung 9:

Schematische Darstellung eines Objektträgers nach immunzytochemischer Färbung.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen Fibroblasten aus M. Dupuytren in CK mit HDMEC. Immunfärbung der HDMEC (rot) mit dem Primärantikörper vWF und dem Sekundärantikörper GaR-Cy3TM im Feld „A“ und „B“. Immunfärbung eines MF (grün) mit dem Primärantikörper α -SMA und dem Sekundärantikörper GaM-FITC im Feld „A“. Immunfärbung der Kerne proliferierender Zellen (grün) mit dem Primärantikörper Ki-67/MIB-1 und dem Sekundärantikörper GaM-FITC im Feld „B“. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

3.3.3 Antikörper

3.3.3.1 Alpha-Smooth-Muscle-Actin

Das α -SMA ist eines von 6 Aktinisoformen und ist ein essentieller Bestandteil des kontraktiven Apparats der MF. Da α -SMA nur bei MF zu finden ist und sowohl Fibroblasten als auch Proto-MF kein α -SMA aufweisen eignet es sich zur Unterscheidung von MF und Fibroblasten (Serini & Gabbiani 1999; Tomasek et al. 2002; siehe Abb. 10). α -SMA diente zur Beurteilung der MF-Differenzierungsrate (MFDR) in MK und CK. Die MFDR ist definiert als der prozentuale Anteil der MF an der Gesamt-Fibroblastenpopulation.

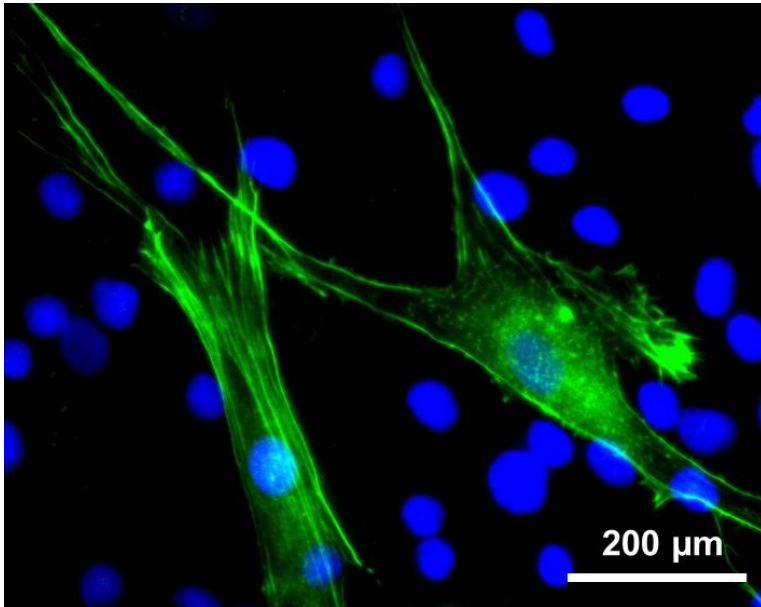


Abbildung 10:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Fibroblasten aus M. Dupuytren in MK an Tag 1. Immunfärbung der MF (grün) mit dem Primärantikörper α -SMA und dem Sekundärantikörper GaM-FITC. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

3.3.3.2 Von-Willebrand-Faktor

Der vWF ist ein oligomeres Glykoprotein, das von Endothelzellen und Megakaryozyten produziert wird (Jaffe et al. 1973; Sehested & Hou-Jensen 1981; Wagner 1990). Die Speicherung erfolgt in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen, sowie in den α -Granula der Thrombozyten (Cramer et al. 1985; Zupančič et al. 2002).

Die Funktion besteht in der Induktion der primären Hämostase, indem der vWF eine Interaktion zwischen der subendothelial gelegenen Matrix nach Verletzung der Gefäßwand und den Thrombozyten herstellt, an die er über das Glykoprotein Ib bindet (Rand et al. 1982; Schmidt et al. 2005). Der vWF fungiert als spezifischer Marker von Endothelzellen (Piper 1990; Dorovini-Zis & Huynh 1992; Ogawa et al. 1995). Der verwendete vWF-Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen und bindet an Endothelzellen (siehe Abb. 11). Der vWF-Antikörper ermöglicht die Unterscheidung zwischen HDMEC und Fibroblasten bzw. MF (Jaffe et al. 1973) nach Co-Kultivierung, was die Quantifizierung der HDMEC in CK erlaubt.

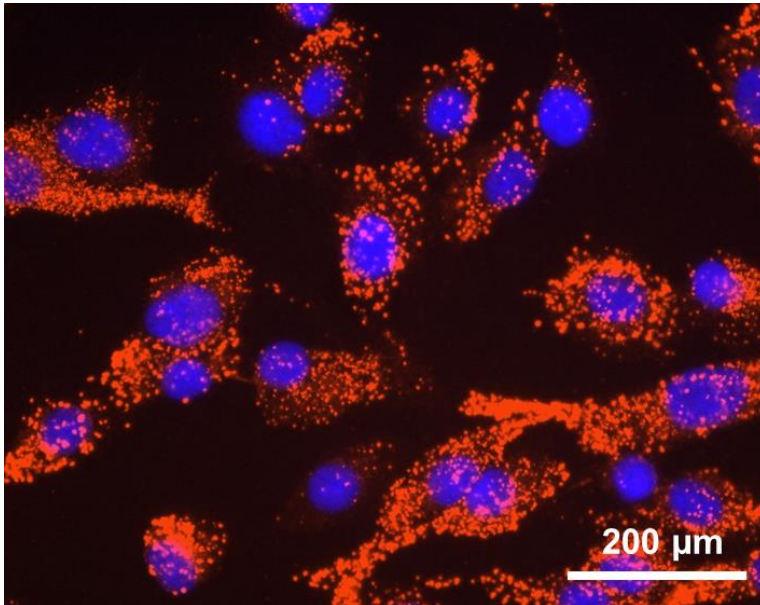


Abbildung 11:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HDMEC in MK an Tag 1. Immunfärbung der HDMEC (rot) mit dem Primärantikörper vWF und dem Sekundärantikörper GaR-Cy3TM. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

3.3.3.3 Ki-67/MIB-1

Der Ki-67/MIB-1-Antikörper bindet spezifisch an das Antigen Ki-67. Dieses stellt ein nukleäres Protein dar, welches als Marker der Zellproliferation gilt, da es von den Zellen während der G1-, S-, G2- und M-Phase, nicht jedoch in der G0-Phase exprimiert wird (Gerdes et al. 1984; Verheijen et al. 1989; Gerdes et al. 1991). Die Lokalisation des Antigens Ki-67 variiert in Abhängigkeit des Zellzyklus. So befindet sich Ki-67 in der Interphase (G1, S und G2) im Nukleus, während es sich in der Mitose der Oberfläche der Chromosomen anlagert (Scholzen & Gerdes 2000). Ki-67/MIB-1 findet in der Medizin Anwendung als Proliferationsmarker bei malignen Erkrankungen wie Prostata- und Mamma-Karzinom (Scholzen & Gerdes 2000) und dient in dieser Arbeit der Quantifizierung der Proliferationsrate (siehe Abb. 12). Die Proliferationsrate ist der prozentuale Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven Zellen, bezogen auf alle Zellen des jeweiligen Zelltyps.

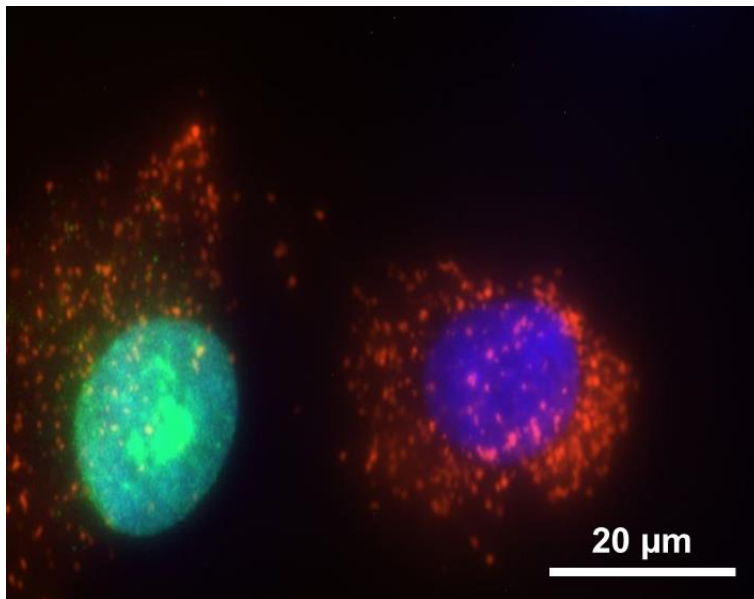


Abbildung 12:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Endothelzellen in MK an Tag 2. Immunfärbung der HDMEC (rot) mit dem Primärantikörper vWF und dem Sekundärantikörper GaR-Cy3™. Immunfärbung des Kerns einer proliferierenden Endothelzelle (grün) mit dem Primärantikörper Ki-67/MIB-1 und dem Sekundärantikörper GaM-FITC. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

3.3.4 Kern-Gegenfärbung

DAPI ist ein Fluorochrom und interkaliert in die DNA und RNA. Das Emissionsmaximum des in die Adenin-Thymin reiche kleine Kurvatur der DNA gebundenen Fluorochroms unterscheidet sich jedoch mit 461 nm von dem Emissionsmaximum des RNA gebundenen Fluorochroms mit 500 nm (Kapuscinski 1990; Tanious et al. 1992; Krishan & Dandekar 2005; Banerjee & Pal 2008). Mit dem geeigneten Filtersystem präsentiert sich DAPI als spezifischer Marker der DNA und somit der Zellkerne (siehe Abb. 10-12). DAPI ermöglicht die Erfassung aller Zellkerne und dadurch eine Berechnung der Zelldichte auf einem OT.

Anhand der morphologischen Charakteristika des Kernzerfalls und Ausbildung von Mikronuklei kann unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Unterscheidung apoptotischer und vitaler Zellen erfolgen (Kerr et al. 1972; Bühling et al. 2004; Ganten & Ruckpaul 2008; siehe 3.4.7).

3.4 Mikroskopische Auswertung

3.4.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Axioskop 2 plus der Firma Zeiss (Göttingen, Deutschland). Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampf-höchstdrucklampe. Diese emittiert Licht im Wellenlängenbereich von 260 nm bis 800 nm. Das Licht trifft zunächst auf einen Anregungsfilter. Dieser lässt Licht mit einer spezifischen Wellenlänge passieren; dieses ist zur Anregung eines bestimmten Fluoreszenzfarbstoffs geeignet. Anschließend trifft der Lichtstrahl auf einen dichroitischen Spiegel, durch den das Anregungslicht in Richtung des Präparats gelenkt wird. Der Fluoreszenzfarbstoff der Probe wird durch das kurzwelligere Licht angeregt und längerwelliges Fluoreszenzlicht wird emittiert. Dieses energieärmere Licht kann im Gegensatz zum kurzwelligeren Anregungslicht nun den dichroitischen Spiegel passieren. Nachgeschaltete Emissionsfilter komplettieren das System. Ein sog. Filterwürfel setzt sich daher aus den Komponenten Anregungsfilter, dichroitischer Spiegel und Emissionsfilter zusammen und ist für die jeweiligen Farbstoffe spezifisch zusammengesetzt. Mit einer zusätzlich angebrachten Kamera (AxioCam, Zeiss) können Bilder aufgenommen werden. Die Aufnahmen können mit der zugehörigen Anwendersoftware (AxioVision 4.2, Zeiss) digital verarbeitet werden (siehe Abb. 13). Abbildung 14 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HDMEC in MK, Fibroblasten aus M. Dupuytren in MK und Fibroblasten aus M. Dupuytren in CK mit HDMEC an den Versuchstagen 0, 1 und 2.

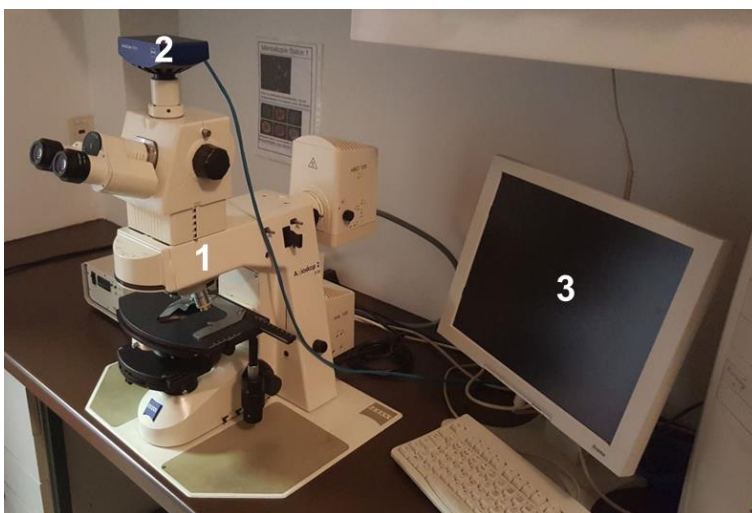


Abbildung 13:
Aufrechtes Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus der Firma Zeiss (1) mit Kamera (2) und Computerperipherie (3).

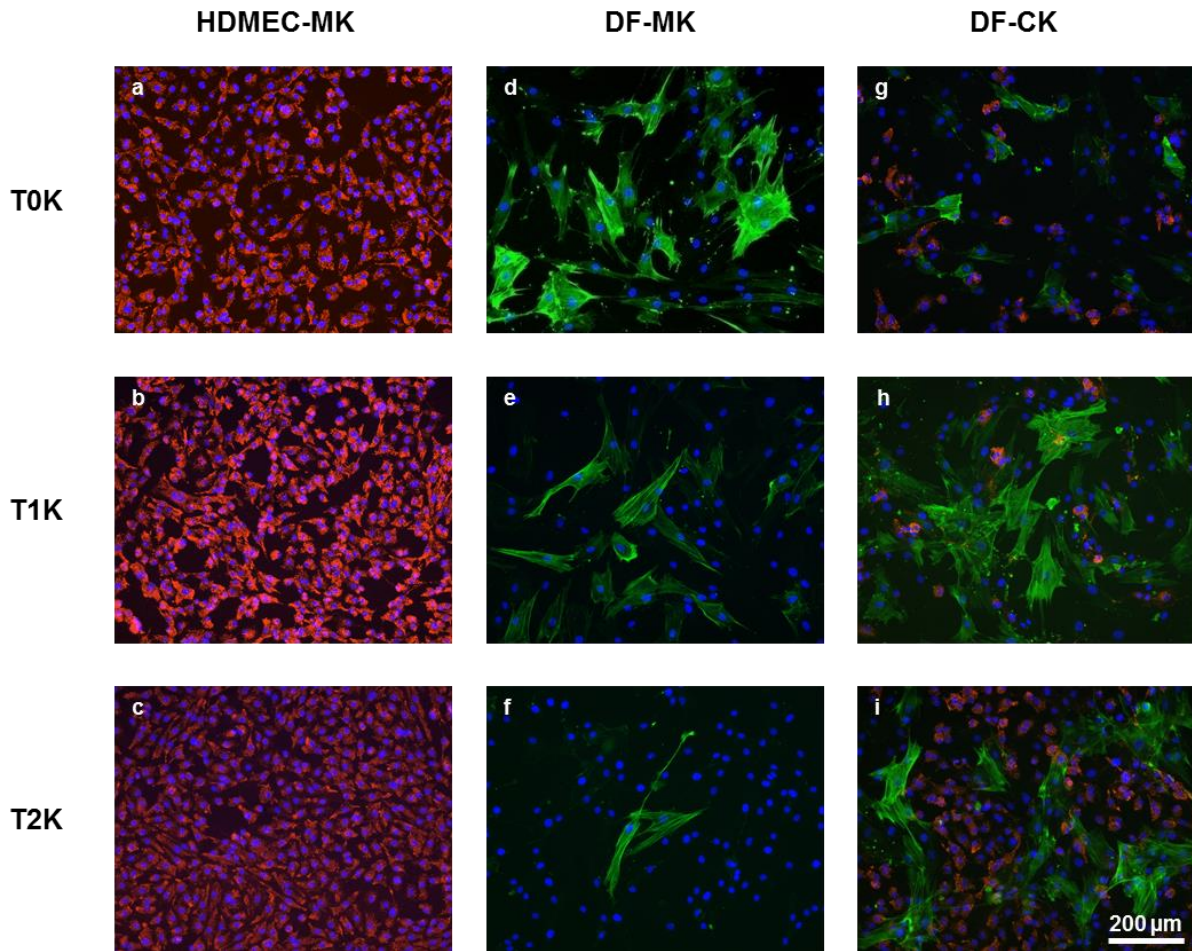


Abbildung 14:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HDMEC in MK (a-c), Fibroblasten aus M. Dupuytren in MK (d-f) und Fibroblasten aus M. Dupuytren in CK mit HDMEC (g-i) an den Versuchstagen 0, 1 und 2. Immunfärbung der HDMEC (rot) mit dem Primärantikörper vWF und dem Sekundärantikörper GaR-Cy3TM. Immunfärbung der MF (grün) mit dem Primärantikörper α -SMA und dem Sekundärantikörper GaM-FITC. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

3.4.2 Grundprinzipien der mikroskopischen Auswertung

Die Auswertung erfolgte nach einem standardisierten Schema. Jeder OT wurde in die Färbefelder „A“ und „B“ unterteilt (siehe Abb. 9 und 15). Die Auswertung der beiden Felder erfolgte bei 400-facher Vergrößerung in jeweils mind. 20 Gesichtsfeldern (GF) entlang 4 definierter Kolumnen, fern des Wundspalts. Jede dieser Kolumnen setzte sich aus mind. 5 aufeinanderfolgenden GF zusammen. Die Auszählung von mind. 800 Zellen war die Grundlage zur Bestimmung der Parameter Zelldichte, prozentualer Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven Zellen, MFDR und Apoptoserate.

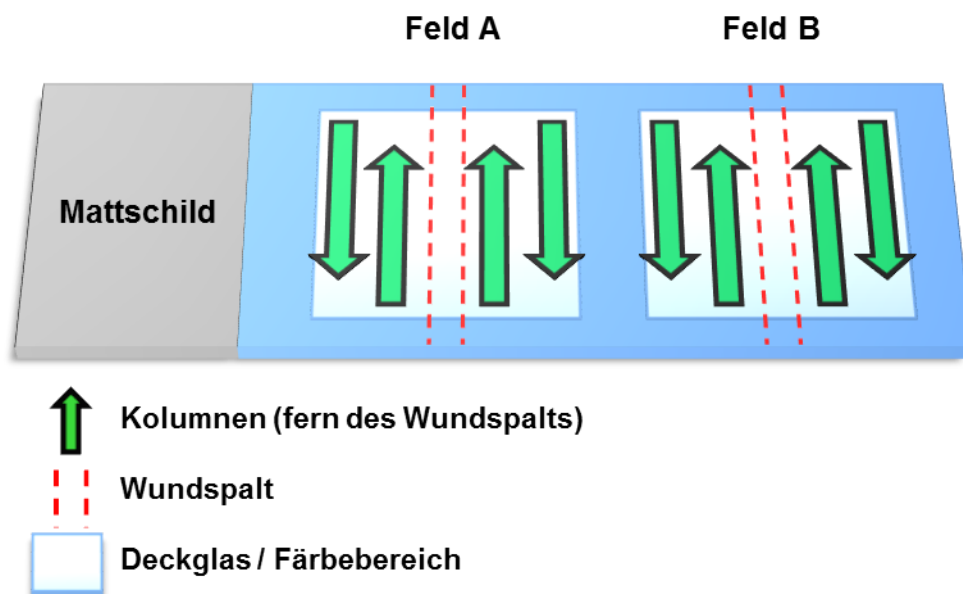


Abbildung 15:
Schematische Darstellung der mikroskopischen Auswertung.

3.4.3 Migration

Zellmigration bezeichnet die Ortsveränderung bzw. das Wandern von Zellen. Als Maß für die Migration wurde die Veränderung der Spaltbreite genutzt. Bei 100-facher Vergrößerung wurde der Wundspalt im Färbefeld „B“ über seine gesamte Länge fotografisch dokumentiert und mittels der Anwendersoftware AxioVision 4.2 ausgewertet. Über die Länge des Spalts wurde nach Dokumentation von insgesamt 9 Bildern standardisiert an der 300 µm-Linie der seitlichen Skalierung im Bild mit Hilfe der Anwendersoftware der weiteste Kernabstand gemessen (siehe Abb. 16). Aus den 9 separaten Messergebnissen wurde anschließend der Mittelwert errechnet.

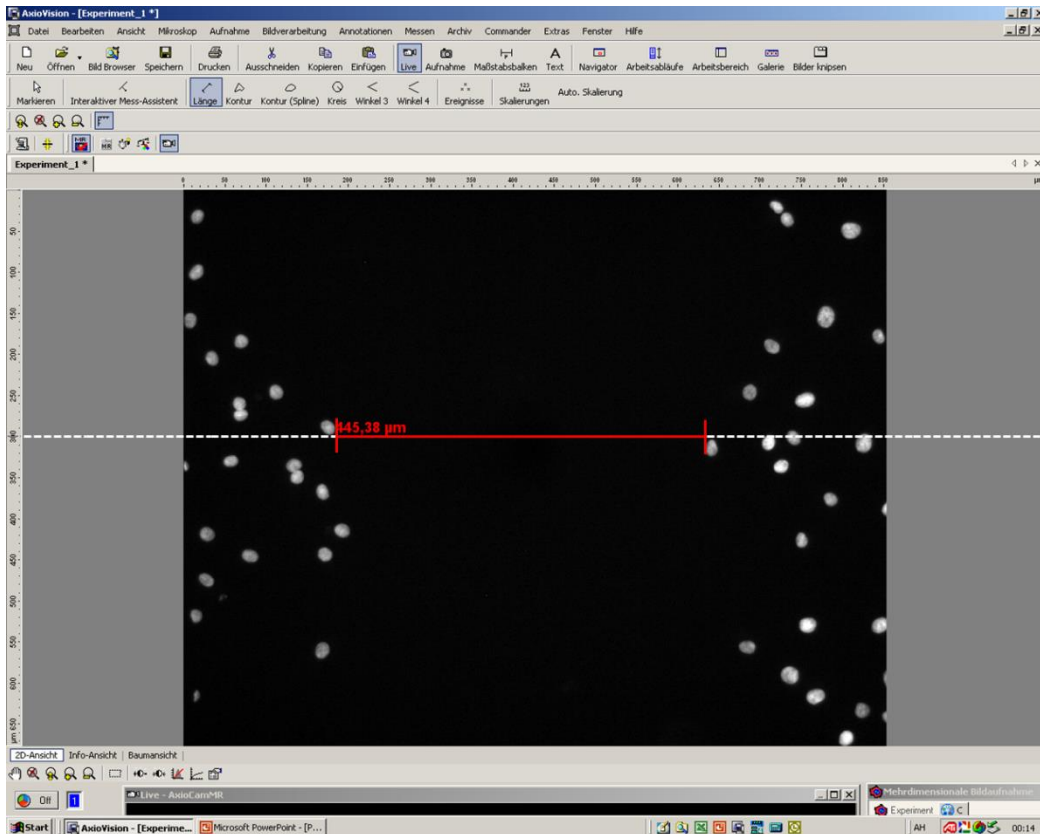


Abbildung 16:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Fibroblasten aus M. Dupuytren in MK an Tag 1 mit Abbildung des Wundspalts zur Vermessung entlang der 300 µm-Skalierung (rot) mit Hilfe der Anwendersoftware AxioVision 4.2. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

3.4.4 Proliferation: Zelldichte

Bei 400-facher Vergrößerung wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) ermittelt, indem sämtliche Zellkerne in 20 GF in 4 Spalten aufaddiert wurden (siehe Abb. 15). Dazu wurden jeweils 10 GF auf dem Färbefeld „A“ und „B“ ausgewertet. Da die ausgewertete Fläche bekannt ist, kann aus diesen Daten die GZZ pro mm² Fläche und somit die Zelldichte ermittelt werden. Die Zelldichte diente der Quantifizierung der Proliferationsrate an den unterschiedlichen Versuchstagen. Ebenso kann berechnet werden, wie viele Zellen auf dem gesamten OT vorhanden sind. Dieser Wert ist für die Berechnung der Menge an ausgeschüttetem PDGF AA pro Zelle notwendig.

3.4.5 Proliferation: Ki-67/MIB-1

Die Auswertung der Proliferation erfolgte bei 400-facher Vergrößerung auf dem Färbefeld „B“. In 4 Kolonnen wurden dazu mind. 800 Zellen ausgewertet (siehe Abb. 15). Die Anzahl der Ki-67/MIB-1-positiven Zellen innerhalb der HDMEC- bzw. Fibroblastenpopulation wurde ermittelt und in ein prozentuales Verhältnis zu allen detektierten Zellen dieses Zelltyps gesetzt (siehe Abb. 17).

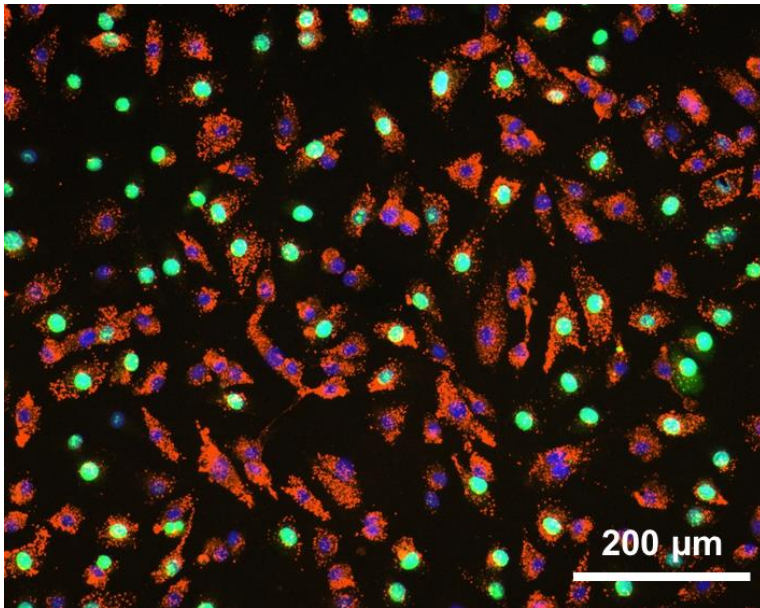


Abbildung 17:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HDMEC in MK an Tag 1. Immunfärbung der HDMEC (rot) mit dem Primärantikörper vWF und dem Sekundärantikörper GaR-Cy3™. Immunfärbung der Kerne proliferierender Zellen (grün) mit dem Primärantikörper Ki-67/MIB-1 und dem Sekundärantikörper GaM-FITC. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

3.4.6 Myofibroblasten-Differenzierungsrate

Bei 400-facher Vergrößerung wurden die MFDR in den 4 Kolonnen des Färbefeldes „A“ ermittelt. In jeder der Kolonnen (siehe Abb. 15) wurden mind. 200 Zellen ausgezählt und den jeweiligen Zelltypen zugeordnet; pro Färbefeld wurden somit mind. 800 Zellen erfasst.

In CK wurden die vWF-positiven Zellen als Endothelzellen und die vWF-negativen Zellen als Fibroblasten definiert. Die Population der Fibroblasten setzt sich aus den α -SMA-positiven MF und den α -SMA-negativen „Nicht-Myo-“ Fibroblasten zusammen. Die MFDR ist definiert als der prozentuale Anteil der MF an der Gesamtpopulation der Fibroblasten in den MK und CK von DF bzw. NHDF.

3.4.7 Apoptose

Die Apoptose ist definiert als ein physiologisch programmierter Zelltod (Bühling et al. 2004). Der programmierte Zelltod kann durch äußere Einflüsse induziert werden oder durch Prozesse im Zellinneren bedingt sein (Böhm & Schild 2003). Apoptose und Mitose dienen der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts in einer Zellpopulation (Kerr et al. 1972). Die Apoptose gewährleistet die Beseitigung geschädigter oder überschüssiger Zellen und trägt somit zur Regeneration des Gewebes bei (Bursch et al. 1992; Ben-Sasson et al. 1995).

Im Rahmen des programmierten Zelltods weisen Zellen spezifische morphologische Kriterien auf, dazu zählen der Verlust der Integrität der Zellmembran, die Kondensation des Zytoplasmas, sowie die Pyknose und der Zerfall des Zellkerns mit der Ausbildung von Mikronuklei (Kerr et al. 1972; Bühling et al. 2004; Ganten & Ruckpaul 2008).

Die Apoptose wurde in dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen Methoden nachgewiesen. Durch den Einsatz des Fluorochroms DAPI kann der Kernzerfall sichtbar gemacht werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde anhand des Kernzerfalls und der Ausbildung von Mikronuklei die Apoptose quantifiziert (siehe Abb. 18). Eine Zelle wurde als apoptotisch angesehen, wenn mind. drei Kerne vorhanden waren. Hierzu wurden auf dem Färbefeld „B“ mind. 800 Zellen bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Das prozentuale Verhältnis von apoptotischen Zellen zur GZZ des jeweiligen Zelltyps ergibt die Apoptoserate.

Die Durchflusszytometrie stellt eine weitere sensitive Möglichkeit der Detektion apoptotischer Zellen dar und erlaubt die Identifikation der frühen Phase der Apoptose (siehe 3.5).

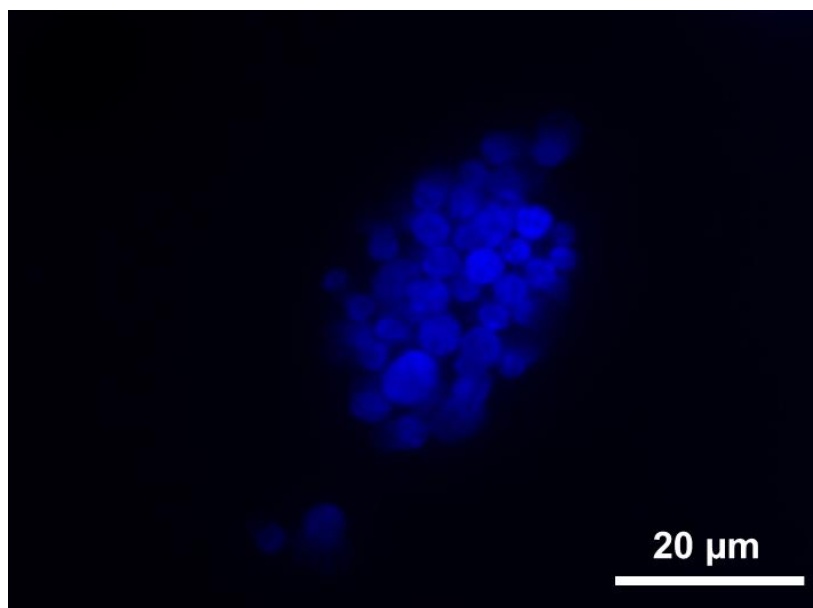


Abbildung 18:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Kerns einer apoptotischen Zelle mit Mikronuklei. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) ist ein Messverfahren, welches sich unter anderem zur Quantifizierung der Rate frühapoptotischer Zellen eignet. Durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper lassen sich auch Proteine, RNA- oder DNA-Stränge nachweisen (Atale et al. 2014). Grundlage der Detektion ist in der Regel die Bildung spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen.

Mittels hydrodynamischer Fokussierung werden die gefärbten Zellen einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Dieser regt die Fluoreszenzfarbstoffe an und das Emissionslicht wird detektiert. Die gewonnenen Daten werden mittels Computerprogramm graphisch und tabellarisch ausgewertet (Rontó & Tarján 2002; Pozarowski & Darzynkiewicz 2004).

3.5.2 Apoptoseassay

Die Rate frühapoptotischer Zellen wurde durch den Nachweis von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran bestimmt (Atale et al. 2014). Annexin V ist ein sensitiver Marker von Phosphatidylserin und damit der frühen Phase der Apoptose (Vermes et al. 1995; Balaji et al. 2013). Das membranständige Phospholipid Phosphatidylserin ist bei vitalen Zellen an der Innenseite der Plasmamembran gebunden. Wird eine Zelle apoptotisch, so kommt es zu einem Drift von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran, wodurch die Detektion mit dem Phospholipid bindenden Protein Annexin V möglich ist (Van Engeland et al. 1998; Löffler & Petrides 2003). Zur Detektion ist Annexin V z.B. mit dem Fluorochrom Phycoerythrin (PE) konjugiert (Schmid et al. 1992).

Durch den Verlust der Integrität der Zellmembran können auch nekrotische Zellen oder Zellen in einem späten Stadium der Apoptose Annexin V-positiv sein. Zum Ausschluss von falsch-positiven Zellen mit Annexin V war die Verwendung von 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) notwendig.

7-AAD ist ein Avitalfarbstoff. Das Chromopeptid kann nur in Zellen eindringen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, was erst in einem späten Stadium der Apoptose bzw. bei Nekrose der Fall ist (Schmid et al. 2007). Nachdem er die Zellmembran passiert hat, interkaliert der Zellfarbstoff in die Cytosin-Guanin-reichen Sequenzen der DNA. Eine Unterscheidung von Apoptose und Nekrose durch 7-AAD allein ist nicht möglich (Philpott et al. 1996).

Durch die Verwendung von Annexin V und 7-AAD war die Bestimmung der Rate frühapoptotischer Zellen mit intakter Zellmembran möglich (siehe Abb. 19). Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose können über eine positive Annexin V-PE-Färbung visualisiert werden, weisen jedoch keine Markierung mit 7-AAD auf (Koopman et al. 1994). Zellen, die sich weder mit Annexin V-PE noch mit 7-AAD markieren ließen, wurden als vital betrachtet. Zellen, die eine Färbung mit Annexin V und 7-AAD aufwiesen, wurden als nekrotisch angesehen oder befanden sich in einem späten Stadium der Apoptose (siehe Tab. 6).

Die Unterscheidung zwischen Fibroblasten und HDMEC in CK erfolgte mittels des Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1). Ein aus der Maus stammender Antikörper, der gegen PECAM-1 gerichtet ist, bindet spezifisch an Endothelzellen (Newman 1997). Zur Detektion ist der Anti-PECAM-1-Antikörper mit FITC konjugiert. Nach erfolgreicher Probenanalyse folgte die Datenverarbeitung unter Verwendung des Computerprogrammes CellQuest™ Pro (Version 5.2.1, BD Biosciences).

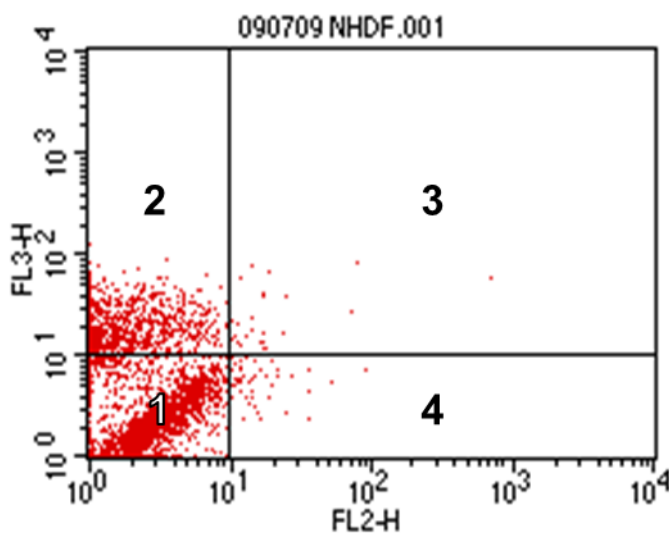


Abbildung 19:

Exemplarisches Dot-Plot-Diagramm einer Färbung von NHDF in MK mit Annexin V-PE (FL2) und 7-AAD (FL3) zur Quantifizierung der Rate frühapoptotischer Zellen. Vitale Zellen (Quadrant 1), späte Apoptose bzw. nekrotische Zellen (Quadrant 2 und 3), frühe Apoptose (Quadrant 4).

Tabelle 6: Zellmarker und Interpretation.

Zellmarker			Interpretation
PECAM-1-FITC	Annexin V-PE	7-AAD	
-	-	-	vitaler DF bzw. NHDF
-	+	-	frühapoptotischer DF bzw. NHDF
-	+/-	+	spätapoptotischer bzw. nekrotischer DF bzw. NHDF
+	-	-	vitale HDMEC
+	+	-	frühapoptotische HDMEC
+	+/-	+	spätapoptotische bzw. nekrotische HDMEC

3.5.3 Färbeprotokoll

Zuerst wurden die OT-Kulturen zweimal mit einem Bindingpuffer (7,5 ml Annexin-Bindingpuffer + 67,5 ml Aqua dest.) gewaschen. Gleichmäßig wurden jeweils 150 µl Annexin V-PE-Lösung auf ein Deckglas (24 x 50 mm) pipettiert und die OT eingedeckt. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur und Lichtschutz. Daran schloss sich ein weiterer Waschschrift an. Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers (rubber policeman) mechanisch ohne weitere enzymatische Behandlung vom OT gelöst und in einem FACS-Röhrchen gesammelt. Nach Abzentrifugation des Überstandes bei 1000 rpm für 3 min wurden die Zellen mit 5 ml Bindingpuffer gewaschen.

Der zweite Färbeschritt beinhaltete die zeitgleiche Zugabe von 5 µl 7-AAD und 15 µl des FITC konjugierten Anti-PECAM-1-Antikörpers mit anschließender 15-minütiger Inkubation bei 4°C. Abschließend wurden die Zellen gewaschen und in 400 µl Bindingpuffer resuspendiert. Zuletzt erfolgte die Fluoreszenzmessung der markierten Zellen im FACS.

3.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

3.6.1 Prinzip des ELISAs

Das auf Antigen-Antikörper-Bindung basierende Nachweisverfahren ELISA ermöglicht eine quantitative Analyse u.a. von Antigenen, Antikörpern oder Zytokinen. Bei der Sandwich-Technik ist ein spezifischer Antikörper bereits adsorptiv an eine Mikrotiterplatte gebunden. Es folgt die Zugabe der zu analysierenden Probe mit dem nachzuweisenden Antigen, z.B. Zellkulturüberstand oder Serum. In der Folge kommt es zur Antigen-Antikörper-Bindung. Die ungebundenen Substanzen der Probe werden in einem Waschschrift entfernt. Danach wird ein zweiter spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichteter Antikörper (Detektionsantikörper) hinzugegeben, der zusätzlich mit einem Enzym konjugiert ist. Es folgt eine weitere Waschung, um nicht gebundene Detektionsantikörper zu entfernen. Danach wird ein Substrat dazugegeben, welches von dem Enzym gespalten wird und dadurch eine Farbreaktion hervorruft. Zur Beendigung der Enzymreaktion wird nach einer definierten Zeit eine Stopplösung hinzugegeben.

Die Absorption des entstandenen Produktes kann bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen werden. Da die Absorption direkt proportional zur Menge des Antigens ist, kann durch Anfertigung einer Standardreihe mit definiert festgelegten Antigenkonzentrationen die Menge an Antigen in der Probe berechnet werden.

3.6.2 Quantitative Analyse von PDGF AA

Die zu jedem Fixierungszeitpunkt gewonnenen Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA auf die jeweilige Konzentration an PDGF AA untersucht. Bei diesem ELISA handelt es sich um einen human/mouse PDGF AA Immunoassay (Quantikine[®], R&D Systems). Im ersten Schritt wurde eine Standardverdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde eine Stammlösung von humanem PDGF AA in einer Konzentration von 10000 pg/ml hergestellt. Es erfolgten 7 Verdünnungen mit dem Kalibrationsdiluenten RD6-3 bis zu einer Konzentration von 15,6 pg/ml. Reiner Kalibrationsdiluent diente als Blank. Des Weiteren wurde das CK-Medium mitgemessen. PDGF AA war in reinem CK-Medium nicht nachweisbar.

Durchführung des Assays:

Zuerst wurden 100 µl des Diluenten RD1-68 in jedes Well pipettiert. Anschließend wurden je 50 µl der Standardverdünnungen, der Negativkontrolle, des CK-Mediums und der Proben in die 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. An die Mikrotiterplatte waren monoklonale Antikörper gegen PDGF AA adsorptiv gebunden. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit anschließendem Waschen. Der Waschschrift beinhaltet die Zugabe und das Abpipettieren von 400 µl Waschpuffer 4 Mal in Folge. Entsprechend der Sandwich-Technik erfolgte die Zugabe von 150 µl eines 2. monoklonalen PDGF AA-Antikörpers, welcher mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert war. Es schloss sich eine erneute Inkubation für 2 Stunden mit anschließendem Waschen an. Nach Zugabe von jeweils 200 µl des Substrates Tetramethylbenzidin wurden die Proben für 30 min unter Lichtschutz inkubiert und danach die Reaktion mit 50 µl 2 N H₂SO₄ gestoppt. Mit dem Photometer Infinite M200 (Tecan) wurde die optische Dichte bei 450 nm gemessen. Zusätzlich erfolgte zur Korrektur der Plattenabsorption eine Messung bei 570 nm.

Unter Verwendung des Computerprogramms MagellanTM (Version 6.6, Tecan) wurde eine Standardkurve erstellt und über die gemessene optische Dichte die PDGF AA-Konzentration in den Proben in pg/ml bestimmt.

3.7 Multiplex Immunoassay

3.7.1 Prinzip des Multiplex Immunoassays

Das Prinzip des "Bead-Based Immunoassays" (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay, Bio-Rad) kombiniert die Sandwich-Technik des ELISAs mit der Durchflusszytometrie. Die sog. Beads bestehen aus einem Polymer aus Polystyrol und Methacrylsäure. Zur Unterscheidung der einzelnen Beads erfolgt die Markierung mittels spezifischer Konzentrationen eines Fluorochroms, das in das Polymer infundiert wird. Die Unterscheidung der verschiedenen Beads ist durch die unterschiedliche Fluoreszenzintensität möglich.

Jedes Well der 96-Well-Mikrotiterplatte enthält 27 verschiedene fluoreszenzmarkierte Beads, die wiederum spezifische Antikörper auf ihrer Oberfläche gebunden haben. Dies ermöglicht die simultane Detektion von 27 unterschiedlichen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in einem einzigen Well. Dies reduziert das benötigte Volumen der zu testenden Probe.

Es folgt die Zugabe der zu analysierenden Probe mit den nachzuweisenden Antigenen. Wie bei einem ELISA kommt es zur Ausbildung von Antigen-Antikörper-Bindungen. Die Vakuumfiltration im Rahmen eines nachfolgenden Waschschriffs gewährleistet den Verbleib der Beads in den Wells bei gleichzeitiger Entfernung ungebundener Substanzen. Im Anschluss daran werden biotinylierte Detektionsantikörper hinzugegeben, welche die gesuchten Antigene spezifisch binden. Nichtgebundene Detektionsantikörper werden in einem erneuten Waschschrift entfernt. Im Anschluss wird ein Komplex aus Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) hinzugegeben, der an die biotinylierten Detektionsantikörper bindet. Nichtgebundene SA-PE-Komplexe werden in einem letzten Waschschrift entfernt.

Die Beads werden mittels hydrodynamischer Fokussierung aufgenommen und an einem dualen Lasersystem vorbeigeleitet. Ein Laser des Bio-Plex® Systems regt das Fluorochrom in den Beads an und das Emissionslicht spezifischer Intensität wird mit Hilfe eines Detektors gemessen. Parallel wird mit Hilfe des zweiten Lasers der SA-PE-Komplex auf der Oberfläche der Beads angeregt und die Intensität des Emissionslichts durch einen Detektor analysiert. Ein Computerprogramm (Bio-Plex Manager™ Software) ermöglicht die Erstellung einer Standardkurve und errechnet über die gemessene Fluoreszenzintensität bei spezifischer Wellenlänge die Konzentration des jeweils gesuchten Zytokins in einer Probe.

3.7.2 Zytokin-Analytik

An den Versuchstagen 0, 1 und 2 wurden jeweils vor Fixierung der OT 2 x 1 ml des Zellkulturüberstands entnommen und bei -80°C gelagert. Die Proben aus den Zellkulturüberständen nach 24 h Normoxie der MK-Präparate von DF (n=8) wurden unter Einhaltung der Kühlkette zu einem externen Labor geschickt. Dort erfolgte die Durchführung des Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assays. Das CK-Medium wurde als Blank mitgemessen.

3.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms SigmaStat. Die Analyse der Unterschiede in Bezug auf die oben aufgeführten Parameter erfolgte sowohl im zeitlichen Verlauf, als auch zwischen den einzelnen Zelltypen, durch den Vergleich von MK mit CK und unter Betrachtung der Kulturbedingungen. Unterschiede wurden mit ANOVA (Varianzanalyse) und Student-Newman-Keuls-Test auf Signifikanz geprüft. Bei fehlender Varianzgleichheit oder Normalverteilung wurde ein ANOVA on ranks-Test durchgeführt. Wenn zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, erfolgte ein Zweistichproben-t-Test. Bei fehlender Varianzgleichheit oder Normalverteilung wurde ein Mann-Whitney-rank-sum-Test angewandt. Ein Unterschied wurde dann als signifikant angesehen, wenn $p \leq 0,05$ war. Die numerischen Ergebnisse der Arbeit wurden als Mittelwerte dargestellt und die Standardabweichung als Maß für die Streuung angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Spaltschluss

4.1.1 DF-Kulturen

Die Spaltgröße an T0K war in MK mit 1265 μm tendenziell größer als in CK (1132 μm). Bei Betrachtung der Spaltbreite der DF-Kulturen zeigte sich jedoch ein gleiches Verhalten der MK und CK unter den jeweiligen Bedingungen (siehe Abb. 20).

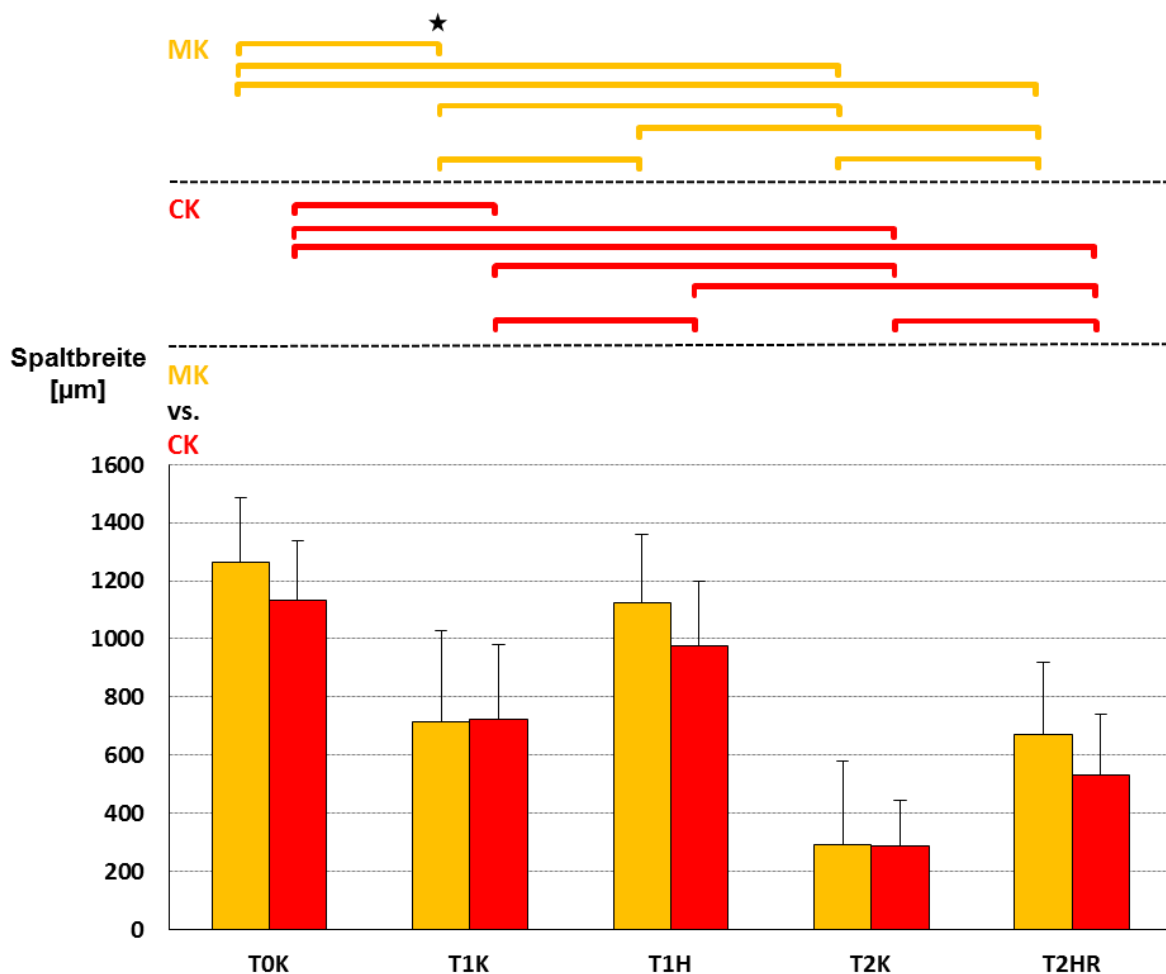


Abbildung 20: Spaltgröße der DF-MK und -CK

Verbleibende Spaltgröße in Mikrometern (μm) der DF-MK (■, n=8) und -CK (■, n=8) des In-vitro-Wundheilungsassays beginnend an Tag 0 (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24-stündiger Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

MK und CK wiesen unter Normoxie einen signifikanten Spaltschluss nach 24 h bzw. 48 h auf. In den Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR) kam es zu einer signifikanten Hemmung der Migration gegenüber den Normoxie-Kulturen (T1K, T2K). Nach 24 h Hypoxie kam es in MK und CK zu einer signifikanten Hemmung der Zellmigration im Vergleich zu T1K. Auch an Tag 2 war der Spaltschluss nach Hypoxie und anschließender Reoxygenierung im Vergleich zum Spaltschluss an T2K signifikant geringer.

4.1.2 NHDF-Kulturen

Die NHDF in MK und CK wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Abb. 21).

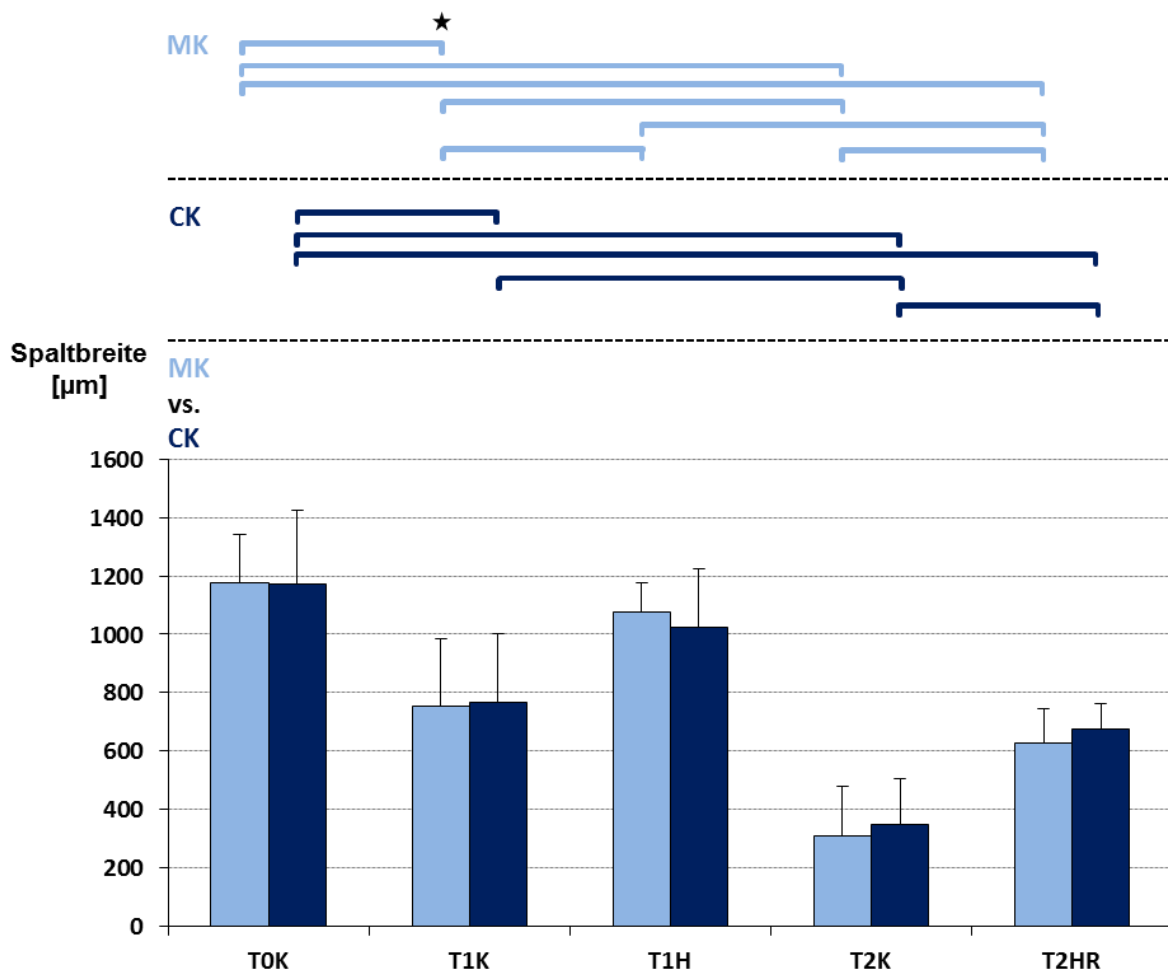


Abbildung 21: Spaltgröße der NHDF-MK und -CK

Verbleibende Spaltgröße in Mikrometer (μm) der NHDF-MK (■, n=4) und -CK (■, n=4) des In-vitro-Wundheilungsassays beginnend an Tag 0 (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24-stündiger Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

Der Mittelwert der Spaltgröße an T0K betrug in MK 1174 μm und in CK 1171 μm . Das Migrationsverhalten der NHDF in MK und CK führte zu einem signifikanten Spaltschluss im zeitlichen Verlauf nach 24 h bzw. 48 h Normoxie. An Tag 1 zeigte sich eine Hemmung der Migration nach 24 h Hypoxie gegenüber der Normoxie, welche jedoch nur in MK signifikant ausfiel. An Tag 2 konnte in MK und CK ein signifikant besserer Spaltschluss nach Normoxie (T2K) im Vergleich zu den Hypoxie-Kulturen mit anschließender Reoxygenierung (T2HR) nachgewiesen werden.

4.1.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen

Die DF und NHDF zeigten weder in MK noch in CK signifikante Unterschiede zueinander bzgl. der Zellmigration (siehe Abb. 22 und 23). Es zeigte sich jedoch eine tendenziell gesteigerte Migration der DF gegenüber den NHDF in CK zu allen Zeitpunkten (siehe Abb. 23).

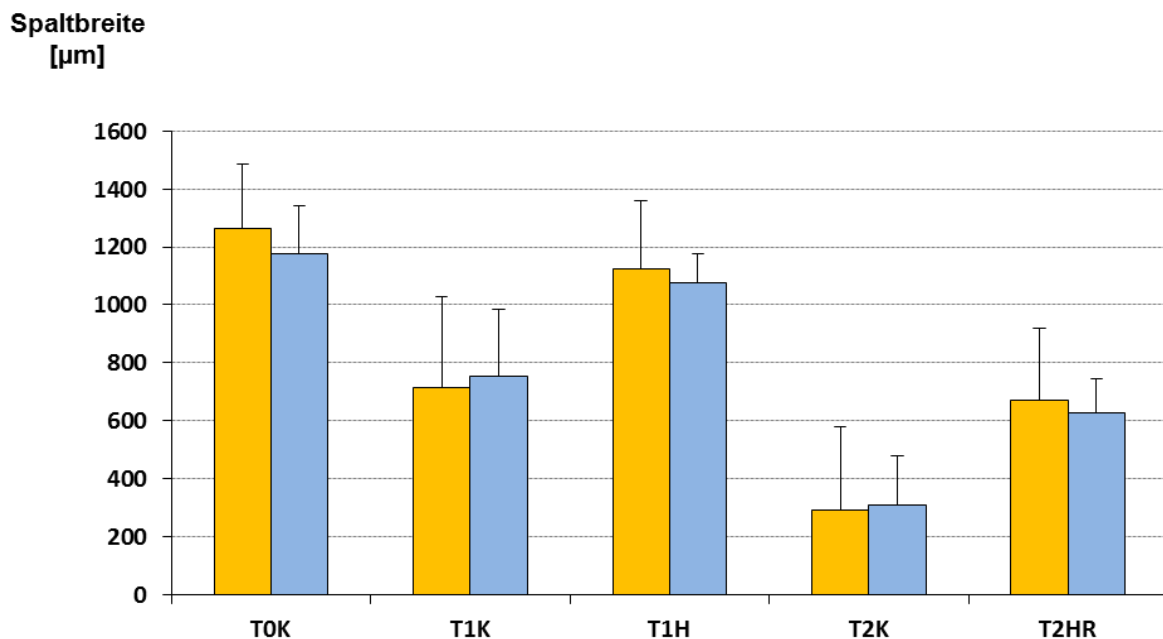


Abbildung 22: Vergleich der Spaltgröße der DF- und NHDF-MK

Verbleibende Spaltgröße in Mikrometer (μm) der DF- (■, n=8) und NHDF-MK (■, n=4) des In-vitro-Wundheilungsassays beginnend an Tag 0 (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24-stündiger Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Spaltbreite [μm]

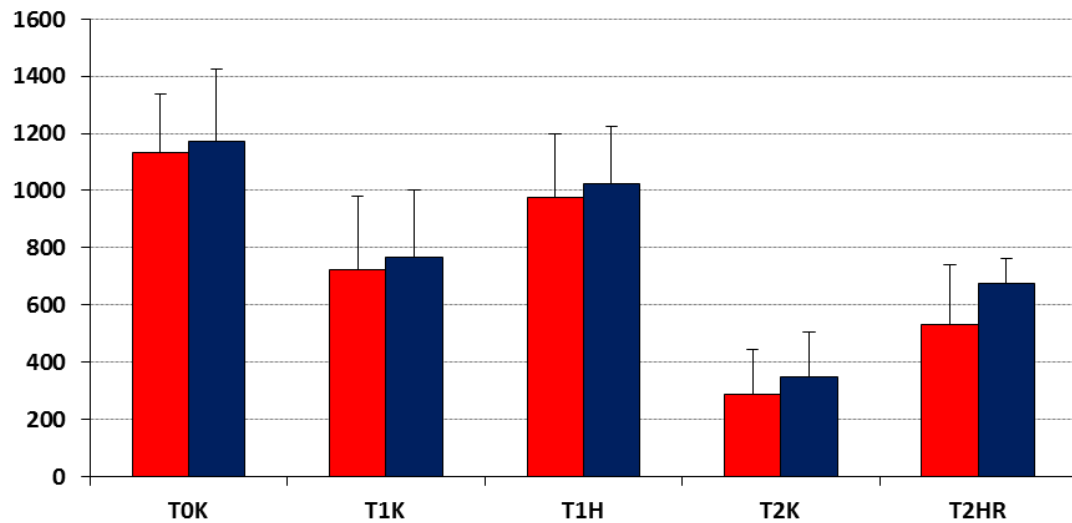


Abbildung 23: Vergleich der Spaltgröße der DF- und NHDF-CK

Verbleibende Spaltgröße in Mikrometer (μm) der DF- (■, n=8) und NHDF-CK (■, n=4) des In-vitro-Wundheilungsassays beginnend an Tag 0 (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24-stündiger Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

4.1.4 HDMEC-Kulturen

Der Mittelwert der Spaltbreite an T0K in den HDMEC-Kulturen fiel mit $945 \mu\text{m}$ tendenziell geringer aus als in den CK mit DF- bzw. NHDF (siehe Abb. 24). Im zeitlichen Verlauf kam es in den MK von HDMEC nach 24 h und 48 h Normoxie zu einem signifikanten Spaltschluss. Dagegen zeigte sich nach 24 h Hypoxie mit $895 \mu\text{m}$ und nach anschließender Reoxygenierung mit $911 \mu\text{m}$ verbleibender Spaltgröße nur eine minimale Zellmigration. Der Spaltschluss in den Normoxie- und Hypoxie-Kulturen unterschied sich dabei signifikant. Beim Vergleich der Spaltgröße der MK von HDMEC mit den CK zeigte sich die tendenziell geringste Spaltbreite an Tag 0 in den MK von HDMEC. Dies führte nach 24 h Normoxie zu einer ebenfalls tendenziell geringeren Spaltbreite der MK von HDMEC gegenüber den CK. Im Gegensatz zu den CK stagnierte die Spaltbreite der MK von HDMEC nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung (T2HR) bei $911 \mu\text{m}$.

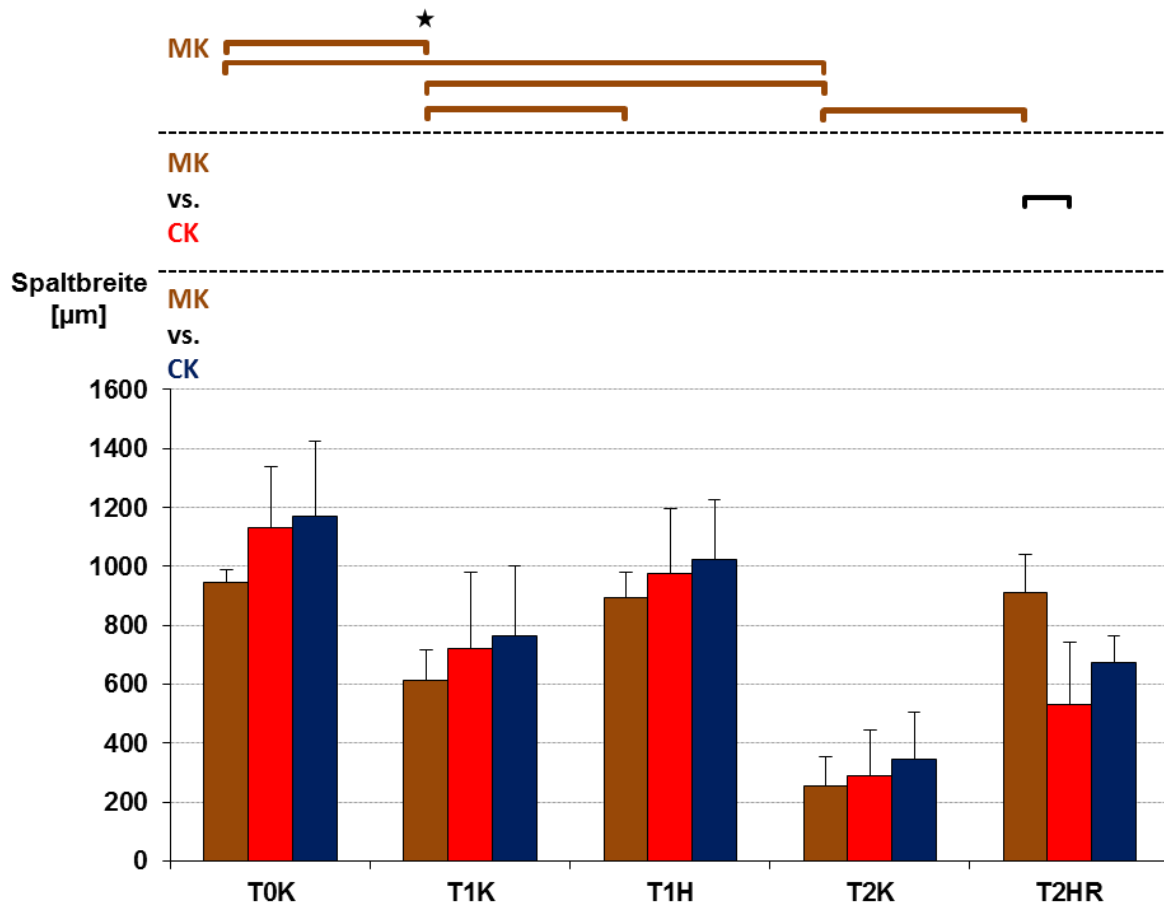


Abbildung 24: Vergleich der Spaltgröße der HDMEC-MK und -CK

Verbleibende Spaltgröße in Mikrometer (µm) der HDMEC-MK (■, n=4) sowie der DF- (■, n=8) und NHDF-CK (■, n=4) des In-vitro-Wundheilungsassays beginnend an Tag 0 (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24-stündiger Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

4.2 Proliferation: Zelldichte

4.2.1 DF-Kulturen

In MK ergab sich eine initiale Zelldichte (T0K) von 105 Zellen pro mm², die nach 24 h Normoxie auf 294 Zellen pro mm² und nach 48 h Normoxie auf 558 Zellen pro mm² erhöht war (siehe Abb. 25). Nach 24-stündiger Hypoxie bzw. nach anschließender 24-stündiger Reoxygenierung stagnierte die Zelldichte bei 143 Zellen pro mm² bzw. 185 Zellen pro mm².

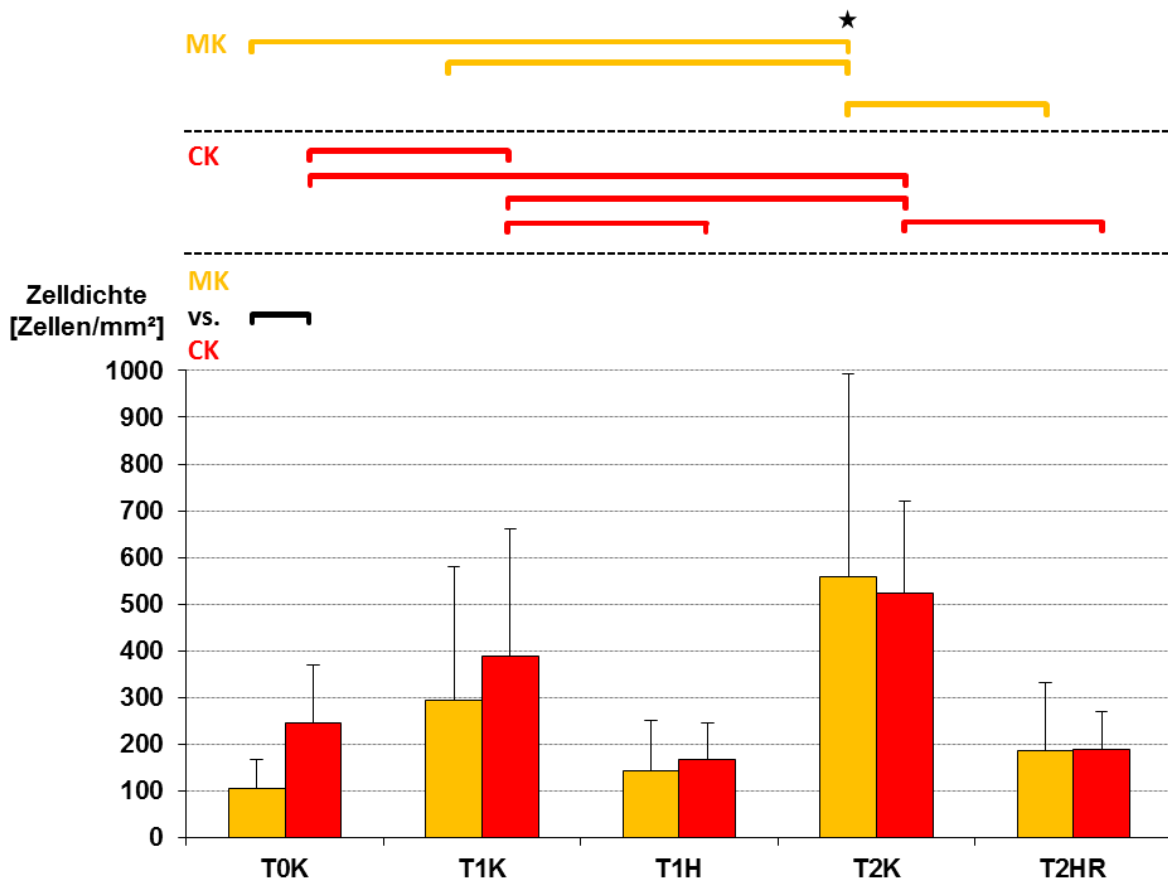


Abbildung 25: Zelldichte der DF-MK und -CK

Zelldichte der DF-MK (■, n=8) und -CK (■, n=8) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. *p ≤ 0,05.

Die Zelldichte in CK erhöhte sich signifikant von initial 245 Zellen pro mm² (T0K) auf 390 Zellen pro mm² nach 24 h Normoxie und auf 523 Zellen pro mm² nach 48 h Normoxie. Nach

24-stündiger Hypoxie zeigte sich eine Abnahme der Zelldichte auf 168 Zellen pro mm², die sich auch nach 24 h Reoxygenierung nicht steigerte.

Obwohl die Zelldichte an Tag 0 in CK höher war als in MK, ergab sich nach 48 h Normoxie eine ähnliche Zelldichte in MK und CK. Nach 24-stündiger Hypoxie und auch nach anschließender Reoxygenierung ließ sich in den MK und CK eine ähnliche Zelldichte feststellen.

4.2.2 NHDF-Kulturen

Die initiale Zelldichte (T0K) der NHDF in MK betrug 72 Zellen pro mm² und an T1K 156 Zellen pro mm² (siehe Abb. 26). Nach 48 h Normoxie zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zelldichte auf 267 Zellen pro mm² im Vergleich zu T0K. Nach 24 h Hypoxie stagnierte die Zellzahl bei 82 Zellen pro mm² und erreichte nach weiteren 24 h Reoxygenierung 146 Zellen pro mm².

Die CK zeigten an Tag 0 eine Zelldichte von 187 Zellen pro mm². Signifikante Änderungen der Zelldichte ergaben sich in den CK im zeitlichen Verlauf nicht. Nach 24 h bzw. 48 h Normoxie kam es zu einer tendenziellen Zunahme der Zelldichte auf 277 Zellen pro mm² bzw. 475 Zellen pro mm². Nach 24 h Hypoxie bzw. nach anschließender 24-stündiger Reoxygenierung zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Zelldichte auf 136 Zellen pro mm² bzw. 144 Zellen pro mm² im Vergleich zum Ausgangswert.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen MK und CK. In den CK ermittelten wir im Vergleich zu den MK an Tag 0 eine tendenziell höhere Zelldichte, die sich nach 24 h Hypoxie und anschließender Reoxygenierung anglich. Nach 24 h und 48 h Normoxie war die Zelldichte in den CK gegenüber den MK tendenziell erhöht.

Während die Zelldichte der NHDF in MK nach 24 h Hypoxie bzw. anschließender Reoxygenierung gegenüber dem Ausgangswert tendenziell erhöht war, kam es in den CK zu einer tendenziellen Abnahme der Zelldichte. Ein ähnliches Verhalten konnte bereits bei den DF-Kulturen beobachtet werden.

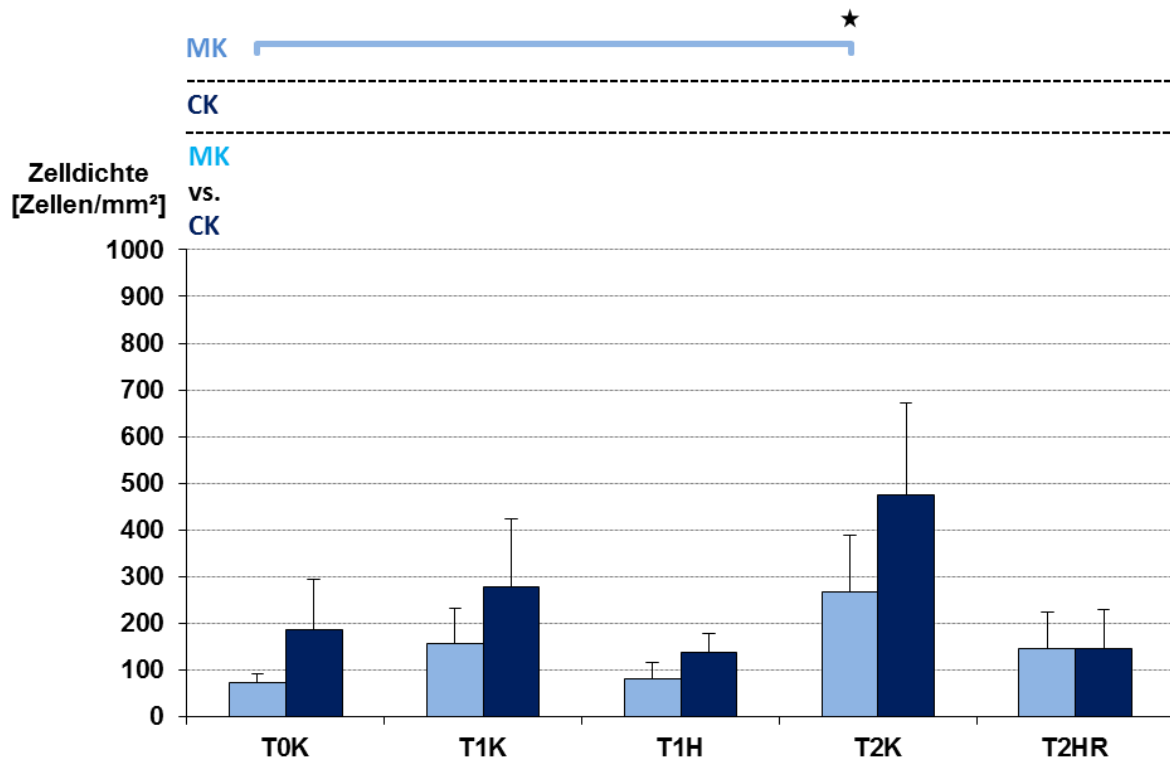


Abbildung 26: Zellichte der NHDF-MK und -CK

Zellichte der NHDF-MK (■, n=4) und -CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

4.2.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen

Die Zellichten der MK und CK von DF waren gegenüber denjenigen von NHDF tendenziell höher. Generell beobachteten wir jedoch in den DF- und NHDF-Kulturen ein ähnliches Verhalten.

So kam es in den MK im zeitlichen Verlauf zu einer tendenziellen Zunahme der Zellichte, die nach 24 h und 48 h Normoxie stärker ausgeprägt war als nach 24 h Hypoxie (siehe Abb. 27). Eine anschließende Reoxygenierung vermochte die Zellichte nicht zu steigern. Signifikante Unterschiede zwischen den MK von DF und NHDF fanden sich nicht.

Die DF- und NHDF-CK wiesen ebenfalls eine ähnliche Zellichte auf (siehe Abb. 28). In CK kam es jedoch nach 24 h Hypoxie zu einem tendenziellen Abfall der Zellichte im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0. Nach anschließender 24-stündiger Reoxygenierung stagnierte die Zellichte. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den DF- und NHDF-CK.

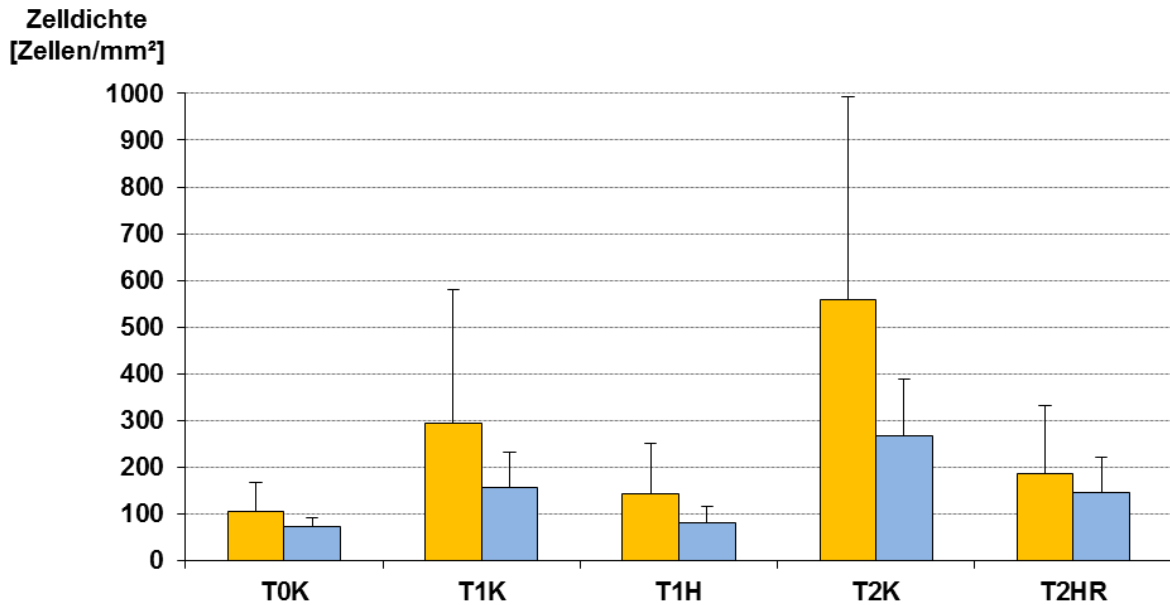


Abbildung 27: Vergleich der Zelldichte der DF- und NHDF-MK

Zelldichte der DF- (■, n=8) und NHDF-MK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

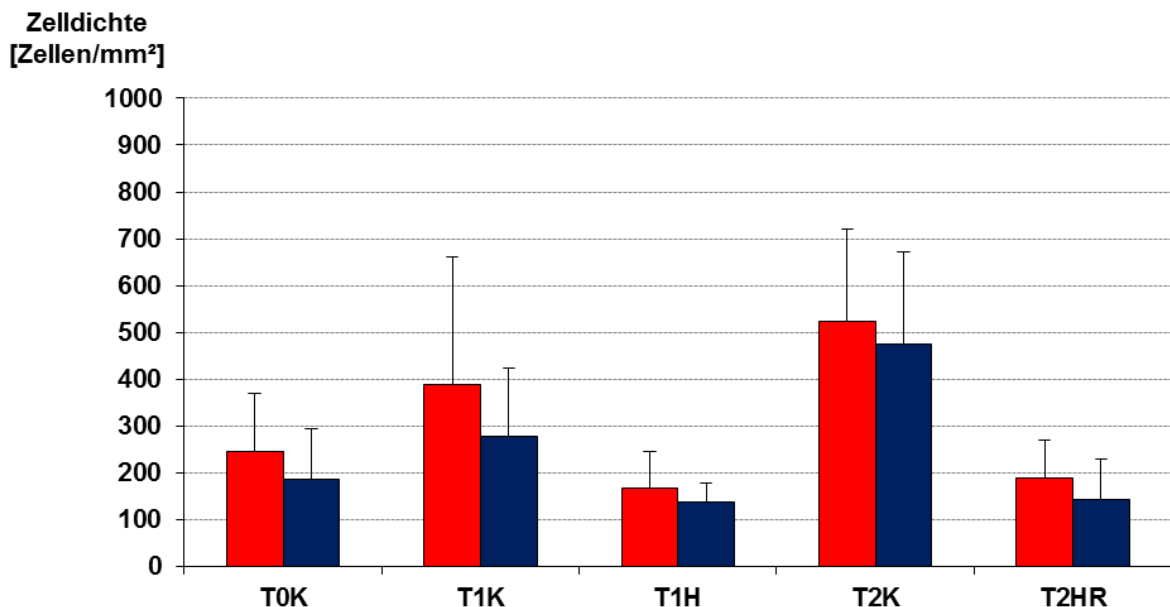


Abbildung 28: Vergleich der Zelldichte der DF- und NHDF-CK

Zelldichte der DF- (■, n=8) und NHDF-CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

4.2.4 HDMEC-Kulturen

Die Zelldichte in den MK von HDMEC betrug an Tag 0 263 Zellen pro mm² (siehe Abb. 29). Nach 24 h Normoxie nahm die Zelldichte signifikant auf 504 Zellen pro mm² zu. Nach 48 h Normoxie stagnierte die Zelldichte bei 539 Zellen pro mm². Im Vergleich zu den Normoxie-Kulturen an Tag 1 und 2 bewirkte eine 24-stündige Hypoxie bzw. eine anschließende Reoxygenierung eine signifikante Abnahme der Zelldichte auf 244 Zellen pro mm² bzw. 217 Zellen pro mm². Es zeigte sich an allen Versuchstagen eine tendenziell höhere Zelldichte der MK von HDMEC gegenüber den CK mit DF bzw. NHDF; signifikante Unterschiede ergaben sich nicht.

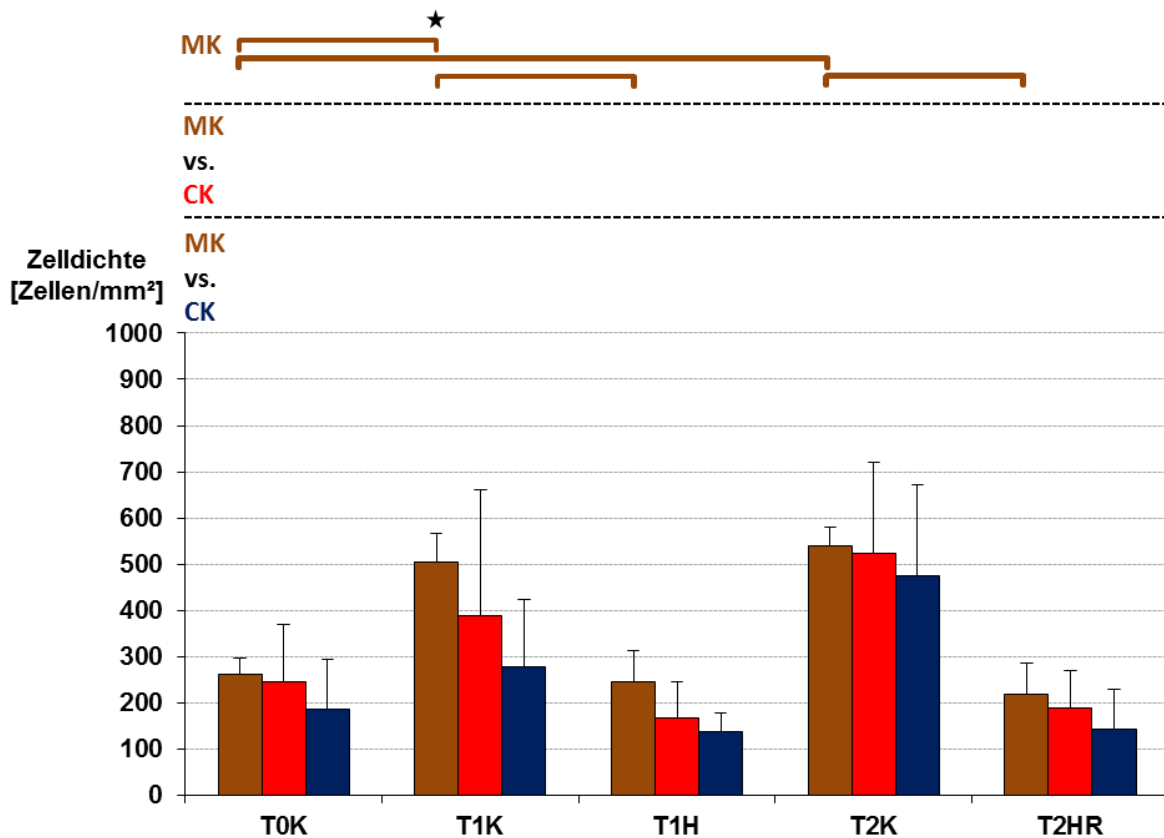


Abbildung 29: Vergleich der Zelldichte der HDMEC-MK und -CK

Zelldichte der HDMEC-MK (■, n=4) sowie der DF- (■, n=8) und NHDF-CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

4.3 Proliferation: Ki-67/MIB-1

4.3.1 Fibroblasten

4.3.1.1 DF-Kulturen

In den DF-MK fand sich an Tag 0 eine Rate Ki-67/MIB-1-positiver Zellen von 46%, die sich nach 24 h Normoxie auf ein Maximum von 85% steigerte und nach 48 h Normoxie bei 78% stagnierte (siehe Abb. 30). Nach 24 h Hypoxie fiel die Proliferationsrate mit 60% Ki-67/MIB-1-positiver DF signifikant geringer aus als nach 24 h Normoxie. Nach Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung kam es zu einem signifikanten Anstieg der Proliferationsrate auf 78% im Vergleich zur Hypoxie.

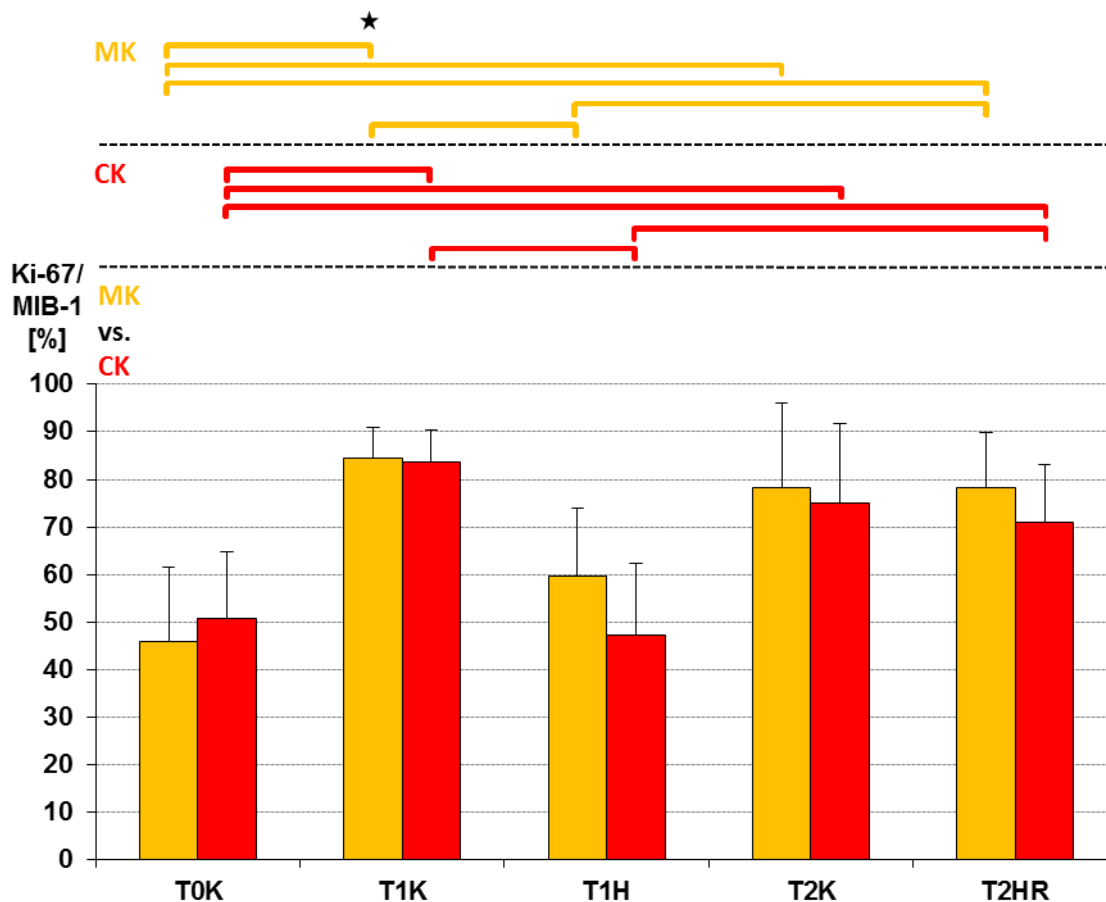


Abbildung 30: Proliferationsrate der DF in MK und CK

Prozentualer Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven Fibroblasten von allen Fibroblasten in den DF-MK (■, n=8) und -CK (■, n=8) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

In den CK ergab sich an Tag 0 eine Rate Ki-67/MIB-1-positiver DF von 51%, die nach 24 h Normoxie auf 84% anstieg und nach 48 h Normoxie bei 75% stagnierte. Nach 24 h Hypoxie zeigte sich ein Abfall der Rate Ki-67/MIB-1-positiver DF auf 47% im Vergleich zur Normoxie. Nach Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung war die Rate proliferierender DF signifikant auf 71% gegenüber der Hypoxie erhöht.

Generell zeigten DF in MK und CK ein ähnliches Verhalten mit einer stärkeren Proliferation nach 24 h Normoxie und einer tendenziellen Abnahme der Proliferationsrate nach 48 h Normoxie. Die Auswirkung der Hypoxie mit dem damit verbundenen Proliferationsrückgang der DF erschien in CK ausgeprägter als in MK. Der Anteil Ki-67/MIB-1-positiver DF in CK fiel nach 24 h Hypoxie tendenziell geringer aus als an Tag 0. Eine anschließende Reoxygenierung führte sowohl in MK als auch CK zu einem signifikanten Anstieg der Proliferationsrate. Mit Ausnahme von Tag 0 fand sich in MK eine tendenziell höhere Proliferationsrate der DF als in CK.

4.3.1.2 NHDF-Kulturen

In den NHDF-MK zeigte sich an T0K eine Proliferationsrate von 55%, die nach 24 h Normoxie auf ein Maximum von 95% anstieg und nach 48 h Normoxie bei 90% stagnierte (siehe Abb. 31). Mit 70% Ki-67/MIB-1-positiver NHDF zeigte sich nach 24 h Hypoxie ein signifikanter Abfall der Proliferation gegenüber der Normoxie, die jedoch gleichzeitig eine signifikante Steigerung zum Ausgangswert an Tag 0 darstellte. Nach Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung kam es zu einem erneuten Anstieg der Proliferationsrate auf 86%, die damit nur geringfügig unter der Proliferationsrate nach 48 h Normoxie lag.

Auch in CK zeigte sich an Tag 0 nach einer anfänglichen Rate Ki-67/MIB-1-positiver NHDF von 54% eine Zunahme auf 89% nach 24 h Normoxie und eine Stagnation proliferierender NHDF bei 90% nach 48 h Normoxie. Die Hypoxie bedingte nach 24 h eine signifikante Abnahme der Proliferation der NHDF auf 61% im Vergleich zur Normoxie und zeigte damit keinen signifikanten Unterschied zum Ausgangswert an Tag 0. Nach Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung stieg die Proliferationsrate der NHDF erneut signifikant auf 81% an. Ebenso wie in MK bestand in CK kein signifikanter Unterschied der Proliferationsrate der NHDF nach 48 h Normoxie und 24 h Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung.

Im direkten Vergleich der MK mit der CK ergab sich ein ähnliches Verhalten der Fibroblasten mit signifikanter Zunahme der Rate Ki-67/MIB-1-positiver NHDF nach 24 h Normoxie und Stagnation nach 48 h Normoxie. Nach 24 h Hypoxie zeigte sich eine signifikante Abnahme der Proliferationsrate der NHDF im Vergleich zur Normoxie an Tag 1 und ein erneuter

Proliferationsschub nach Reoxygenierung. Die Proliferationsrate der NHDF war unter allen Bedingungen in MK tendenziell höher als in CK; signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht.

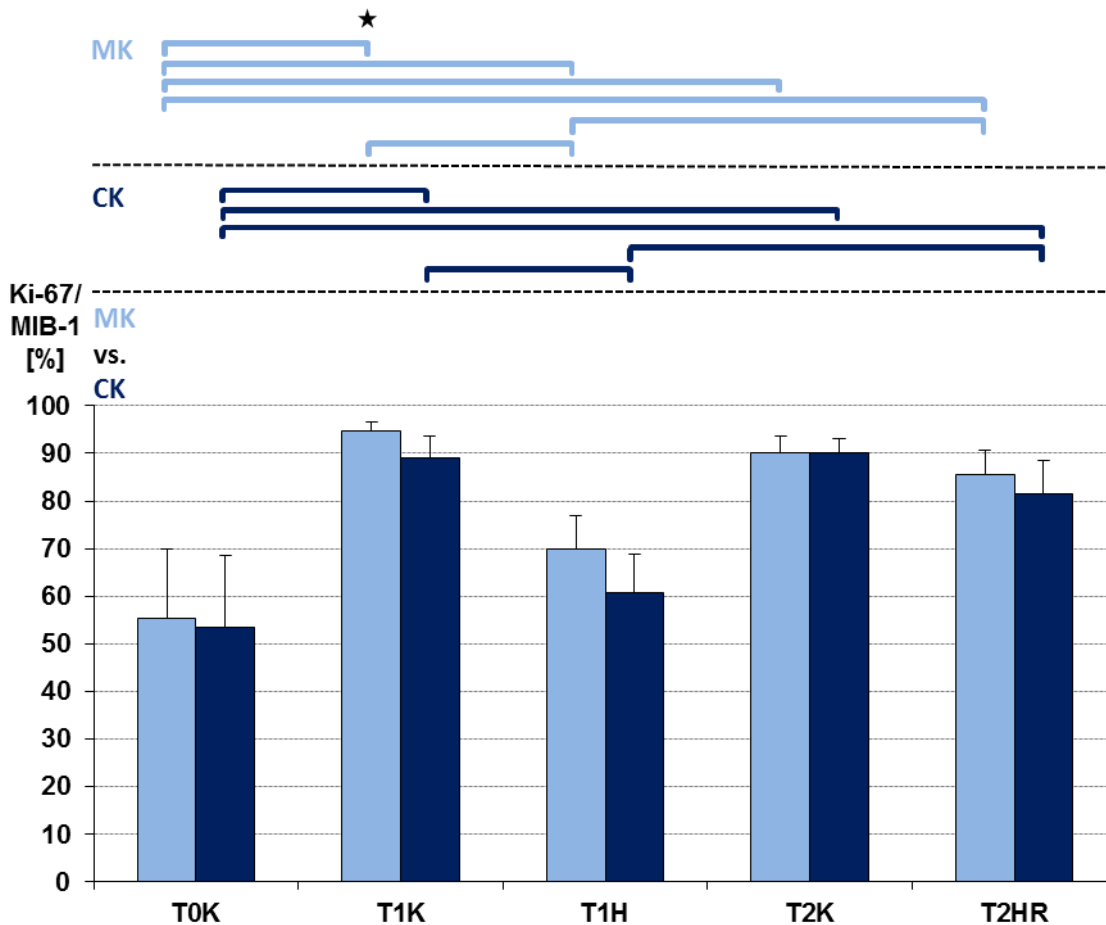


Abbildung 31: Proliferationsrate der NHDF in MK und CK

Prozentualer Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven Fibroblasten von allen Fibroblasten in den NHDF-MK (■, n=4) und -CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

4.3.1.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen

Die Fibroblasten in den DF-Kulturen wiesen zu allen Untersuchungszeitpunkten und Bedingungen in MK und CK eine tendenziell geringere Proliferationsrate auf als in den NHDF-Kulturen (siehe Abb. 32 und 33). Ein signifikanter Unterschied der Rate Ki-67/MIB-1-positiver Fibroblasten ergab sich nur beim Vergleich der MK nach 24 h Normoxie. Die Beteiligung der HDMEC innerhalb der CK führte nicht zu abweichenden Ergebnissen: Die tendenziellen Verläufe ähnelten denen innerhalb der MK.

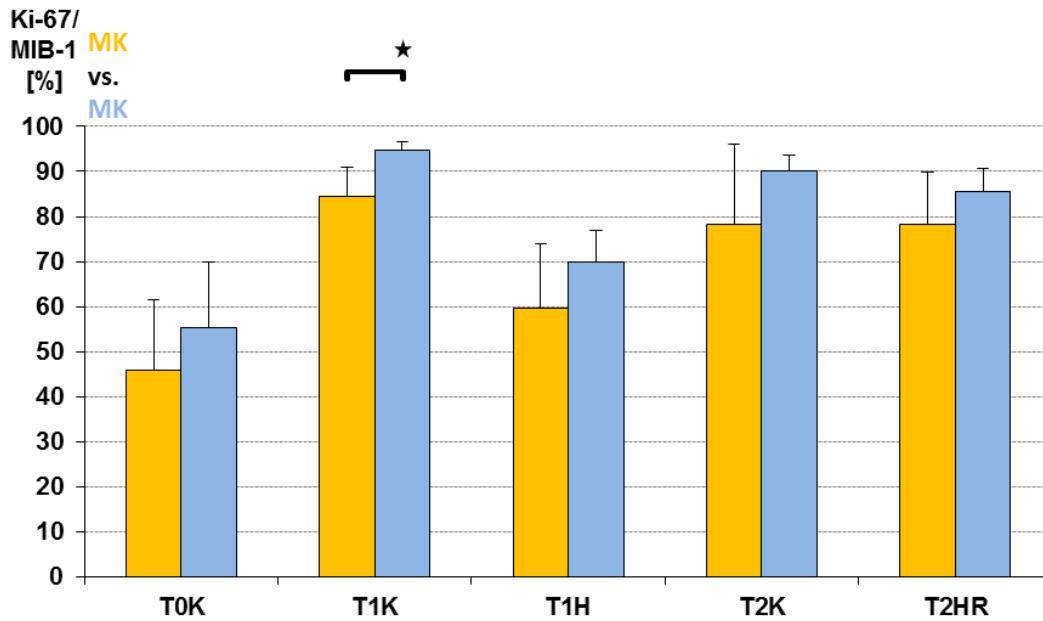


Abbildung 32: Vergleich der Proliferationsrate der DF und NHDF in MK

Prozentualer Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven Fibroblasten von allen Fibroblasten in den DF- (■, n=8) und NHDF-MK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. *p ≤ 0,05.

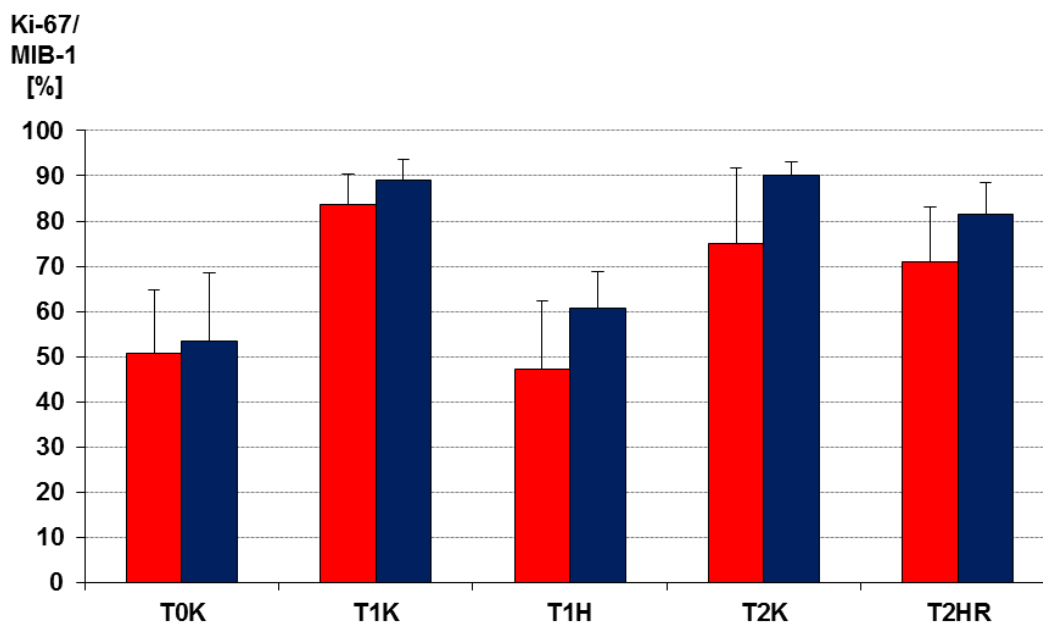


Abbildung 33: Vergleich der Proliferationsrate der DF und NHDF in CK

Prozentualer Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven Fibroblasten von allen Fibroblasten in den DF- (■, n=8) und NHDF-CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

4.3.2 Endothelzellen

Die HDMEC in MK wiesen an Tag 0 eine Proliferationsrate von 50% auf (siehe Abb. 34). Nach 24 h Normoxie stieg die Proliferationsrate signifikant auf 69% an, fiel jedoch nach 48 h Normoxie auf 49% ab. Nach 24 h Hypoxie zeigte sich ein signifikanter Abfall der Proliferationsrate auf 54% im Vergleich zur Normoxie. Nach anschließender Reoxygenierung fiel die Anzahl der Ki-67/MIB-1-positiven HDMEC weiter auf 30% ab.

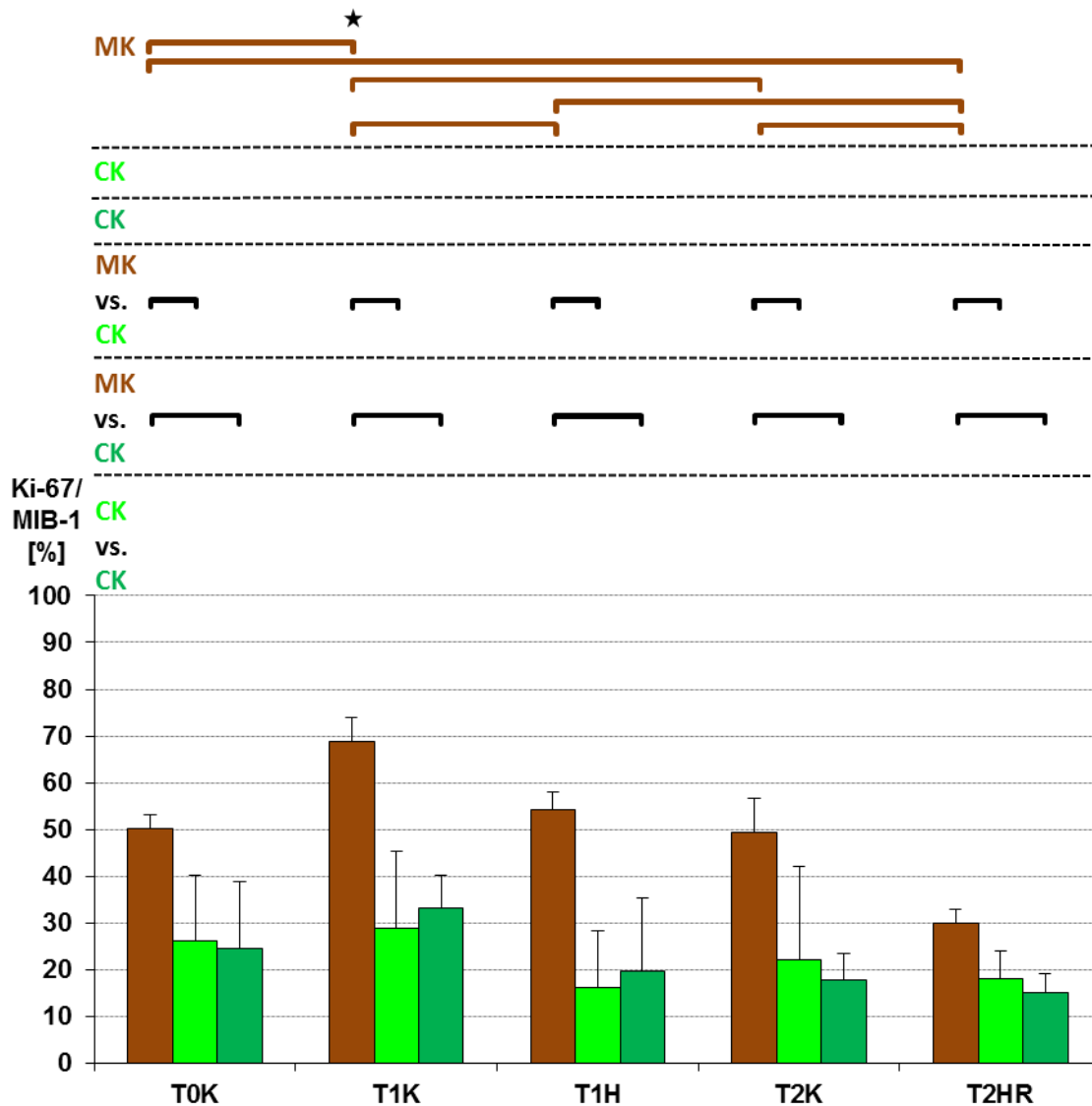


Abbildung 34: Proliferationsrate der HDMEC in MK und CK

Prozentualer Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven HDMEC in MK (■, n=4) sowie in den DF- (■, n=8) und NHDF-CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

Die Proliferationsrate der HDMEC in den CK mit DF lag an Tag 0 bei 27% und stagnierte im zeitlichen Verlauf. So zeigte sich nach 24 h Normoxie eine stabile Proliferationsrate der HDMEC von 29%, die nach 48 h Normoxie tendenziell auf 22% abnahm. Nach 24 h Hypoxie ergab sich eine Proliferationsrate der HDMEC von 16%, die nach anschließender Reoxygenierung bei 18% stagnierte.

In den NHDF-CK stieg die Rate Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC von 24% an Tag 0 auf 33% nach 24 h Normoxie an, fiel jedoch nach 48 h Normoxie tendenziell wieder auf 18% ab. Nach 24 h Hypoxie kam es zu einem tendenziellen Proliferationsabfall der HDMEC auf 20% im Vergleich zur Normoxie und einer weiteren Abnahme auf 15% nach 24 h Reoxygenierung.

Beim Vergleich der Proliferationsrate der HDMEC in MK mit der Rate proliferierender HDMEC in CK mit DF bzw. NHDF zeigte sich an sämtlichen Untersuchungstagen ein signifikanter Proliferationsvorteil der HDMEC in MK.

Beim Vergleich Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC in den DF- und NHDF-CK ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Proliferation der HDMEC stagnierte bei Co-Kultivierung sowohl mit DF als auch NHDF.

4.4 Myofibroblasten-Differenzierungsrate

4.4.1 DF-Kulturen

Die MFDR in den DF-MK betrug 15% an Tag 0 und fiel im zeitlichen Verlauf tendenziell ab (siehe Abb. 35). So fand sich nach 24 h Normoxie ein MF-Anteil von 7%, nach 24 h Hypoxie lag der Anteil bei 9%. Nach 48 h Normoxie ergab sich mit 3% eine minimale MFDR und nach Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung ein Anteil von 7%.

Die MFDR an Tag 0 in den DF-CK lag mit 8% unter derjenigen der MK, stieg jedoch im zeitlichen Verlauf tendenziell an. Nach 24 h Normoxie ergab sich eine MFDR von 11%, nach 24 h Hypoxie ein Anteil von 9%. T2K und T2HR zeigten indes eine tendenzielle Steigerung der MFDR auf 14% bzw. 11%.

Auffallend war ein Abfall der MFDR in den MK im zeitlichen Verlauf, mit erhöhtem Anteil an MF in den Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR) im Vergleich zu den Normoxie-Kulturen (T1K, T2K). Dagegen zeigte sich in CK unter Beteiligung der HDMEC ein tendenzieller Anstieg der MFDR über die Zeit mit einer erhöhten MFDR in den Normoxie-Kulturen (T1K, T2K) gegenüber den Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR). Die MFDR war nach 48 h Normoxie in den CK gegenüber den MK signifikant erhöht.

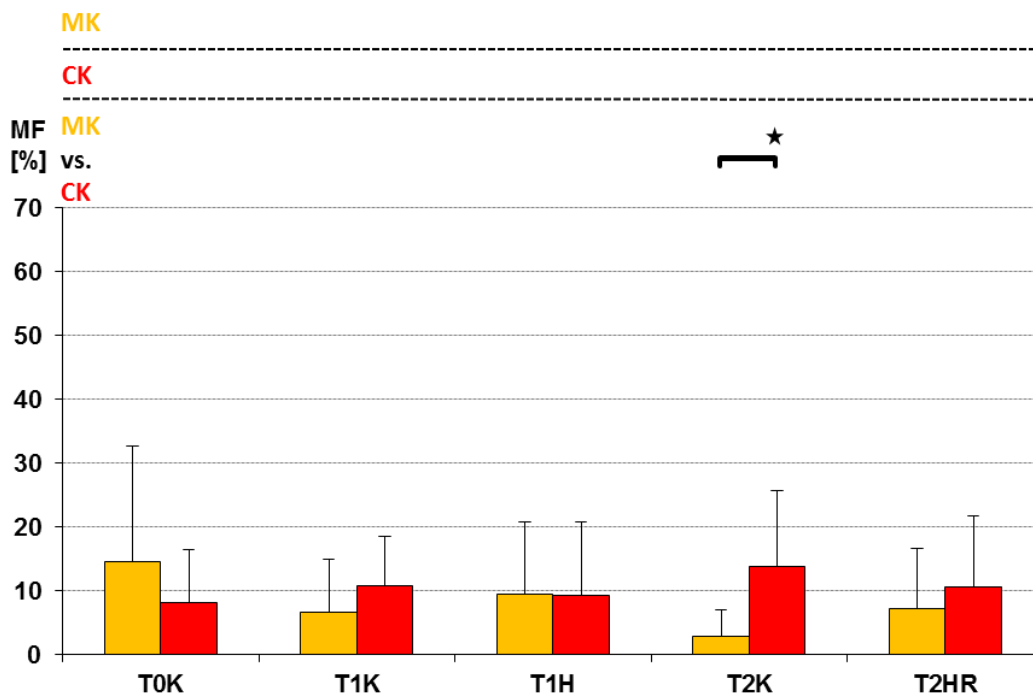


Abbildung 35: MFDR in den DF-MK und -CK

Prozentualer Anteil der MF von allen Fibroblasten in den DF-MK (■, n=8) und -CK (■, n=8) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

4.4.2 NHDF-Kulturen

Die MFDR in den NHDF-MK lag an Tag 0 bei 38% und fiel tendenziell nach 24 h Normoxie auf 22% und nach 24 h Hypoxie auf 26% ab (siehe Abb. 36). Die MFDR betrug nach 48 h Normoxie 8%, wohingegen sich nach Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung eine MFDR von 17% ergab. Somit lag die MFDR in den Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR) tendenziell über derjenigen der Normoxie-Kulturen (T1K, T2K).

Die NHDF-CK wiesen an Tag 0 eine MFDR von 23% auf. Nach 24 h Normoxie fiel der MF-Anteil tendenziell auf 18% und nach 48 h Normoxie auf 7% ab. Unter dem Einfluss der Hypoxie ergab sich an Tag 1 eine MFDR von 23%. Nach anschließender Reoxygenierung kam es zu einem tendenziellen Abfall der MFDR auf 17%. Bei Mono- und Co-Kultivierung der NHDF lag die MFDR in den Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR) tendenziell über derjenigen der Normoxie-Kulturen (T1K, T2K).

Die MK wiesen eine ähnliche MFDR an den verschiedenen Versuchstagen auf wie die CK. So kam es im zeitlichen Verlauf zu einer tendenziellen Abnahme der MFDR, die unter dem Einfluss der Hypoxie bzw. anschließenden Reoxygenierung tendenziell geringer ausfiel als nach 24 h bzw. 48 h Normoxie. Trotz tendenziell unterschiedlicher MFDR an Tag 0 der MK und CK von NHDF glichen sich die MFDR an Tag 2 nach 48 h Normoxie bzw. Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung aneinander an. Ein stabilisierender Effekt der HDMEC bei Co-Kultivierung auf die MFDR, wie in den DF-Kulturen, ergab sich in den NHDF-Kulturen nicht.

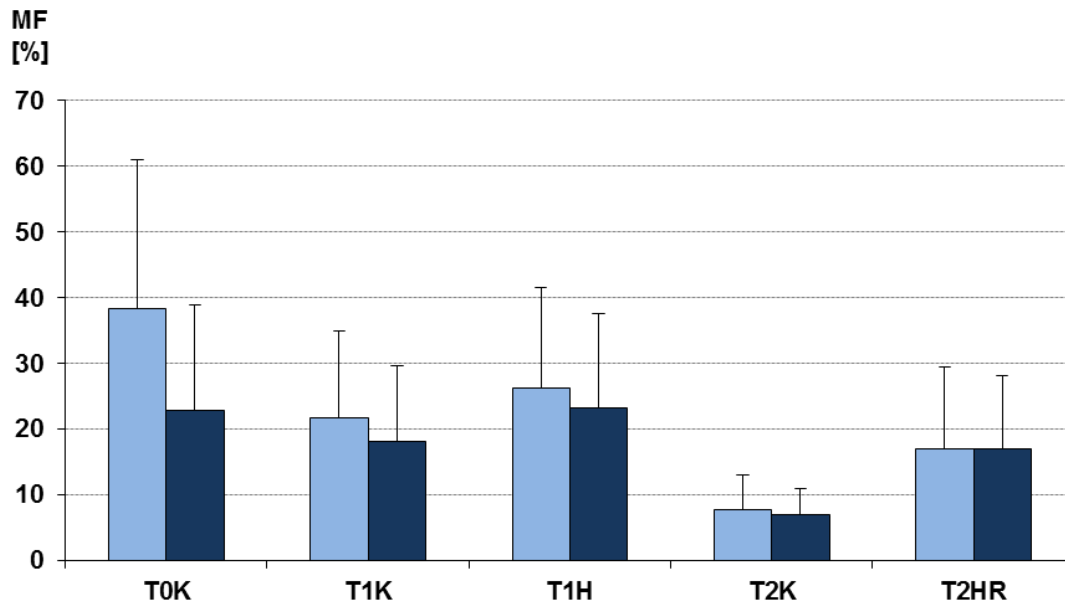


Abbildung 36: MFDR in den NHDF-MK und -CK

Prozentualer Anteil der MF von allen Fibroblasten in den NHDF-MK (■, n=4) und -CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

4.4.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen

Beim Vergleich der DF- mit den NHDF-Kulturen fiel die höhere MFDR in den MK und CK von NHDF auf (siehe Abb. 37 und 38). Ein signifikanter Unterschied ergab sich jedoch nur an Tag 1 in MK (siehe Abb. 37). Die geringsten MFDR fanden sich in den DF- und NHDF-MK nach 48 h Normoxie. Die DF- und NHDF-MK zeigten jedoch ähnliche Veränderungen der MFDR an den unterschiedlichen Versuchstagen: Sowohl in den DF- als auch den NHDF-Kulturen kam es zu einer Abnahme der MFDR im zeitlichen Verlauf, die in den Hypoxie-Kulturen tendenziell geringer ausgeprägt war als in den Normoxie-Kulturen.

In den NHDF-CK betrug die MFDR an Tag 0 23% und in den DF-CK 8% (siehe Abb. 38). In den DF- und NHDF-MK sowie in den NHDF-CK schien die Hypoxie einen protektiven Effekt auf die MFDR auszuüben. Im Unterschied dazu kam es in den DF-CK zu einem tendenziellen Anstieg der MFDR in den Normoxie-Kulturen sowohl im zeitlichen Verlauf als auch im Vergleich zu den Hypoxie-Kulturen. Die Co-Kultivierung von DF mit HDMEC bewirkte eine Stabilisierung der MFDR und verhinderte den tendenziellen Abfall der MFDR im zeitlichen Verlauf, der er in allen anderen Kulturen beobachtet wurde.

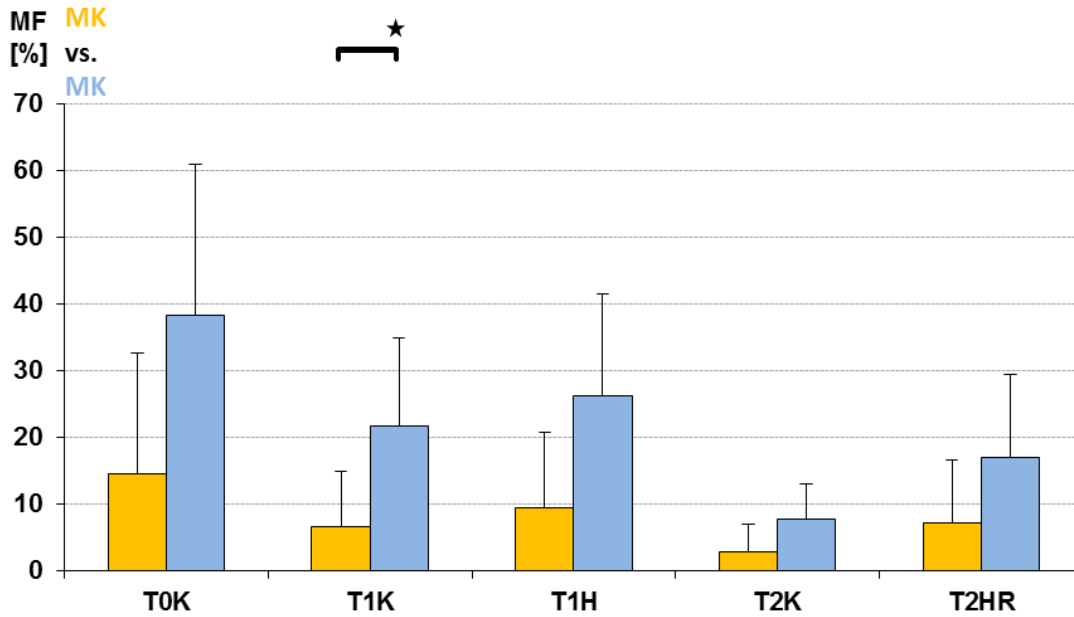


Abbildung 37: Vergleich der MFDR in den DF- und NHDF-MK

Prozentualer Anteil der MF von allen Fibroblasten in den DF- (■, n=8) und NHDF-MK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

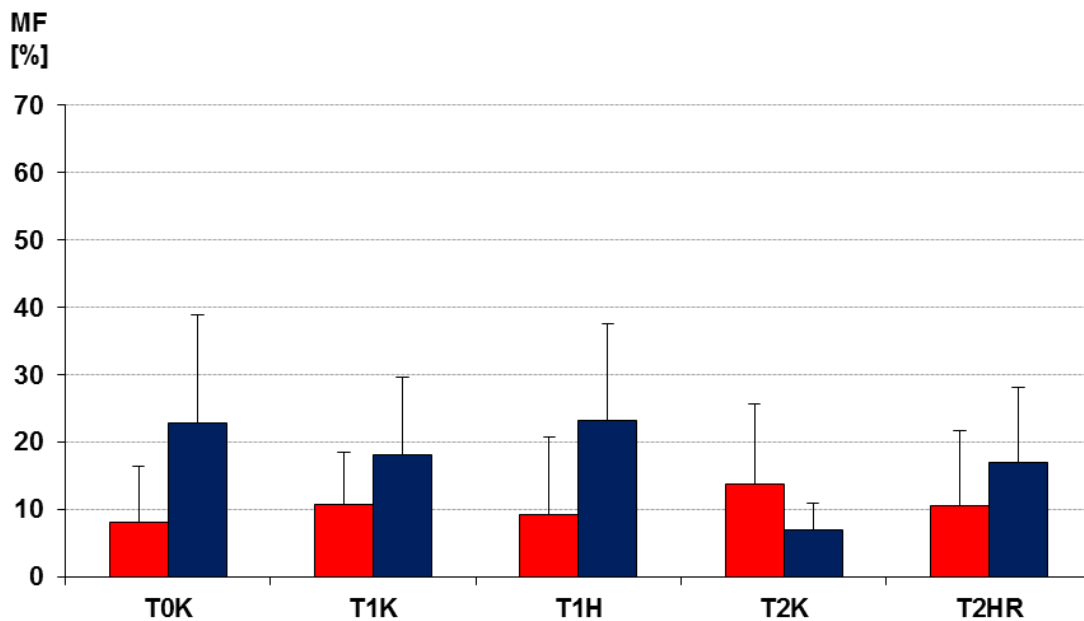


Abbildung 38: Vergleich der MFDR in den DF- und NHDF-CK

Prozentualer Anteil der MF von allen Fibroblasten in den DF- (■, n=8) und NHDF-CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

4.5 Apoptose: Mikronuklei

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnten apoptotische Zellen durch den Nachweis von Mikronuklei detektiert werden und die Apoptoserate für den jeweiligen Zelltyp bestimmt werden. Eine Zelle wurde als apoptotisch angesehen, wenn mind. drei Kerne vorhanden waren.

4.5.1 Fibroblasten

4.5.1.1 DF-Kulturen

Die Apoptoserate der Fibroblasten in den DF-MK betrug an Tag 0 sowie nach 24 h bzw. 48 h Normoxie weniger als 0,2% (siehe Abb. 39). Beim Vergleich der Normoxie-Kulturen mit den Hypoxie-Kulturen zeigten sich signifikante Unterschiede mit einem Anstieg der Apoptoserate nach 24 h Hypoxie auf 8% und einer Apoptoserate von 4% nach anschließender Reoxygenierung.

In den DF-CK lag die Apoptoserate der Fibroblasten an T0K, T1K und T2K unter 0,4%. Nach 24 h Hypoxie war die Apoptoserate signifikant auf 4% erhöht. Auch nach 24-stündiger Reoxygenierung zeigte sich eine signifikant erhöhte Rate apoptotischer Fibroblasten (3%) im Vergleich zu T2K.

Sowohl in den MK als auch in den CK zeigte sich eine ähnliche Reaktion der Fibroblasten auf Hypoxie mit dem signifikanten Anstieg der Apoptoserate. Dabei fiel die Apoptoserate der DF bei Co-Kultivierung mit HDMEC in den Hypoxie-Kulturen tendenziell geringer aus als in MK.

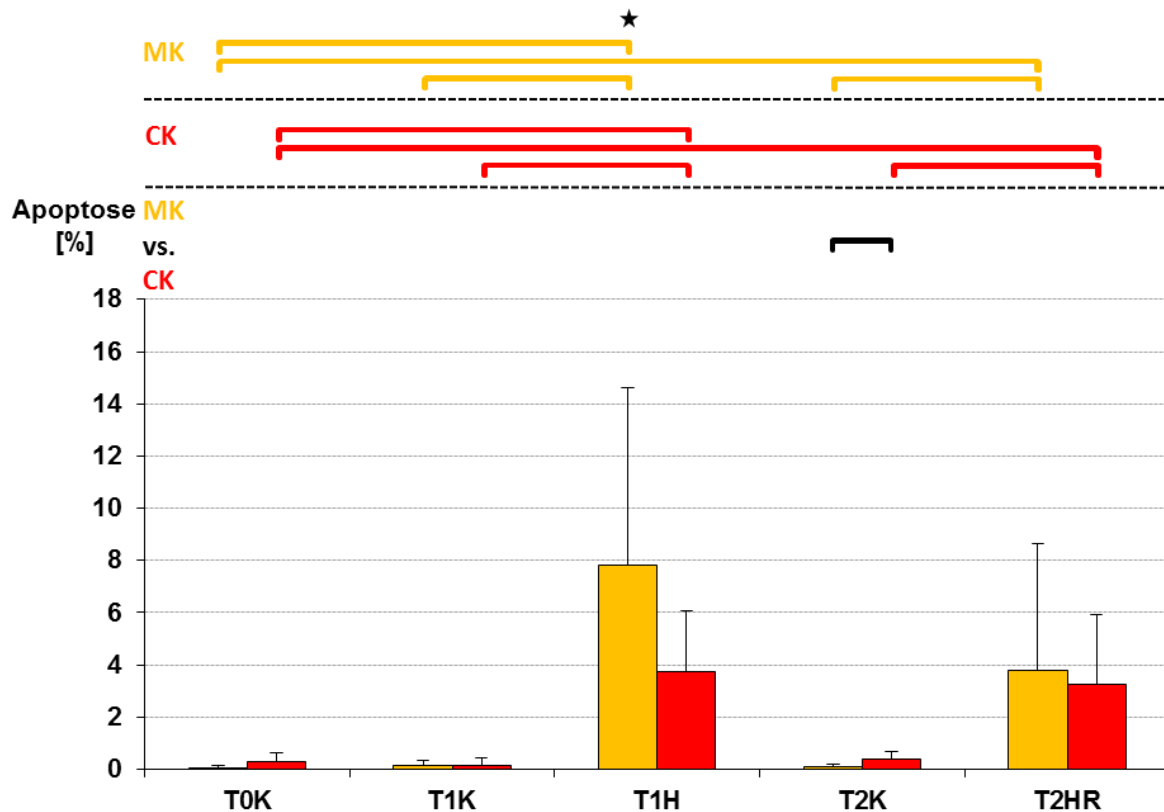


Abbildung 39: Apoptoserate der DF in MK und CK

Prozentualer Anteil der apoptotischen Fibroblasten von allen Fibroblasten in den DF-MK (■, n=8) und -CK (■, n=8) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

4.5.1.2 NHDF-Kulturen

In den NHDF-MK fand sich an Tag 0 sowie nach 24 h und 48 h Normoxie eine Apoptoserate von weniger als 0,1% (siehe Abb. 40). Nach 24 h Hypoxie stieg der Anteil der apoptotischen Fibroblasten signifikant auf 14% an, um sich nach anschließender Reoxygenierung auf 7% zu halbieren.

Die Apoptoserate der Fibroblasten in den NHDF-CK betrug an Tag 0 sowie nach 24 h und 48 h Normoxie weniger als 0,2%. Nach 24 h Hypoxie stieg die Rate apoptotischer Fibroblasten signifikant auf 12% an und zeigte sich nach 24 h Reoxygenierung tendenziell rückläufig (9%).

Die Fibroblasten in MK und CK wiesen ein ähnliches Verhalten auf, mit dem Anstieg der Apoptoserate als Folge von Hypoxie. Eine anschließende Reoxygenierung führte zu einer Abnahme der Apoptoserate, die jedoch nur in den MK signifikant ausfiel.

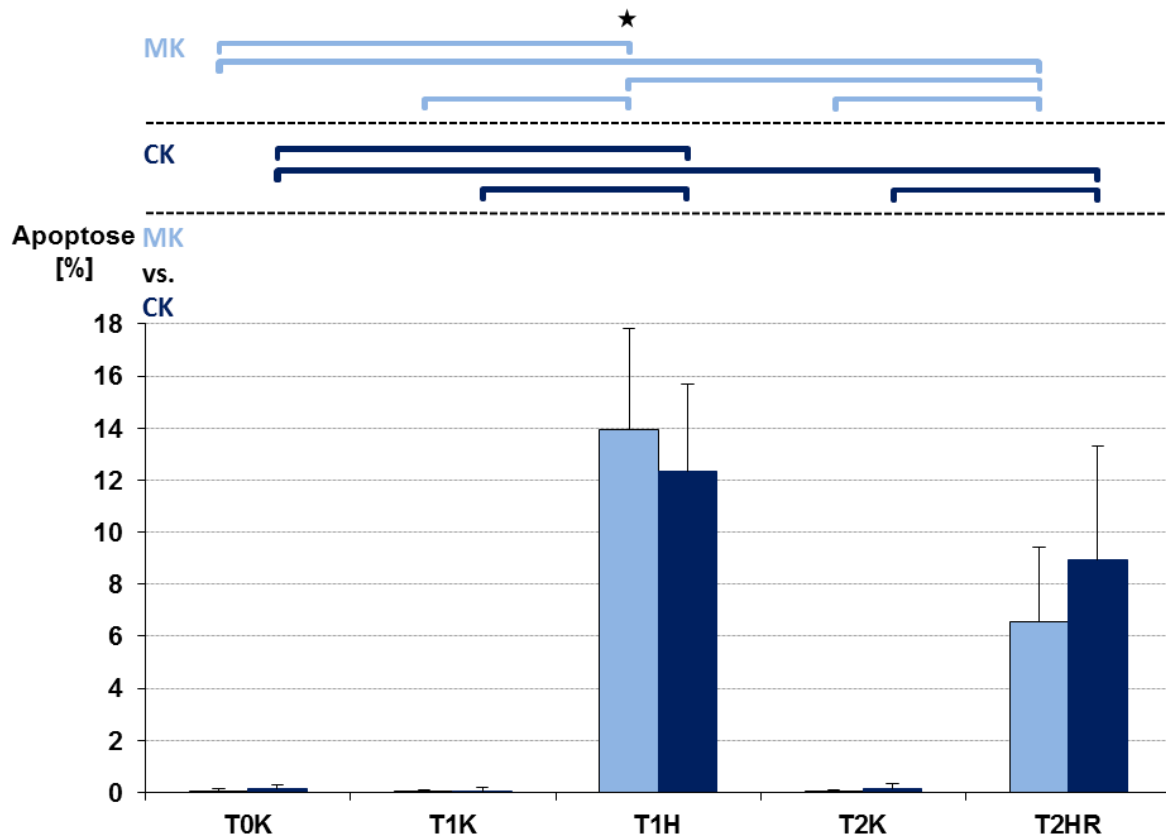


Abbildung 40: Apoptoserate der NHDF in MK und CK

Prozentualer Anteil der apoptotischen Fibroblasten von allen Fibroblasten in den NHDF-MK (■, n=4) und -CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

4.5.1.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen

In allen Kulturen kam es nach 24 h Hypoxie zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate der Fibroblasten im Vergleich zur Normoxie (siehe Abb. 39 und 40). Die Abnahme der Apoptoserate nach anschließender Reoxygenierung war nur in den NHDF-MK signifikant.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den DF- und den NHDF-MK (siehe Abb. 41). Beim Vergleich der DF- und NHDF-CK fanden sich in den Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR) signifikant geringere Apoptoseraten der DF gegenüber den NHDF (siehe Abb. 42). Die tendenziell geringsten Apoptoseraten der Fibroblasten sowohl nach 24 h Hypoxie als auch nach anschließender Reoxygenierung fanden sich unter Beteiligung der HDMEC in den DF-CK.

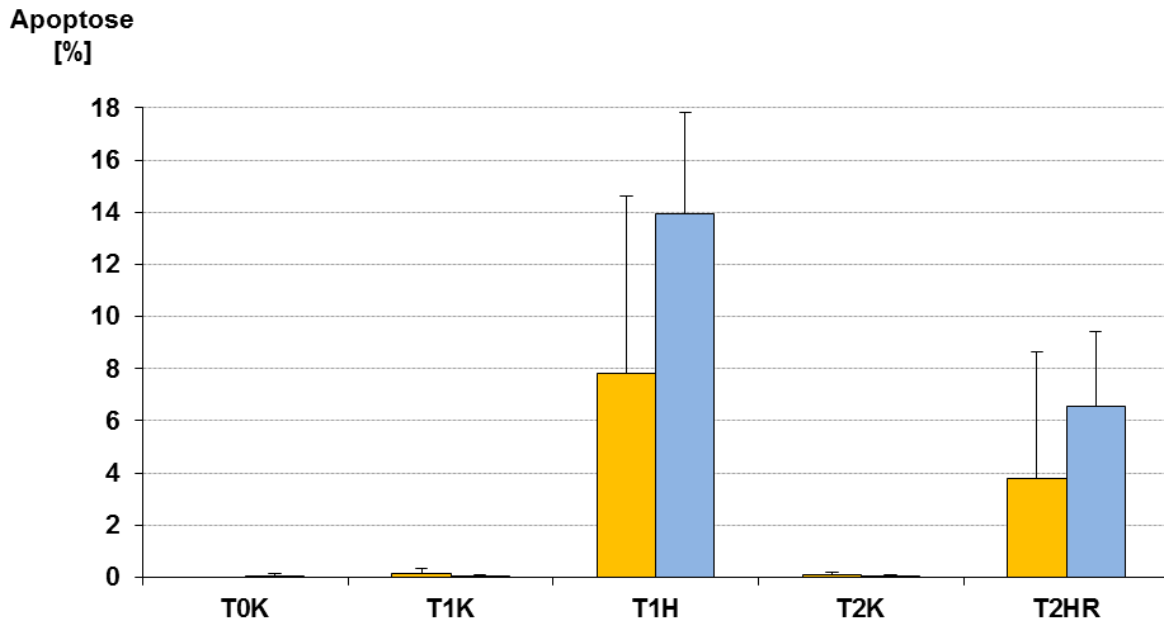


Abbildung 41: Vergleich der Apoptoserate der Fibroblasten in den DF- und NHDF-MK

Prozentualer Anteil der apoptotischen Fibroblasten von allen Fibroblasten in den DF- (■, n=8) und NHDF-MK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

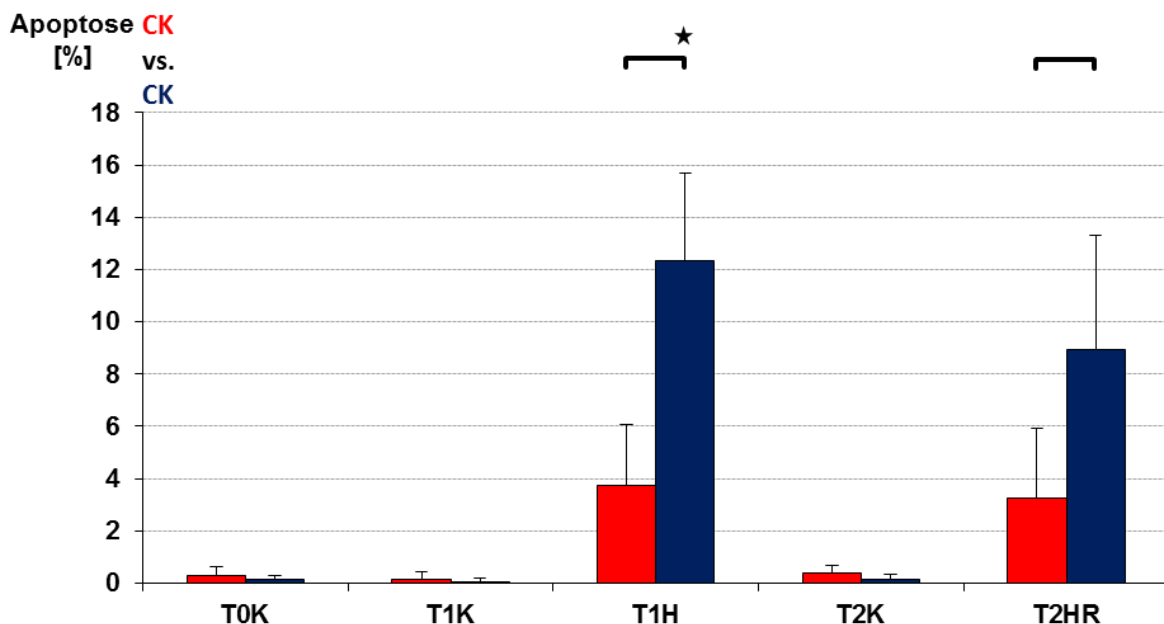


Abbildung 42: Vergleich der Apoptoserate der Fibroblasten in den DF- und NHDF-CK

Prozentualer Anteil der apoptotischen Fibroblasten von allen Fibroblasten in den DF- (■, n=8) und NHDF-CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

4.5.2 Endothelzellen

An T0K, T1K und T2K fand sich in den HDMEC-MK eine Apoptoserate von 0% (siehe Abb. 43). Nach 24 h Hypoxie bzw. anschließender Reoxygenierung lag die Apoptoserate der HDMEC bei 0,1% bzw. 0,2%. Auch bei Co-Kultivierung der HDMEC mit DF zeigte sich an sämtlichen Versuchstagen eine sehr geringe Apoptoserate der HDMEC bis max. 0,5% nach 24 h Hypoxie. Signifikante Unterschiede zwischen Normoxie-Kulturen und Hypoxie-Kulturen ergaben sich dementsprechend nicht. Die Apoptoserate der HDMEC in den NHDF-CK lag an allen Versuchstagen unter 0,4%, ohne dass sich signifikante Unterschiede zwischen Normoxie- und Hypoxie-Kulturen ergaben.

Beim Vergleich der Apoptoseraten der HDMEC in den DF- und NHDF-CK ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Co-Kultivierung der HDMEC mit DF oder NHDF führte nicht zu einer signifikanten Zunahme der Apoptoserate der HDMEC im Vergleich zur Mono-Kultivierung von HDMEC. Eine 24-stündige Hypoxie schien auf die HDMEC weder bei Mono- noch Co-Kultivierung mit DF bzw. NHDF einen Einfluss zu haben. Dies steht im Gegensatz zu der Apoptoserate der DF und NHDF, die in den Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR) einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate gegenüber den Normoxie-Kulturen (T1K, T2K) aufwiesen (siehe Abb. 39 und 40).

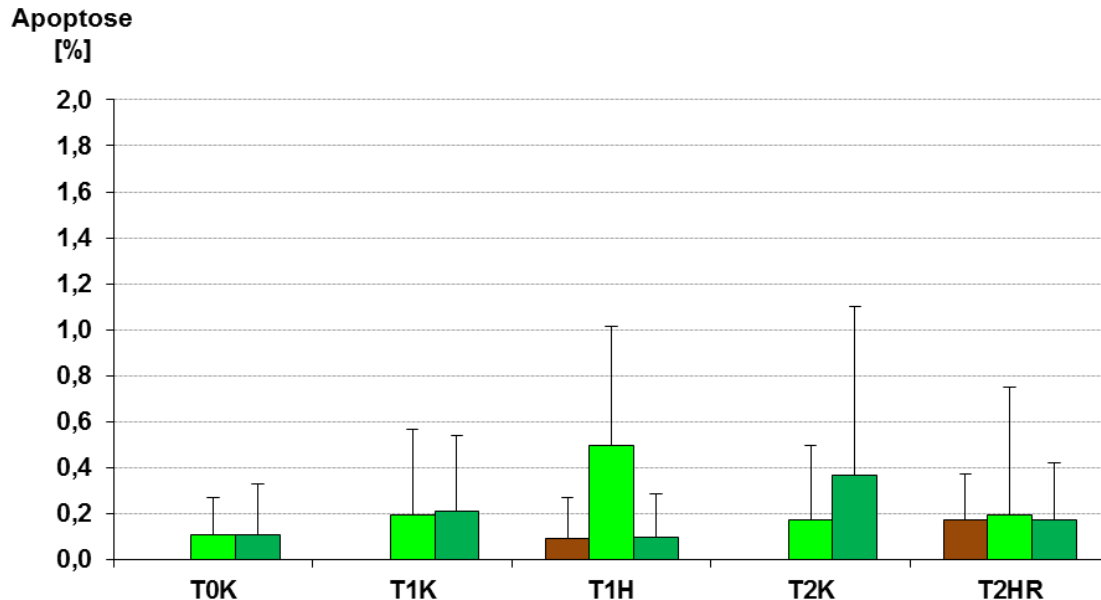


Abbildung 43: Apoptoserate der HDMEC in MK und CK

Prozentualer Anteil der apoptotischen HDMEC in MK (■, n=4) sowie in den DF- (■, n=8) und NHDF-CK (■, n=4) zum Zeitpunkt 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-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

4.6 Apoptose: Annexin V / 7-AAD

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde in ausgewählten Proben (T1K, T1H) der Einfluss der Hypoxie auf die Apoptoserate untersucht. Die Anwendung des Phosphatidylserin bindenden Proteins Annexin V und des Avitalfarbstoffs 7-AAD ermöglichte die Bestimmung der Rate frühapoptotischer Zellen. Zur Differenzierung zwischen Fibroblasten und Endothelzellen in CK diente PECAM-1.

4.6.1 Fibroblasten

4.6.1.1 DF-Kulturen

Der Anteil frühapoptotischer Fibroblasten in den DF-MK betrug nach 24 h Normoxie 4% und nach 24 h Hypoxie 6% (siehe Abb. 44). In den DF-CK lag die Rate frühapoptotischer Fibroblasten nach 24 h Normoxie bei 5% und nach 24 h Hypoxie bei 7%.

Beim Vergleich der Rate frühapoptotischer DF bei Mono- und Co-Kultivierung zeigte sich eine tendenziell höhere Apoptoserate in den CK sowohl nach 24 h Normoxie als auch nach 24 h Hypoxie. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht.

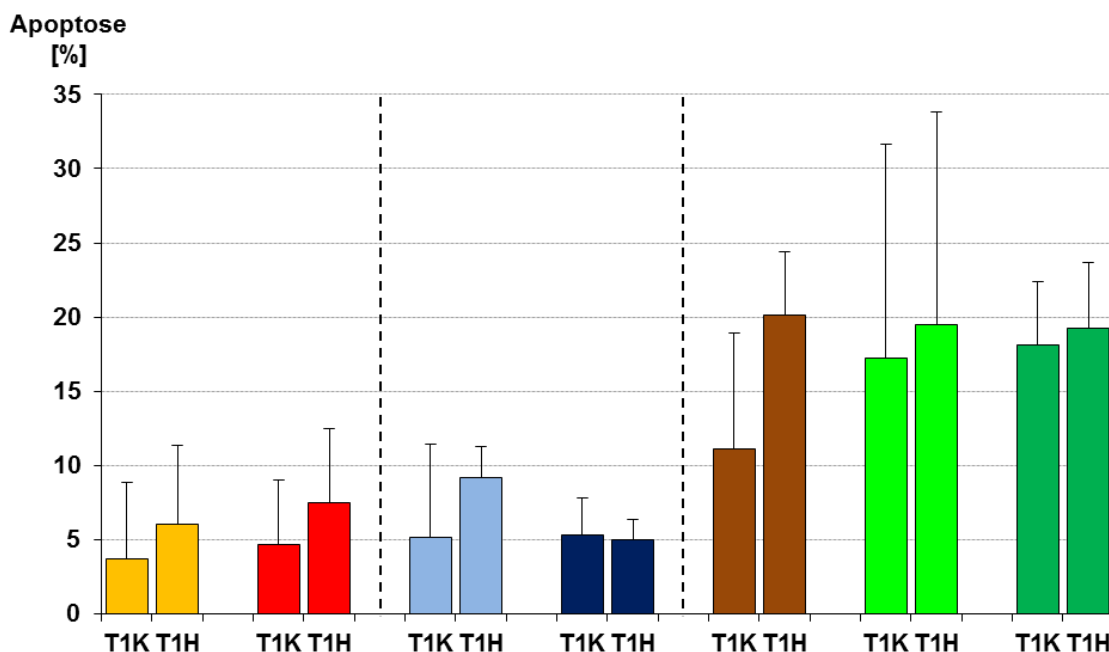


Abbildung 44: Anteil frühapoptotischer Fibroblasten und HDMEC in MK und CK

Prozentualer Anteil der frühapoptotischen Fibroblasten von allen Fibroblasten in den DF-MK (■, n=3) und -CK (■, n=3), in den NHDF-MK (■, n=4) und -CK (■, n=4) und der Anteil frühapoptotischer HDMEC in MK (■, n=4) sowie in den DF- (■, n=3) und NHDF-CK (■, n=4) nach 24 h Normoxie (T1K) bzw. 24 h Hypoxie (T1H). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

4.6.1.2 NHDF-Kulturen

In den NHDF-MK war der Anteil frühapoptotischer Fibroblasten nach 24 h Hypoxie (9%) gegenüber der Rate frühapoptotischer Fibroblasten nach 24 h Normoxie (5%) tendenziell erhöht (siehe Abb. 44). Bei Co-Kultivierung der NHDF mit HDMEC konnte kein Einfluss der Hypoxie auf die Rate frühapoptotischer Fibroblasten festgestellt werden. So blieb der Anteil frühapoptotischer Fibroblasten nach 24 h Normoxie bzw. 24 h Hypoxie stabil bei 5%. NHDF in MK und CK zeigten nach 24 h Normoxie eine identische Rate frühapoptotischer Fibroblasten, die nach 24 h Hypoxie bei Co-Kultivierung mit HDMEC tendenziell geringer ausfiel als in MK.

4.6.1.3 DF-Kulturen vs. NHDF-Kulturen

Die Rate frühapoptotischer DF bzw. NHDF in MK betrug nach 24 h Normoxie 4% bzw. 5% und war nach 24 h Hypoxie tendenziell auf 6% bzw. 9% erhöht (siehe Abb. 44). Die DF-CK unterschieden sich von den NHDF-CK mit einer Rate frühapoptotischer Fibroblasten von jeweils 5 % nach 24 h Normoxie nicht. Nach 24 h Hypoxie war der Anteil frühapoptotischer Fibroblasten in den DF-CK (7%) gegenüber den NHDF-CK (5%) tendenziell erhöht. Signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht. Mit Ausnahme der NHDF-CK kam es in allen Kulturen zu einem tendenziellen Anstieg der Rate frühapoptotischer Fibroblasten nach Hypoxie im Vergleich zur Normoxie.

4.6.2 Endothelzellen

Der Anteil frühapoptotischer HDMEC in MK zeigte sich nach 24 h Hypoxie (20%) gegenüber der 24-stündigen Normoxie (11%) tendenziell erhöht (siehe Abb. 44). Bei Co-Kultivierung der HDMEC mit DF lag die Rate frühapoptotischer HDMEC nach 24 h Normoxie bei 17% und nach 24 h Hypoxie bei 19%. Auch in den NHDF-CK ergab sich nur ein tendenzieller Unterschied der Rate frühapoptotischer HDMEC zwischen Normoxie (18%) und Hypoxie (19%).

Der Vergleich der Raten frühapoptotischer HDMEC bei Co-Kultivierung mit DF bzw. NHDF ergab ebenfalls keine Unterschiede. Sowohl bei Mono- als auch Co-Kultivierung war der Anteil frühapoptotischer HDMEC nach Hypoxie gegenüber der Normoxie tendenziell erhöht.

4.7 Apoptose: Mikronuklei vs. Annexin V / 7-AAD

Zur Quantifizierung der Apoptose erfolgte die Anwendung zweier unabhängiger Methoden. Zum einen wurde die Apoptose mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie anhand der Ausbildung von Mikronuklei quantifiziert. Durch die Verwendung des Fluorochroms DAPI konnte der Kernzerfall und die Ausbildung von Mikronuklei sichtbar gemacht werden. Eine Unterscheidung zwischen Fibroblasten und Endothelzellen in CK fand mittels Färbung von vWF statt.

Des Weiteren fand die Durchflusszytometrie in ausgewählten Proben (T1K, T1H) Anwendung. Dieses Verfahren ermöglicht durch den Einsatz des fluoreszenzmarkierten Proteins Annexin V und 7-AAD die Quantifizierung frühapoptotischer Zellen. Die Unterscheidung zwischen Fibroblasten und Endothelzellen in CK fand durch die Markierung der HDMEC mit PECAM-1 statt.

4.7.1 Fibroblasten

Beim Vergleich der Methoden der Apoptosedetektion ergaben sich deutliche Unterschiede in den Ergebnissen (siehe Abb. 45). So zeigten sich nach 24 h Normoxie in allen Kulturen erhöhte Raten frühapoptotischer Fibroblasten in der Durchflusszytometrie gegenüber der Apoptosedetektion mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie, mit signifikanten Unterschieden in den DF-CK sowie in den NHDF-MK und -CK.

Dagegen zeigten sich nach 24 h Hypoxie erhöhte Raten apoptotischer Fibroblasten anhand der mikroskopischen Apoptosebestimmung in den DF-MK sowie in den NHDF-MK und -CK im Gegensatz zur FACS-Analyse. Signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nur in den NHDF-CK. Ausschließlich in den DF-CK war die Rate frühapoptotischer Fibroblasten gegenüber der Rate apoptotischer Fibroblasten tendenziell erhöht.

Die anhand von Mikronuklei quantifizierte Apoptoserate der DF bzw. NHDF lag nach 24 h Normoxie in allen Kulturen bei maximal 0,1% und nahm nach 24 h Hypoxie signifikant zu (siehe Abb. 39, 40 und 45). Dagegen zeigte sich in der Durchflusszytometrie nach 24 h Normoxie in sämtlichen Kulturen eine stabile Rate frühapoptotischer Fibroblasten zwischen 4% und 5%. Nach 24 h Hypoxie war die Rate frühapoptotischer Fibroblasten in den DF-MK und -CK sowie den NHDF-MK gegenüber der Normoxie tendenziell erhöht und zeigte sich in den NHDF-CK stabil bei 5% (siehe Abb. 44 und 45).

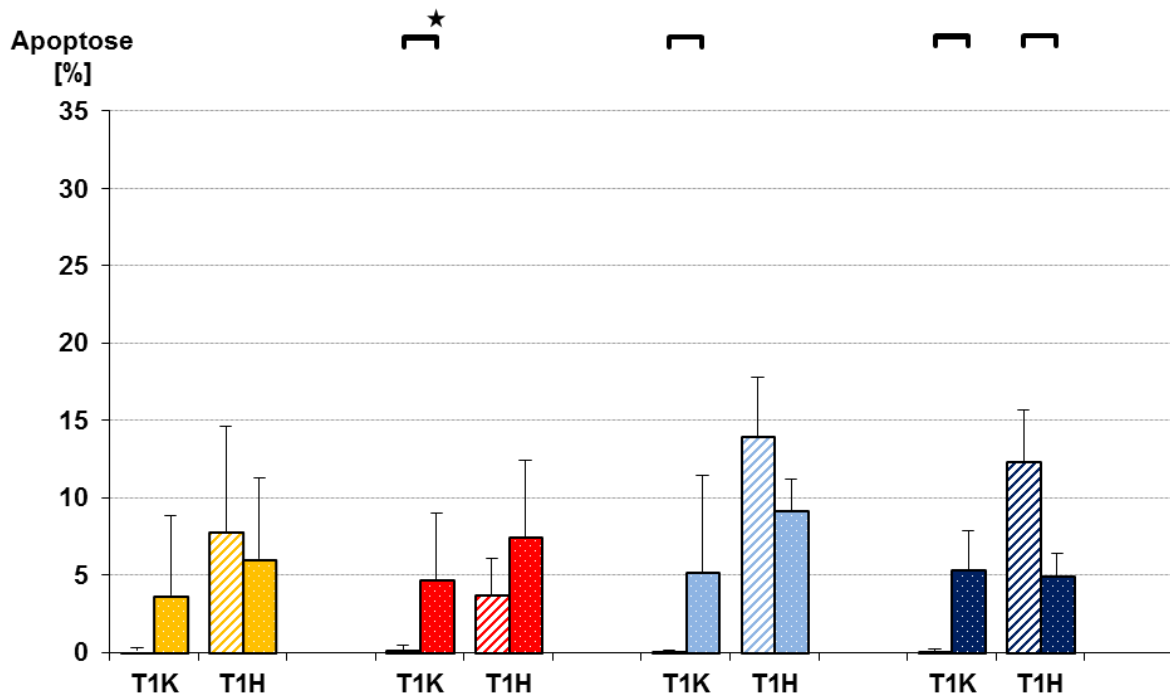


Abbildung 45: Vergleich der Rate apoptotischer und frühapoptotischer Fibroblasten in den MK und CK von DF bzw. NHDF

Vergleichende Darstellung der Rate apoptotischer Fibroblasten in den DF-MK (■, n=8) und -CK (■, n=8) sowie in den NHDF-MK (■, n=4) und -CK (■, n=4) mit der Rate frühapoptotischer Fibroblasten in den DF-MK (■, n=3) und -CK (■, n=3) sowie in den NHDF-MK (■, n=4) und -CK (■, n=4) nach 24 h Normoxie (T1K) bzw. 24 h Hypoxie (T1H). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

4.7.2 Endothelzellen

Die Rate apoptotischer HDMEC an T1K war mit 0% in MK signifikant niedriger als die Rate frühapoptotischer HDMEC (11%; siehe Abb. 46). Auch in den DF- bzw. NHDF-CK war die Rate apoptotischer HDMEC an T1K mit jeweils 0,2% signifikant niedriger als die Rate frühapoptotischer HDMEC (17% bzw. 18%).

Nach 24 h Hypoxie war die Rate apoptotischer HDMEC mit 0,1% in MK signifikant niedriger als die Rate frühapoptotischer HDMEC (20%). Die Rate apoptotischer HDMEC an T1H war mit 0,5% bzw. 0,1% in den DF- bzw. NHDF-CK signifikant niedriger als die Rate frühapoptotischer HDMEC mit jeweils 19%.

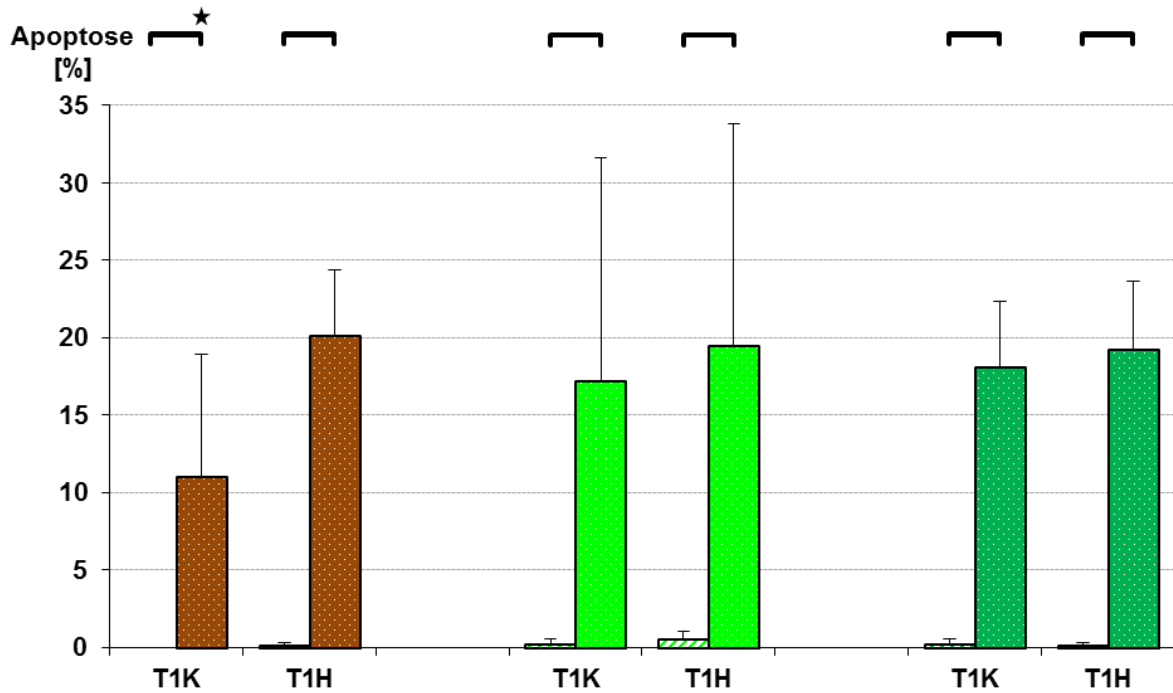


Abbildung 46: Vergleich der Rate apoptotischer und frühapoptotischer HDMEC in MK und CK

Vergleichende Darstellung der Rate apoptotischer HDMEC in MK (■, n=4) sowie in den DF- (■, n=8) und NHDF-CK (■, n=4) mit der Rate frühapoptotischer HDMEC in MK (■, n=4) sowie in den DF- (■, n=3) und NHDF-CK (■, n=4) nach 24 h Normoxie (T1K) bzw. 24 h Hypoxie (T1H). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p \leq 0,05$.

4.8 PDGF AA-Freisetzung

In der Entstehung der Palmarfibromatose wird vor allem die Interaktion von 2 Zelltypen diskutiert: Endothelzellen (Comtet & Bourne-Branchu 1986) und Fibroblasten (Brenner & Rayan 2003). Die Freisetzung von PDGF konnte sowohl aus Fibroblasten (Terek et al. 1995) bzw. DF (Alman et al. 1996) als auch Endothelzellen (Collins et al. 1987) nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung einer spezifischen PDGF AA-Freisetzung bei Mono- und Co-Kultivierung von HDMEC und DF bzw. NHDF wurde ein PDGF AA-ELISA verwendet.

Weder in den MK von DF noch in den MK von NHDF fand eine detektierbare Freisetzung von PDGF AA an den jeweiligen Versuchstagen statt. Auch nach 24 h Hypoxie bzw. anschließender Reoxygenierung war kein Nachweis von PDGF AA im Zellkulturüberstand möglich.

Im Gegensatz zu den MK von DF und NHDF war im Zellkulturüberstand der HDMEC in MK sowie in den CK mit DF bzw. NHDF PDGF AA nachweisbar (siehe Abb. 47). Die höchste Konzentration von PDGF AA im Mediumüberstand der HDMEC-MK wurde an Tag 0 (0,32 fg/Zelle) detektiert. Nach 24 h bzw. 48 h Normoxie sank die Konzentration von PDGF AA im Mediumüberstand signifikant auf 0,16 fg/Zelle bzw. 0,18 fg/Zelle. Die PDGF AA-Konzentration in den Hypoxie-Kulturen (T1H: 0,26 fg/Zelle, T2HR: 0,31 fg/Zelle) war gegenüber den Normoxie-Kulturen (T1K, T2K) deutlich erhöht, mit einem signifikanten Unterschied an Tag 2.

Bei Co-Kultivierung von HDMEC mit DF lag die gemessene PDGF AA-Konzentration an Tag 0 bei 0,13 fg/Zelle. Nach 24 h Normoxie fiel die PDGF AA-Konzentration tendenziell auf 0,09 fg/Zelle ab, stieg jedoch nach 48 h Normoxie auf 0,21 fg/Zelle an. Nach 24 h Hypoxie lag die gemessene PDGF AA-Konzentration im Mediumüberstand bei 0,15 fg/Zelle und war nach anschließender Reoxygenierung tendenziell auf 0,42 fg/Zelle erhöht. Es zeigte sich die Tendenz, dass die PDGF AA-Konzentration in den Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR) gegenüber den Normoxie-Kulturen (T1K, T2K) erhöht war.

Bei Co-Kultivierung der HDMEC mit NHDF ergaben sich die niedrigsten noch messbaren PDGF AA-Konzentrationen im Mediumüberstand. An Tag 0 betrug die PDGF AA-Konzentration 0,07 fg/Zelle und zeigte sich nach 24 h bzw. 48 h Normoxie mit 0,03 fg/Zelle bzw. 0,05 fg/Zelle fast unverändert. Nach 24 h Hypoxie und auch nach anschließender Reoxygenierung war kein PDGF AA im Mediumüberstand mehr detektierbar.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der PDGF AA-Konzentrationen der HDMEC-MK mit denjenigen der DF-CK. Sowohl die HDMEC-MK als auch die DF-CK wiesen jedoch nach 24 h Hypoxie bzw. nach anschließender Reoxygenierung eine tendenziell erhöhte PDGF AA-Konzentration gegenüber den

Normoxie-Kulturen an Tag 1 und 2 auf, die jedoch nur in den HDMEC-MK an Tag 2 signifikant ausfiel.

Die PDGF AA-Konzentrationen der HDMEC-MK und DF-CK waren an allen Versuchstagen im Vergleich zu denjenigen der NHDF-CK tendenziell erhöht. Während es in den HDMEC-MK und DF-CK zu einem tendenziellen Anstieg der PDGF AA-Konzentration in den Hypoxie-Kulturen gegenüber den Normoxie-Kulturen kam, war in den NHDF-CK an T1H und T2HR kein PDGF AA mehr nachweisbar.

Inwieweit die tendenziell erhöhte PDGF AA-Konzentration in den DF-CK im Vergleich zu den NHDF-CK auf einer vermehrten PDGF AA-Freisetzung beruht, oder ob diese auf das Fehlen des PDGF-alpha-Rezeptors (PDGFR α) zurückzuführen ist, kann diskutiert werden.

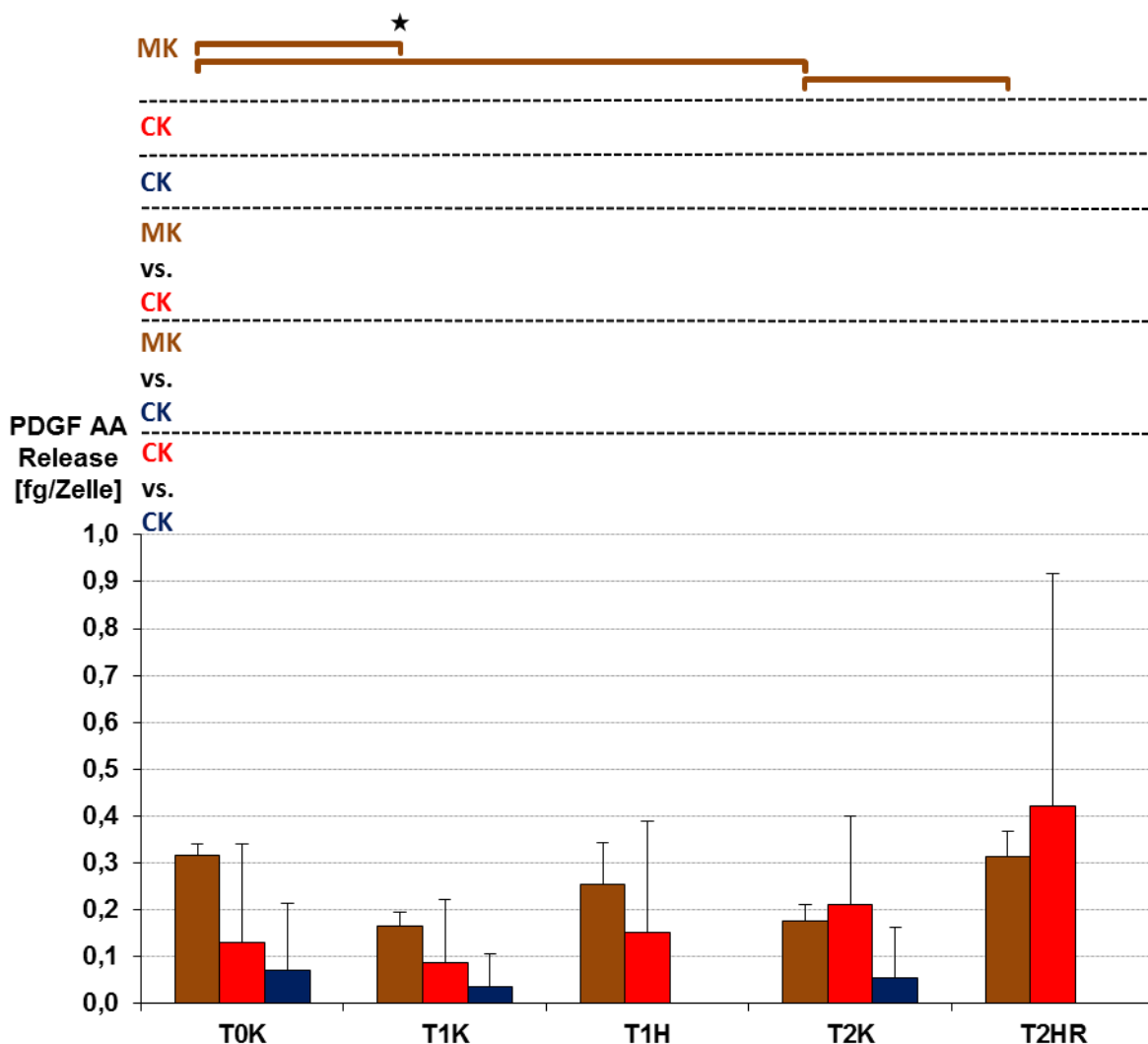


Abbildung 47: PDGF AA-Konzentration in den Zellkulturüberständen der HDMEC in MK und CK
 Dargestellt ist die PDGF AA-Konzentration im Zellkulturüberstand der MK von HDMEC (■, n=4) sowie der CK mit DF (■, n=6) bzw. NHDF (■, n=4) zum Zeitpunkt 0 h (T0K), nach 24 h Normoxie (T1K), nach 24 h Hypoxie (T1H), nach 48 h Normoxie (T2K) und nach 24 h Hypoxie mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung (T2HR). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. *p ≤ 0,05.

4.9 Zytokine im Multiplex Immunoassay

Da verschiedene Zytokine an der Entstehung des M. Dupuytren beteiligt zu sein scheinen, wurde in dieser Arbeit überprüft, ob DF ein spezifisches Muster des Zytokinrelease zeigen. DF in MK setzten nach 24 h Normoxie insgesamt 21 unterschiedliche Zytokine frei (siehe Abb. 48). Im Mittel setzten DF GM-CSF (9,26 fg/Zelle), IL-6 (7,48 fg/Zelle) und VEGF (6,86 fg/Zelle) am stärksten frei.

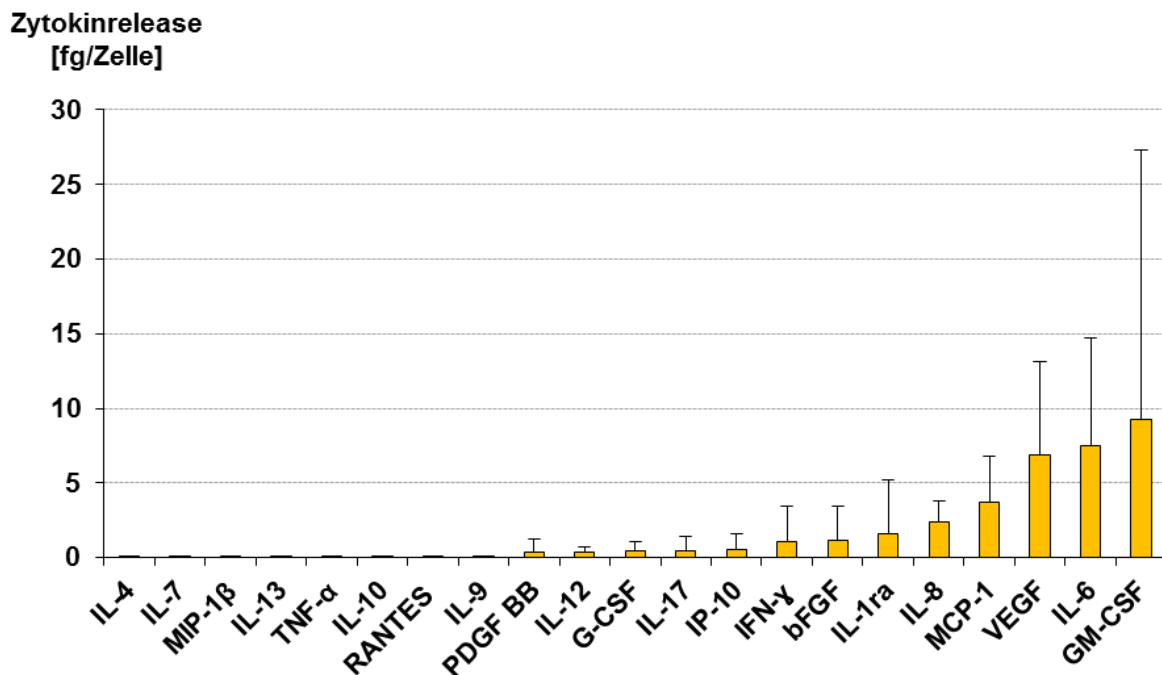


Abbildung 48: Darstellung des Zytokinrelease der DF in MK nach 24 h Normoxie

Zytokinrelease in die Zellkulturüberstände der DF-MK (■, n=8) nach 24 h Normoxie (T1K). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

5. Diskussion

5.1 Methoden

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der Co-Kultivierung von Fibroblasten aus M. Dupuytren zusammen mit HDMEC in einem Co-Kultur-Wounding-Modell. Unter Einbeziehung der Parameter Migration, Proliferation, myofibroblastoide Differenzierung, Apoptose und Zytokinrelease konnten Charakteristika der DF im Vergleich zu NHDF nach Normoxie und Hypoxie dargestellt werden. Ebenso wurde die Wirkung der Co-Kultivierung von DF bzw. NHDF mit HDMEC in Bezug auf die o.g. Parameter untersucht.

Die untersuchten Gewebeproben entstammen Patienten mit einem klinisch gesicherten M. Dupuytren ab einem Tubiana-Stadium II. Die Gewebeentnahme erfolgte einheitlich mittels partieller Fasziektomie. Eine Unterscheidung in Knoten und Stränge bei der Entnahme erfolgte jedoch nicht. Im Hinblick auf zukünftige Untersuchungen ist eine Differenzierung bei der Gewebeentnahme zwischen zellreichen Knoten und zellarmen Strängen sinnvoll. Durch eine mikroskopische Untersuchung könnte eine Auswahl der MF-reichen Knoten im Proliferationsstadium nach Luck erfolgen (Luck 1959; Otto 2004). Dadurch wäre eine bessere Vergleichbarkeit der gewonnenen Gewebeproben möglich.

Zur Darstellung der unterschiedlichen zellulären Reaktion von DF, NHDF und HDMEC sowohl in MK als auch in CK erfolgte die Anpassung eines etablierten Co-Kultur-Wounding-Modells (Oberringer et al. 2007). Das Co-Kultur-Modell ermöglichte das gemeinsame Kultivieren von DF bzw. NHDF mit HDMEC und die Analyse der Zellinteraktion sowie die Bestimmung des Zytokinrelease in den Zellkulturüberständen. Des Weiteren konnte mit Hilfe des In-vitro-Wundheilungsassays der Einfluss der Hypoxie bzw. anschließenden Reoxygenierung auf Migration, Proliferation, myofibroblastoide Differenzierung und Apoptose bei Mono- und Co-Kultivierung der verschiedenen Zelltypen aufgezeigt werden.

Die Zellexpansion orientierte sich an einem für die jeweiligen Zelltypen einheitlichen Schema, das bereits in einer vorangegangenen Arbeit in ähnlicher Form angewendet wurde (Schwarz et al. 2013). So erfolgte die Zellexpansion der DF und NHDF über einen Zeitraum von 14 Tagen und die der HDMEC über 8 Tage. Nach erfolgreicher Kultivierung wurden Zellen als MK oder CK auf Glasobjektträger überführt. Die adäquate Zelldichte an den unterschiedlichen Versuchstagen ermöglichte die Auswertung der Parameter Migration, Proliferation, MFDR, Apoptose und Zytokinrelease.

Das in dieser Arbeit verwendete Co-Kultur-Wounding-Modell ist geeignet, Zellinteraktionen unterschiedlicher Zelltypen *in vitro* zu untersuchen und bietet die Möglichkeit der parallelen Analyse mehrerer Parameter, auch mit Hilfe verschiedener Methoden. Die ausgewählten analytischen Parameter zeichnen sich ebenso wie die Nachweismethoden durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus.

Zur Erzeugung von Wunden *in vitro* stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Buisson et al. verwendeten Lauge, um Wunden im Zellrasen zu erzeugen (Buisson et al. 1996). Neben dem Einsatz mechanischer Hilfsmittel wie Rasierklingen (Bürk 1973) wurden auch Silikonspritzen (Watanabe et al. 1994) zur Erzeugung eines Wundspalts verwendet. In vorangegangenen Studien wurden unterschiedliche Pipettenspitzen verwendet, um Wunden in den Monolayer-Kulturen auf Glasobjektträgern zu erzeugen (Oberringer et al. 2007).

Bei der Entstehung der pathognomonischen Beugekontraktur des M. Dupuytren spielt der kontraktile Apparat der Zellen und die damit verbundene Migration gemäß der Gleit- und Verankerungs-Theorie eine entscheidende Rolle (Tomasek et al. 2002). Zur Messung der Zellmigration wurde an Tag 0 eine 1000 µl-Pipettenspitze über den Zellrasen geführt und so zwei Wundspalte erzeugt. Die Verwendung einer Pipettenspitze zur Erzeugung eines Wundspalts gewährleistete bereits in anderen Arbeiten eine vergleichbare Wundspaltbreite (Oberringer et al. 2007; Oberringer et al. 2008). Auch in dieser Arbeit zeigte sich eine homogene Breite des Wundspalts an Tag 0 mit einer relativ geringen Standardabweichung in den MK und CK von DF, NHDF und HDMEC. Die Verwendung einer 1000 µl-Pipettenspitze eignet sich zur Erzeugung eines qualitativ einheitlichen Wundspalts. Ein Vergleich der Migration der unterschiedlichen Zelltypen in MK und in CK war somit möglich. Der Wundspalt wurde über seine gesamte Länge fotografisch dokumentiert. Unter Zuhilfenahme der vom Programm AxioVision zur Verfügung gestellten Skalierung wurde entlang der 300 µm-Linie der weiteste Kernabstand gemessen. Die so gewonnenen Messergebnisse dienen der objektiven Dokumentation der Spaltbreite und des Wundschlusses im zeitlichen Verlauf.

Zur Bestimmung der Proliferation stehen verschiedene etablierte Methoden zur Verfügung, z.B. die Bestimmung des Mitoseindex (Linden et al. 1992). Da die Mitose im Zellzyklus einen kurzen Abschnitt einnimmt und die Dauer der Mitose bei unterschiedlichen Zelltypen variieren kann, bedingen bereits geringe Abweichungen der Anzahl mitotischer Zellen eine relevante Veränderung des Mitoseindex (Van Diest et al. 1998), daher fand diese Methode in dieser Arbeit keine Anwendung.

Eine alternative Möglichkeit der Ermittlung der Proliferationsrate ist die Verwendung der Proliferationsmarker ³H-Thymidin oder 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU). Seit Mitte des 20. Jahrhunderts gilt die Proliferationsmessung unter Verwendung von ³H-Thymidin als der

Goldstandard. Die Nachteile ergeben sich allerdings aus der Radioaktivität des Wasserstoffisotops, den damit verbundenen Kosten für die Strahlensicherheit sowie aus der Auswirkung auf die Empfängerzellen und den lang andauernden Belichtungsphasen der Fotoemulsion (Hall & Levison 1990). Einen Vorteil demgegenüber bietet das BrdU. Zum Nachweis des in die DNA eingebauten BrdU kann ein Zellproliferations-BrdU-ELISA verwendet werden (Brenzel 2010). Eine weitere Option zur Bestimmung der Zellproliferation liefert der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)-Zellproliferations-Assay (Mosmann 1983).

Da in dieser Arbeit die parallele Analyse der Parameter Migration, Proliferation, MFDR, Apoptose und Zytokinrelease erfolgen sollte, wurde auf eine Kombination mit einer der o.g. alternativen Nachweisverfahren mit hohem technischen Aufwand verzichtet.

Zur Quantifizierung der Zellproliferation zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen diente in der vorliegenden Arbeit neben der Auswertung der Zelldichte das nukleäre Antigen Ki-67/MIB-1. Der Proliferationsmarker wird von Zellen während der Interphase und M-Phase exprimiert. Zellen, welche sich in der G₀-Phase befinden, exprimieren kein Ki-67/MIB-1 (Scholzen & Gerdes 2000). Die Verwendung von Ki-67/MIB-1 dient somit als valider Marker der Zellproliferation und der Quantifizierung der Proliferationsrate der verschiedenen Zelltypen. Die Ermittlung der Proliferationsrate in dieser Arbeit erfolgte durch das Auswerten von mind. 800 Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Die gute Antigendetektion unter Anwendung von Primär- und Sekundärantikörpern resultierte in einer optimalen Färbequalität und gewährleistete die Unterscheidung proliferierender von ruhenden Zellen. Ein alternativer Proliferationsmarker zu Ki-67/MIB-1 ist das Proliferating Cell Nuclear Antigen, ein nukleäres Protein welches während des gesamten Zellzyklus mit Ausnahme der G₀-Phase exprimiert wird (Dietrich 1993; Alison 1995).

Die Zusammensetzung des Zytoskeletts von MF variiert stark (Skalli et al. 1989). So erscheinen Desmin und Vimentin zur Differenzierung zwischen Fibroblasten und MF als ungeeignet (Skalli et al. 1989; Gabbiani 1992). Der kontraktile Apparat von MF besteht aus α -SMA und Non-Smooth-Muscle-Myosin (Rayan & Tomasek 1994; Hinz et al. 2001). Mit Hilfe von α -SMA erfolgte in Granulationsgewebe im Rahmen der Wundheilung sowie in verschiedenen fibrotischen Geweben der Nachweis von MF (Skalli et al. 1989; Darby et al. 1990; Gabbiani 1992). Da Fibroblasten und Proto-MF, aus denen die MF hervorgehen, kein α -SMA aufweisen, eignet sich α -SMA somit als sensitiver Marker zur Unterscheidung von Fibroblasten und MF (Serini & Gabbiani 1999; Tomasek et al. 2002). Skalli et al. zeigten, dass die Sensitivität in der Detektion von α -SMA-positiven Zellen mittels Immunfluoreszenz

gleichwertig mit biochemischen Untersuchungsmethoden wie der Gelelektrophorese oder dem ELISA ist (Skalli et al. 1986).

Zur Quantifizierung der Apoptose in dieser Arbeit fanden zwei verschiedene Methoden Anwendung. Durch die Verwendung des Fluorochroms DAPI, das in die DNA interkaliert, lassen sich die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellen (Kapuscinski 1990; Tanious et al. 1992; Krishan & Dandekar 2005; Banerjee & Pal 2008). Durch Fragmentierung des Zellkerns kommt es bei Apoptose zur Entstehung der Mikronuklei (Ganten & Ruckpaul 2008). Zellen mit mind. drei Kernen wurden als apoptotisch angesehen. Die Detektion der Mikronuklei zur Quantifizierung der Apoptoserate nimmt weiterhin einen hohen Stellenwert ein. So gibt die Ausbildung von Mikronuklei Aufschluss über die Strahlenempfindlichkeit von Tumoren (Bali 2008) oder dient der Beurteilung toxischer Agenzien (Otte 2004).

Die Bestimmung der Apoptose nach o.g. Kriterien wurde durch die Durchflusszytometrie um ein weiteres quantitatives Messverfahren an einem Teil der Proben erweitert. Unter Verwendung des fluoreszenzmarkierten Proteins Annexin V und des Farbstoffs 7-AAD war die Bestimmung des Anteils frühapoptotischer Zellen möglich (Vermes et al. 1995; Philpott et al. 1996; Balaji et al. 2013). Die Durchflusszytometrie stellt eine effektive und objektive Methode zur Bestimmung der Rate frühapoptotischer Zellen dar (Balaji et al. 2013). Die Wahl der am besten geeigneten Methode der Apoptosedetektion ist u.a. von dem vorliegenden Zellsystem abhängig. Da zur Quantifizierung der Apoptoserate mittels FACS die Zellen in Suspension vorliegen müssen, erfolgte eine mechanische Ablösung der Zellen von den Glasobjektträgern mit einem Zellschaber. Es musste auf eine enzymatische Ablösung adhärenter Zellen verzichtet werden, da die Enzymwirkung potentiell zu einer Destruktion der Zellmembran führen kann. Eine Unterscheidung spätapoptotischer Zellen von nekrotischen Zellen war mit Hilfe der Durchflusszytometrie allein unter Verwendung von 7-AAD nicht möglich. Durch den Verlust der Integrität der Zellmembran können auch nekrotische Zellen oder Zellen in einem späten Stadium der Apoptose Annexin V-positiv sein. Die Verwendung von 7-AAD diente in dieser Arbeit der Unterscheidung Annexin V-positiver, frühapoptotischer Zellen von Annexin V-positiven, jedoch spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen.

Als alternatives Messverfahren der Apoptosedetektion stehen enzymatische Nachweisverfahren wie der Lactatdehydrogenase-Zytotoxizitätstest zu Verfügung (Decker & Lohmann-Matthes 1988). Im Rahmen der Apoptose kommt es zur Ausbildung von DNA-Strangbrüchen (Oberhammer et al. 1993). Die Gelelektrophorese ermöglicht als biochemisches Nachweisverfahren der Apoptose die Darstellung dieser fragmentierten DNA (Carle et al. 1986). Da die o.g. alternativen Nachweistechiken mit dem Setup des In-vitro-Wundheilungsassays nicht kompatibel sind, wurden sie in dieser Studie nicht angewandt.

Bei der Differenzierung der MF spielen neben PDGF AA (Lindahl & Betsholtz 1998; Tomasek et al. 2002) unter anderem TGF β_1 (Petrov et al. 2002), bFGF (Alioto et al. 1994) und GM-CSF (Rubbia-Brandt et al. 1991) sowie weitere Zytokine eine wichtige Rolle. PDGF gilt neben Wachstumsfaktoren wie TGF β_1 und bFGF als wichtiger Stimulus der Fibroblastenproliferation (Brenner & Rayan 2003). Durch Akquise der Zellkulturüberstände ermittelten wir in dieser Studie die Menge von PDGF AA an den unterschiedlichen Versuchstagen mittels ELISA. Da in der Entstehung der palmaren Fibromatose jedoch eine Vielzahl verschiedener Zytokine beteiligt zu sein scheint, untersuchten wir zusätzlich, ob DF in Kultur auch andere Zytokine ausschütten. Im Rahmen einer Pilotstudie wurde die Freisetzung der Zytokine in die Zellkulturüberstände mit einem Multiplex Immunoassay bestimmt. Dieses Verfahren bietet den Vorteil der gleichzeitigen Analyse verschiedener Zytokine. Sowohl ELISA als auch Multiplex Immunoassay lagen in Form eines kommerziell erhältlichen Kits vor.

5.2 Ergebnisse

Migration

Ein signifikanter Unterschied der Zellmigration und des damit verbundenen Spaltschlusses zwischen DF- und NHDF-Kulturen fand sich nicht. Beide Zelltypen wiesen nach Mono- und Co-Kultivierung ein ähnliches Migrationsverhalten mit einem signifikanten Spaltschluss nach 24 h bzw. 48 h Normoxie auf. Hypoxie führte zu einer Hemmung der Migration beider Zelltypen, die durch eine anschließende Reoxygenierung wieder in Gang gesetzt wurde. Die hemmende Wirkung der Hypoxie auf die Zellmigration entspricht den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten (Oberringer et al. 2008).

Bei Co-Kultivierung der DF bzw. NHDF mit HDMEC ergaben sich keine Unterschiede der Zellmigration im Vergleich zur Mono-Kultivierung. Beim Vergleich der Spaltgröße der HDMEC-MK mit der Spaltgröße der DF- bzw. NHDF-CK zeigte sich in den HDMEC-MK an Tag 0 tendenziell die geringste Spaltbreite. Eine 24-stündige Hypoxie bewirkte auch bei den HDMEC in MK eine signifikante Hemmung des Spaltschlusses, was mit dem Ergebnis vorheriger Arbeiten übereinstimmt (Breit et al. 2011). Wir konnten aufzeigen, dass eine akute und starke Hypoxie, über einen Zeitraum von 24 h, zu einer signifikanten Hemmung der Zellmigration in MK und CK führt. Im Gegensatz zu den DF- bzw. NHDF-CK stagnierte die Spaltbreite jedoch nach 24 h Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung (T2HR) in den HDMEC-MK und war damit signifikant größer als in den CK. Dies lässt darauf schließen, dass der Zellschaden, ausgelöst durch eine 24-stündige Hypoxie, bei den HDMEC in MK zu groß war, als dass dieser durch eine anschließende Reoxygenierung ausgeglichen werden konnte. An dieser Stelle könnte sich ein protektiver Effekt der DF und NHDF auf HDMEC bei Co-Kultivierung gezeigt haben (Velazquez et al. 2002).

Proliferation

Auffallend war, dass die NHDF zu allen Untersuchungszeitpunkten und Bedingungen in MK und CK eine tendenziell höhere Proliferationsrate (Ki-67/MIB-1) aufwies als die DF. Diese Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen NHDF und DF könnte auf die tendenziell geringere Zelldichte in allen NHDF-Kulturen gegenüber den DF-Kulturen zurückzuführen sein. So weisen Fibroblasten eine erhöhte Proliferationsrate bei geringerer Zelldichte auf (Masur et al. 1996, Powell et al. 1999). Passend dazu zeigten DF und NHDF einen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate nach 24 h Normoxie und eine Stagnation nach 48 h Normoxie.

Hypoxie führte in den MK und CK von DF bzw. NHDF zu einem signifikanten Abfall der Proliferationsrate der DF und NHDF gegenüber der Proliferationsrate in den Normoxie-Kulturen. Nach anschließender Reoxygenierung zeigte sich eine signifikant gesteigerte Ki-67/MIB-1-Rate in allen Kulturen, die sich nicht mehr von der Proliferationsrate in den Normoxie-Kulturen an Tag 2 unterschied.

DF und auch NHDF zeigten in CK eine tendenziell geringere Proliferationsrate als in MK. Dies wäre durch die tendenziell höhere Zelldichte bei Co-Kultivierung und die damit verbundene mögliche Proliferationshemmung erklärbar (Masur et al. 1996, Powell et al. 1999). Dagegen zeigte sich ein signifikanter Abfall der Proliferationsrate (Ki-67/MIB-1) der HDMEC bei Co-Kultivierung zusammen mit DF bzw. NHDF im Vergleich zur Mono-Kultivierung von HDMEC. Gleichzeitig ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Zelldichte zwischen den HDMEC-MK und den CK zusammen mit DF bzw. NHDF. Die Hemmung der Proliferation von Endothelzellen z.B. bei Co-Kultivierung mit kardialen Fibroblasten (Zhao & Eghbali-Webb 2001) oder Perizyten (Orlidge & D'Amore 1987) konnte bereits in anderen Studien beobachtet werden. Als ursächlich für die Hemmung der Endothelzellproliferation könnte die direkte Zell-Zell-Interaktion bei Co-Kultivierung von unterschiedlichen Zelltypen angesehen werden (Orlidge & D'Amore 1987). Die HDMEC scheinen somit initial nicht von einer Co-Kultivierung mit DF oder NHDF zu profitieren.

Myofibroblasten-Differenzierungsrate

Im Hinblick auf die MFDR zeigten DF und NHDF in MK ein ähnliches Verhalten. Die MK wiesen nach Hypoxie bzw. anschließender Reoxygenierung eine tendenziell höhere MFDR auf als nach 24 h bzw. 48 h Normoxie. Ein ähnlicher Effekt der Hypoxie auf die Entstehung und Persistenz der MF konnte bereits in vorangegangenen Untersuchungen aufgezeigt werden (Breit et al. 2011). Bemerkenswert war die tendenziell höhere MFDR Mono- und Co-kultivierter NHDF im Vergleich zu DF. Eine Erklärung für die höhere MFDR in den NHDF-Kulturen wäre die tendenziell niedrigere Zelldichte in den NHDF-Kulturen gegenüber den DF-Kulturen. Masur et al. zeigten, dass Fibroblasten in vitro die Eigenschaft aufweisen, sich bei geringer Zelldichte verstärkt zu MF zu entwickeln (Masur et al. 1996). Eine hohe Zelldichte bedeutet hingegen einen Differenzierungsstopp (Masur et al. 1996; Powell et al. 1999). Erklärt wurde dieses Phänomen sowohl durch den Verlust der Zell-Zell-Interaktion als auch durch die Freisetzung von TGF β_1 (Assoian et al. 1983; Masur et al. 1996; Tomasek et al. 2002). TGF β_1 fördert die Synthese spezifischer Zellbestandteile, die für den differenzierten MF charakteristisch sind, wie Mikrofibrillenbündel aus α -SMA (Desmoulière et al. 1993; Vaughan et al. 2000; Hinz et al. 2001). TGF β_1 stimuliert die Produktion von Kollagen und die Differenzierung von α -SMA-negativen Fibroblasten zu α -SMA-positiven MF (Roberts et al. 1986; Petrov et al. 2002).

Konträr zu den DF-CK mit HDMEC fiel die MFDR in sämtlichen NHDF-Kulturen und den DF-MK über die Zeit hinweg stetig ab, wobei dieser Effekt unter dem Einfluss der Hypoxie bzw. Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung abgeschwächt erschien. Die Co-Kultivierung der NHDF mit HDMEC schien gegenüber den NHDF-MK keinen relevanten Einfluss auf die Differenzierung zu MF zu haben. Ausschließlich in den DF-CK zeigte sich an den unterschiedlichen Versuchstagen eine stabile MFDR. HDMEC könnten somit einerseits einen hemmenden Effekt auf die MF-Differenzierung bei Co-Kultivierung mit NHDF ausüben, andererseits bei Co-Kultivierung mit DF stabilisierend auf MF wirken. Die Ursache für die heterogene MFDR der DF und NHDF bei Kontakt mit Endothel könnte in ihrer unterschiedlichen Herkunft liegen. In Abhängigkeit ihrer Herkunft (Haut, subkutanes Bindegewebe, Herz, Lunge oder Leber) zeigen Fibroblasten eine unterschiedliche MF-Differenzierung nach experimenteller Hypoxie (Modarressi et al. 2010). Ebenso konnte die stabilisierende Wirkung der HDMEC auf MF bereits in anderen Untersuchungen gewonnen werden (Brenner & Rayan 2003). Die stabilisierende Wirkung der Endothelzellen auf die MFDR bei Co-Kultivierung mit DF sowohl nach Hypoxie als auch Normoxie und im zeitlichen Verlauf stellt einen wichtigen Unterschied zur Co-Kultivierung mit NHDF dar.

Apoptose

Die Bestimmung der Rate apoptotischer Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ergab an T0K, T1K und T2K keine Unterschiede zwischen DF und NHDF in MK bzw. CK. In allen Zellkulturen fanden sich nach Normoxie kaum apoptotische Zellen.

Sowohl DF als auch NHDF reagierten in MK und CK gleich mit dem signifikanten Anstieg der Apoptoserate nach Hypoxie und einer Abnahme nach anschließender Reoxygenierung. Als eindrucksvoll erwiesen sich die signifikant geringeren Apoptoseraten der DF in CK mit HDMEC nach Hypoxie bzw. anschließender Reoxygenierung gegenüber den NHDF-CK. Die signifikant niedrigere Apoptoserate der Fibroblasten bei Co-Kultivierung der DF mit HDMEC gegenüber den NHDF-CK könnte einerseits auf ihre tendenziell geringere Proliferationsrate zurückzuführen sein (Alberts et al. 2004). In Gesamtbetrachtung mit den Ergebnissen der Proliferationsrate wiesen DF in MK und CK eine tendenziell geringere Ki-67/MIB-1-Rate auf als NHDF. Da das nukleäre Antigen Ki-67/MIB-1 ausschließlich während der Zellzyklusphasen G1, S, G2 und M exprimiert wird, lag in den DF-Kulturen ein tendenziell erhöhter Anteil an ruhenden Zellen (G0-Phase) vor, die den Kontrollen des Zellzyklussystems nicht zugänglich sind und somit eine geringere Apoptoserate aufweisen (Alberts et al. 2004). Der niedrigere Anteil apoptotischer DF nach 24 h Hypoxie bzw. anschließender Reoxygenierung könnte folglich dadurch erklärt werden, dass DF weniger proliferierten als NHDF.

Andererseits könnte die niedrige Apoptoserate der DF bei Co-Kultivierung mit HDMEC auf einen weiteren protektiven Effekt der HDMEC zurückzuführen sein. Ein wichtiger Schritt am Ende der Wundheilung ist die gesteigerte Apoptoserate von Fibroblasten, MF und Endothelzellen im Granulationsgewebe und die Ausbildung von Narbengewebe. Diskutiert wird dabei ein Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsabfall spezifischer Wachstumsfaktoren wie TGF β_1 , PDGF, TGF α und TNF (Desmoulière et al. 1995). So führt der Abfall von PDGF wahlweise zur Apoptose oder zum Übergang in die G0-Phase (Löffler & Petrides 2003). In dieser Arbeit konnten wir bei Co-Kultivierung der DF mit HDMEC an allen Versuchstagen eine PDGF AA-Freisetzung in die Zellkulturüberstände nachweisen, mit tendenziell erhöhten Konzentrationen in den Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR) gegenüber den Normoxie-Kulturen (T1K, T2K). Da es bei Co-Kultivierung der DF mit HDMEC nicht zu einem Konzentrationsabfall von PDGF AA unter dem Einfluss der Hypoxie im Vergleich zur Normoxie kam, könnte dies zu den signifikant niedrigeren Apoptoseraten der DF bei Co-Kultivierung mit HDMEC gegenüber den NHDF beigetragen haben (Löffler & Petrides 2003). Beim Vergleich der Apoptoseraten der HDMEC in MK und CK ergaben sich keine Unterschiede. Hier könnte sich ein positiver Einfluss der Fibroblasten auf die HDMEC

zeigen. Ein positiver Effekt der Co-Kultivierung von HDMEC mit Fibroblasten konnte durch andere Studien bereits belegt werden (Zhao & Eghbali-Webb 2001; Velazquez et al. 2002).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie war es möglich, die Rate frühapoptotischer Zellen in ausgewählten Proben (T1K, T1H) zu bestimmen. Im Unterschied zur mikroskopischen Quantifizierung der Apoptose fanden sich nach 24 h Normoxie in sämtlichen DF- und NHDF-Kulturen Raten frühapoptotischer Fibroblasten zwischen 4% und 5%. Die Rate frühapoptotischer Fibroblasten stieg nach Hypoxie im Vergleich zur Normoxie nicht signifikant an. Zwar war ein protektiver Effekt der HDMEC auf DF oder NHDF bei Co-Kultivierung nicht erkennbar, jedoch schien sich kein Nachteil für DF und NHDF bei Co-Kultivierung mit HDMEC zu ergeben.

Auch die Rate frühapoptotischer HDMEC zeigte sich in MK und CK mit DF bzw. NHDF nach 24 h Normoxie im Vergleich zur mikroskopischen Quantifizierung der Apoptose der HDMEC signifikant erhöht. Nach Hypoxie zeigte sich lediglich ein tendenzieller Anstieg der Rate frühapoptotischer HDMEC in MK und CK im Vergleich zur Rate unter Normoxie, wobei der Anstieg bei Co-Kultivierung mit DF oder NHDF tendenziell geringer ausfiel als in MK. Dies könnte den protektiven Effekt der Fibroblasten auf HDMEC widerspiegeln (Zhao & Eghbali-Webb 2001; Velazquez et al. 2002).

Betrachtet man die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, so fanden sich keine signifikanten Unterschiede der Raten frühapoptotischer Zellen nach Hypoxie und Normoxie in den jeweiligen Kulturen. Die unterschiedlichen Apoptoseraten in FACS-Analyse und mikroskopischer Quantifizierung erklären sich über die verschiedenen Phasen der Apoptose, die jeweils detektiert wurden. Die Durchflusszytometrie diente in dieser Arbeit der Detektion der frühen Phase der Apoptose, während die Ausbildung der Mikronuklei als Merkmal eines späten Stadiums der Apoptose dient (Saraste 1999; Löffler & Petrides 2003; Alberts et al. 2004).

PDGF AA

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HDMEC in MK PDGF AA freisetzen. Dabei zeigte sich eine tendenziell erhöhte Konzentration im Zellkulturüberstand der Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR) gegenüber den Normoxie-Kulturen (T1K, T2K). Weder in den DF-MK noch in den NHDF-MK fand eine detektierbare Freisetzung von PDGF AA an den unterschiedlichen Versuchstagen statt. Bei Co-Kultivierung der HDMEC mit NHDF kam es im zeitlichen Verlauf tendenziell zu einem Abfall der PDGF AA-Konzentration im Zellkulturüberstand. Im Unterschied dazu nahm die PDGF AA-Konzentration der DF-CK über die Zeit hinweg tendenziell zu. Hier zeigte sich sogar eine tendenziell erhöhte PDGF AA-Konzentration im Zellkulturüberstand der DF-CK an T2K und T2HR im Vergleich zu den HDMEC-MK. Dies könnte darauf hinweisen, dass DF die Freisetzung von PDGF AA aus HDMEC stimulieren.

Die Bindung von PDGF AA erfolgt an den PDGF-alpha-Rezeptor (PDGFR α ; Powell et al. 1999; Löffler & Petrides 2003), der sowohl auf Fibroblasten, DF als auch MF zu finden ist (Alman et al. 1996; Brenner & Rayan 2003). Endothelzellen exprimieren dagegen keinen PDGFR α (Ross 1987; Heldin & Westermark 1999; Kowarik 2007). Da Endothelzellen keinen PDGFR α exprimieren, jedoch in der Lage sind PDGF AA zu sezernieren (Heldin & Westermark 1999; Kowarik 2007), könnte dies die erhöhten Konzentration des Wachstumsfaktors in den Zellkulturüberständen der MK von HDMEC erklären.

Bei Co-Kultivierung der HDMEC mit DF oder NHDF könnte das sezernierte PDGF AA an die Rezeptoren binden, die von DF bzw. NHDF präsentiert werden. Da das freigesetzte PDGF AA somit gebunden wäre, ist es im Zellkulturüberstand nicht mehr nachweisbar. Dies könnte erklären, warum die PDGF AA-Konzentrationen in den CK gegenüber den MK von HDMEC an Tag 0 und 1 geringer ausfielen.

Die Freisetzung von PDGF AA ist u.a. von der Sauerstoffkonzentration im Gewebe abhängig (Kowarik 2007). In dieser Arbeit zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Hypoxie und der Menge von PDGF AA in den HDMEC-MK und DF-CK. So lag die PDGF AA-Konzentration in den Zellkulturüberständen der Hypoxie-Kulturen (T1H, T2HR) über derjenigen der Normoxie-Kulturen (T1K, T2K). Hypoxie könnte somit die Freisetzung von PDGF AA induzieren. Der fehlende Anstieg der PDGF AA-Konzentration in den NHDF-CK könnte auf einer mangelnden Stimulation der PDGF AA-Freisetzung aus HDMEC durch NHDF resultieren. Zwar kommt es sowohl in den DF-CK als auch den NHDF-CK zu einer Bindung des PDGF AA an die PDGFR α , es lässt sich jedoch vermuten, dass die Menge des sezernierten PDGF AA in den CK von NHDF nicht ausreichte, alle Rezeptoren zu besetzen, während es in den CK von DF zu einer überschießenden Freisetzung von PDGF AA und somit zu einer 100%igen Sättigung aller Rezeptoren kam. Dies könnte den stabilisierenden Effekt der HDMEC

auf die MFDR in den DF-CK gegenüber den NHDF-CK im zeitlichen Verlauf erklären. Zwar zeigte sich in den NHDF-CK unter dem Einfluss der Hypoxie die MFDR gegenüber der Normoxie erhöht, jedoch war die MFDR im zeitlichen Verlauf im Vergleich zu T0K rückläufig. Eine weitere Erklärung für die relativ erhöhte PDGF AA-Konzentration im Zellkulturüberstand der DF-CK gegenüber den NHDF-CK wäre die fehlende Expression von PDGFR α durch DF. Diese Hypothese erscheint jedoch weniger wahrscheinlich, da die Differenzierung der Fibroblasten über die Proto-MF zu MF u.a. von PDGF abhängt (Tomasek et al. 2002). Würden DF keinen PDGFR α in CK exprimieren, müsste dies einen Abfall der MFDR nach sich ziehen, was jedoch in unserem Modell nicht der Fall war.

Betrachtet man die im Zellkulturüberstand gemessene PDGF AA-Konzentration und die MFDR der DF- und NHDF-CK ergab sich eine positive Korrelation: Während es in den DF-CK im zeitlichen Verlauf zu einer tendenziell steigenden PDGF AA-Konzentration im Zellkulturmedium kam, zeigte sich die MFDR ebenfalls stabil und im Trend sogar leicht ansteigend. Dagegen konnte in den NHDF-CK nur eine geringfügige PDGF AA-Konzentration nachgewiesen werden; parallel fiel die MFDR in den NHDF-CK im zeitlichen Verlauf tendenziell ab. In den DF- und NHDF-MK kam es ohne Freisetzung von PDGF AA ebenfalls zu einer Abnahme der MFDR. Dies entspricht Studien, gemäß denen Endothelzellen neben den DF eine zentrale Rolle in der Entstehung der Beugekontraktur einnehmen (Brenner & Rayan 2003). So kommt es durch die mikrovaskuläre Gefäßokklusion (Comtet & Bourne-Branchu 1986) zur Ausbildung einer lokalen Hypoxie im palmaren Bindegewebe (Kischer & Speer 1984). Die Freisetzung von PDGF resultiert in einer Proliferation von Fibroblasten (Heldin & Westermark 1999; Brenner & Rayan 2003) und ist ein essentieller Faktor in der Stimulation der MF-Differenzierung (Tomasek et al. 2002).

Zytokine im Multiplex Immunoassay

Bezüglich der Entstehung des M. Dupuytren werden verschiedene Zytokine diskutiert. Im Rahmen einer Pilotstudie wurde nach 24 h Normoxie die Zytokinfreisetzung in die Zellkulturüberstände der DF-MK (n=8) gemessen. Die DF setzten insgesamt 21 unterschiedliche Zytokine frei. Es zeigte sich eine deutliche Standardabweichung der Menge an freigesetzten Zytokinen in den DF-MK. Diese Heterogenität des Zytokinrelease könnte auf divergierende Erkrankungsdauer, Altersunterschiede und verschiedene Nebenerkrankungen im Patientenkollektiv zurückzuführen sein.

Es zeigte sich der Trend, dass DF GM-CSF, IL-6 und VEGF am stärksten freisetzen. GM-CSF wirkt auf Fibroblasten mitogen und bewirkt die Ausbildung von α -SMA in MF (Rubbia-Brandt et al. 1991). Des Weiteren stimuliert GM-CSF die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Bussolino et al. 1989). So könnte die Sekretion von GM-CSF neben einer erhöhten Fibroblasten- und Endothelzellproliferation die Differenzierung von MF stimulieren (Bussolino et al. 1989; Rubbia-Brandt et al. 1991) und somit zu dem fibrotischen Umbau der Palmarfaszie beitragen.

VEGF ist ein Induktor der Angiogenese (Shweiki et al. 1992; Ng et al. 2006) und steigert die Migration und Proliferation von Endothelzellen (Hoeben et al. 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass die im Palmargewebe von Dupuytrenpatienten vorhandenen DF auch in vivo zu einer VEGF-Freisetzung stimuliert werden. So wurde VEGF bereits in erhöhter Expression in der Palmaraponeurose von Dupuytrenpatienten nachgewiesen (Holzer et al. 2013).

IL-6 wirkt auf mesenchymale und epitheliale Zellen mitogen und spielt eine wichtige Rolle in der Akutphasereaktion der Wundheilung (Xing et al. 1998). IL-6 wird u.a. durch eine übermäßige Beanspruchung der Skelettmuskulatur freigesetzt (Fischer 2006). Dies erscheint durchaus interessant, da weiterhin (Mikro-) Traumata als Ursache in der Entstehung der Palmarfibromatose diskutiert werden (Liss & Stock 1996; Livingstone & Field 1999). So könnte der fortwährende mechanische Stress auf das Palmargewebe zu einer gesteigerten Freisetzung von IL-6 führen (Fischer 2006; Nagasaki et al. 2014). IL-6 wiederum könnte zu einer gesteigerten Resistenz der DF gegenüber Apoptose führen (Moodley et al. 2003) und über seine mitogene Wirkung auf Fibroblasten die Fibromatose der Palmaraponeurose fördern (Postlethwaite et al. 1984).

5.3 Schlussfolgerungen

Das in dieser Arbeit angewandte In-vitro-Modell eignet sich zur Co-Kultivierung der DF mit HDMEC, welche beide eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des M. Dupuytren einnehmen. Das Co-Kultur-Wounding-Modell ermöglicht sowohl die Untersuchung der verschiedenen Zelltypen unter Einbeziehung der Parameter Migration, Proliferation, myofibroblastoide Differenzierung, Apoptose und Zytokinrelease als auch die Untersuchung des Einflusses der Hypoxie. Durch Anpassung des in vorangegangenen Studien etablierten Co-Kultur-Wounding-Modells (Oberringer et al. 2007) konnten Charakteristika der DF im Vergleich zu NHDF bei Normoxie und nach Hypoxie dargestellt werden und die Auswirkung der Co-Kultivierung auf die verschiedenen Zelltypen analysiert werden.

Es konnte der Beleg erbracht werden, dass die HDMEC des Modells in der Lage sind, PDGF AA zu sezernieren (Kowarik 2007). Zusätzlich ergaben die Untersuchungsergebnisse einen spezifischen Zytokinrelease der DF in MK, wobei am stärksten GM-CSF, IL-6 und VEGF freigesetzt wurden. Dies entspricht den Untersuchungsergebnissen von Holzer et al., die eine erhöhte VEGF-Expression im Palmargewebe von Dupuytrenpatienten nachweisen konnten (Holzer et al. 2013). Durch VEGF und weitere Zytokine angeregte HDMEC wiederum könnten durch die verstärkte Freisetzung von PDGF AA in DF-CK stabilisierend auf die MF-Differenzierung im zeitlichen Verlauf wirken (Tomasek et al. 2002). So zeigte sich ausschließlich in den DF-CK unter Beteiligung der HDMEC eine im zeitlichen Verlauf stabile MFDR. Um den Einfluss der verschiedenen Zytokine auf die MF-Differenzierung genauer zu untersuchen, wäre in Folgestudien die Bestimmung des Zytokinrelease in CK von DF mit HDMEC sowie unter dem Einfluss der Hypoxie notwendig.

In dieser Arbeit konnte ein weiterer möglicher protektiver Effekt der HDMEC auf DF aufgezeigt werden. Die tendenziell stärkere Freisetzung von PDGF AA aus HDMEC bei Co-Kultivierung mit DF im Vergleich zur Co-Kultivierung mit NHDF könnte mitursächlich sein für die signifikant erniedrigte Apoptoserate der DF nach Hypoxie im Vergleich zu den NHDF. So besteht ein Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsabfall von Zytokinen wie PDGF und dem Eintreten der Apoptose (Desmoulière et al. 1995; Löffler & Petrides 2003).

Abbildung 49 zeigt einen möglichen Regelkreis beim M. Dupuytren: Das Zytokinspektrum der DF und die Freisetzung von PDGF AA aus HDMEC sowie die im Vergleich zu NHDF signifikant niedrigere Apoptoserate der DF bei Co-Kultivierung mit HDMEC nach Hypoxie, könnten den MF in vivo einen dauerhaften Differenzierungsvorteil bieten, was mit der langsamen Krankheitsprogression vereinbar wäre.

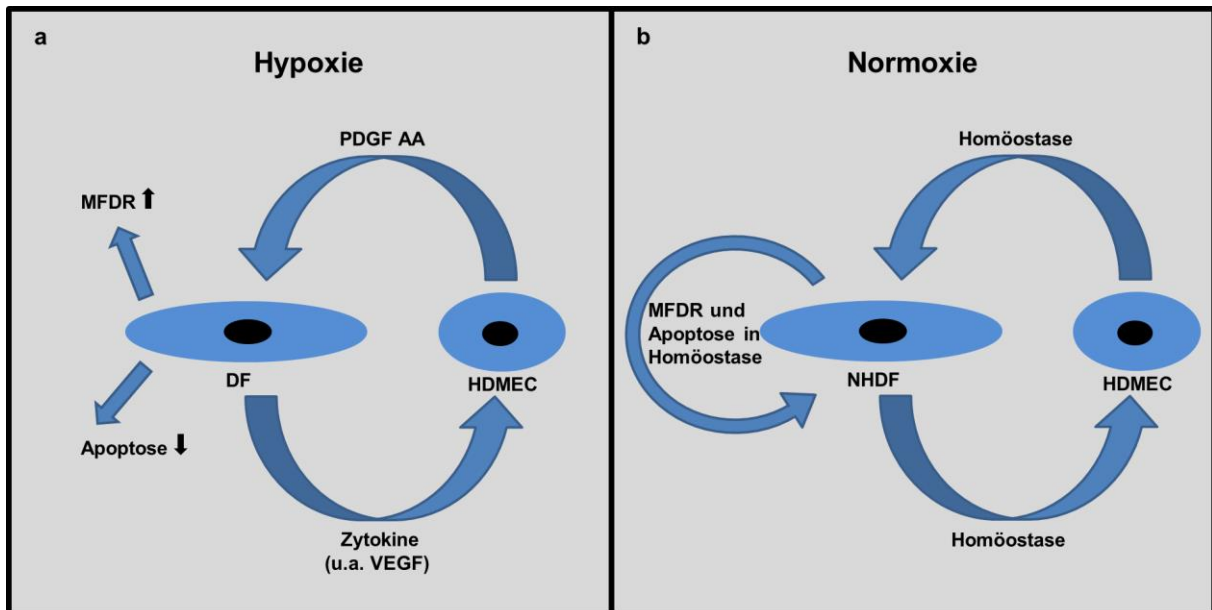


Abbildung 49:

Möglicher Regelkreis beim M. Dupuytren.

Schematische Darstellung eines möglichen Regelkreises beim M. Dupuytren durch die wechselseitige Beeinflussung von DF und Endothelzellen unter Hypoxie (a) sowie eines Regelkreises in gesundem Gewebe zwischen NHDF und Endothelzellen unter Normoxie (b).

Eine Weiterentwicklung des Modells könnte zukünftig zur Etablierung prognostischer Marker, zur verbesserten Abschätzung der Krankheitsprogression sowie zur Überprüfung neuer therapeutischer Ansätze des M. Dupuytren genutzt werden.

6. Anhang

6.1 Geräte

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Auswertung	
Axioskop 2 Plus, inkl. AxioVision 4.2	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Bio-Plex [®] or Luminex system (includes Bio-Plex Pro wash station II), Cat. No. 171-0HPCP1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Celloshaker Variospeed Variotime	Renner GmbH, Darmstadt (D)
Digital Still Camera DSC-S75	Sony Corporation, Tokyo (JPN)
FACScan Flow Cytometer, inkl. CellQuest™ Pro, Version 5.2.1	BD Biosciences Pharmingen, San Diego (USA)
Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Photometer Tecan Infinite M200, inkl. Magellan™ - Data Analysis Software, Version 6.6	Tecan, Männedorf (CH)
Zellschaber, steril, Cat. No. 541070	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Zellkultur	
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau (D)
Brutschrank Typ B12	Heraeus, Hanau (D)
Bunsenbrenner Fireboy plus	Integra Biosciences, Fernwald (D)
Einfrierkammer, Mr. Frosty [®] Cryo 1°C Freezing Container, Cat. No. 5100-0001	Nalgene, New York (USA)
Eppendorf Research Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Pipette 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Hypoxiekammer: 24,5 cm x 24,5 cm x 35,0 cm	Eigenbau
Pipetus-Akku	Hirschmann GmbH, Eberstadt (D)
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau (D)
Tiefkühlagergerät Typ HFU 486 Basic	Kendro Laboratory Products, Hanau (D)
Umlufttrockenschrank FD 115/E2	BINDER GmbH, Tuttlingen (D)
VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 75S	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim (D)
Wasserbad Typ WNB 14	Memmert GmbH, Schwabach (D)
Zentrifuge Hermle Z400K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen (D)

6.2 Materialien

6.2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	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-22020	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
SupplementMix Endothelial Cell Growth Medium MV, Cat. No. C-39225	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Fibroblasten-Kultivierung	
Fibroblasten aus M. Dupuytren	Biopsie
Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF), adult, Cat. No. C12302	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Quantum 333 for Fibroblasts, Cat. No. U15-813	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Verbrauchslösungen	
CK-Medium: Endothelzell-Medium und Q333-Medium im Verhältnis 3:1	PromoCell GmbH, Heidelberg (D) bzw. PAA Laboratories, Pasching (A)
Kryomedium für DF/NHDF: 1 ml DMSO wurde in 19 ml Q333-Medium verdünnt.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D) bzw. PAA Laboratories, Pasching (A)
Kryomedium für HDMEC: 1 ml DMSO wurde in 19 ml Endothelzell-Medium verdünnt.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D) bzw. PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Primärantikörper	
Factor VIII Related Antigen/von Willebrand Factor Ab-1, Rabbit Polyclonal Antibody, Cat. No. 12880	dianova GmbH, Hamburg (D)
Monoclonal Anti- α Smooth Muscle Actin, Product No. A 2547	SIGMA, Saint Louis (USA)
Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, Code-No. M7240	DakoCytomation, Glostrup (DK)
Sekundärantikörper	
Cy3 TM -conjugated AffiniPure F(ab) ₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Code No. 111-166-045	dianova GmbH, Hamburg (D)
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Code No. 115-095-003	dianova GmbH, Hamburg (D)

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eindeckmedium	
Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (4',6'-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid), Catalog No. H-1200	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Durchflusszytometrie	
7-Amino-Actinomycin (7-AAD), 2 ml, Material Number 559763, Component 51-68981E	BD Biosciences Pharmingen, San Diego (USA)
Annexin V Binding Buffer, 50 ml, Material Number 559763, Component 51-66121E	BD Biosciences Pharmingen, San Diego (USA)
Anti-human PECAM-1-FITC/Anti-human CD 31-FITC, 2 ml, Material Number 555445	BD Biosciences Pharmingen, San Diego (USA)
PE Annexin V, 0,5 ml, Material Number 559763, Component 51-65875X	BD Biosciences Pharmingen, San Diego (USA)
ELISA	
Assay Diluent RD1-68, 11 ml, Cat. No. DAA00B, Part 895528	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Calibrator RD6-3 Concentrate, 21 ml, Cat. No. DAA00B, Part 895165	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Color Reagent A, 12 ml, Cat. No. DAA00B, Part 895000	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Color Reagent B, 12 ml, Cat. No. DAA00B, Part 895003	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Human/Mouse PDGF AA Conjugate, 21 ml, Cat. No. DAA00B, Part 893601	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Human/Mouse PDGF AA Microplate, 96 well polystyrene microplate, Cat. No. DAA00B, Part 891049	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Human/Mouse PDGF AA Standard, 20 ng, Cat. No. DAA00B, Part 891051	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Plate Sealers, 4 adhesive strips, Cat. No. DAA00B, Part N/A	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Stop Solution, 6 ml, Cat. No. DAA00B, Part 895032	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Wash Buffer Concentrate, 21 ml, Cat. No. DAA00B, Part 895003	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Multiplex Immunoassay	
Assay buffer, 50 ml, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Detection antibodies, 320 µl, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Detection antibody diluent, 5 ml, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Coupled magnetic beads, 600 µl, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Filter plate (96-well), 1 plate, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Sealing tape, 1 pack, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Standard, 1 vial, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Streptavidin-PE, 1 vial, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Tube holder, 1 x, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Universal sample diluent, 8 ml, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Universal standard diluent, 10 ml, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Wash buffer, 130 ml, Cat. No. M500KCAF0Y	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Aqua dest., Reinwasseranlage Arium 661	Sartorius AG, Göttingen (D)
Bovine Serum Albumin (BSA), Cat. No. 10238040001	Roche, Ingelheim (D)
Collagenase Typ II, Cat. No. 17101-015	Gibco BRL, Darmstadt (D)
Deckgläser groß, 24 x 50 mm, Cat. No. 631-0146	Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
Deckgläser klein, 18 x 18 mm, Cat. No. 631-0120	Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO), Cat. No. A994.1	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)
Gewebekulturflasche groß, steril, 75 cm ² , 250 ml, mit Filter, Cat. No. 658 175	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Gewebekulturflasche klein, steril, 25 cm ² , 50 ml, mit Filter, Cat. No. 690 175	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Glycerol, Kat. Nr. 3783.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Isopropanol, ≥ 99,8%, Cat. No. 6752.4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Kryoröhrchen PP mit Schraubverschluss, steril, REF 123279	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Küvetten aus Glas, Kat. Nr. H 550.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Methanol, Kat. Nr. 4627.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Objektträger 76 x 26 mm, geschnitten mit Mattrand	Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
Paraformaldehyd, Cat. No. 1.04005.1000	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Einweg-Pasteurpipette 3 ml, steril, Cat. No. EA66.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Penicillin/Streptomycin, Cat. No. P11-010	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
5 ml sterile Einmal-Pipetten, Cat. No. 606 180	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
10 ml sterile Einmal-Pipetten, Cat. No. 607 180	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Eppendorf Pipettenspitzen, TEM Nr. 739290	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Eppendorf Pipettenspitzen, TEM Nr. 740290	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorf Pipettenspitzen, TEM Nr. 765290	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Phosphate Buffered Saline (PBS), Tablets, No. BR0014G	Oxoid Limited, Hampshire (GB)
QuadriPERM: steril, Cat. No. 96077308	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Eppendorf 1,5 ml Reaktionsgefäße, Polypropylen, Cat. No. 4182.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Trypsin EDTA, UV-inaktiviert (1:250), 1-fach Konzentrat, Cat. No. L11-660	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Tween 20, Art. Nr. 91272	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Zentrifugenröhrchen steril, PP-Test tubes, 15 ml, Cat. No. 188 271	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Zentrifugenröhrchen steril, PP-Test tubes, 50 ml, Cat. No. 227 261	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)

6.2.2 Vorbereitung von Glasobjektträgern für die Zellkultur

Die Glasobjektträger wurden vor deren Gebrauch in der Zellkultur nach u.g. Schema präpariert. 5 Glasschaukeln wurde mit jeweils 18 Objektträgern bestückt und zusammen in einem Messbecher mit 2000 ml Füllvolumen deponiert. Der Messbecher wurde mit 1500 ml Wasser befüllt und Seife zur Glasreinigung hinzugegeben. Die Einwirkzeit des Wasser-Seife-Gemisches betrug 24 h. Die Seife wurde am Folgetag durch kontinuierliches Spülen mit Leitungswasser über 1 h ausgewaschen. Danach wurden die Glasobjektträger für 1 h in einer 1%-igen Salzsäurelösung gelagert, um anschließend wiederum für 1 h mit fließendem Leitungswasser gewässert zu werden. Diesem Schritt folgte eine Behandlung mit 1%-iger Natronlauge über einen Zeitraum von 1 h, dem sich eine zweistündige Wässerung anschloss. Abschließend wurden die Glasobjektträger mit Aqua dest. und danach mit 96%-igem Ethanol gespült. Die luftgetrockneten Objektträger wurden mit den Glasschaukeln in Aluminiumfolie verpackt und bei 200°C für 2 h sterilisiert, bevor sie als Zellkultur-Oberfläche verwendet wurden.

7. Literaturverzeichnis

1. **Adamietz A, Keilholz L, Grüner J, Sauer R.** Die Radiotherapie des Morbus Dupuytren im Frühstadium. Langzeitresultate nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 10 Jahren. *Strahlenther Onkol* 2001; 177(11): 604-610
2. **Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005
3. **Alioto RJ, Rosier RN, Burton RI, Puzas JE.** Comparative effects of growth factors of Dupuytren's tissue and normal palmar fascia. *J Hand Surg Am* 1994; 19(3): 442-452
4. **Alison, M.R.** Assessing cellular proliferation: what's worth measuring? *Hum Exp Toxicol* 1995; 14(12): 935-944
5. **Alman BA, Naber SP, Terek RM, Jiranek WA, Goldberg MJ, Wolfe HJ.** Platelet-derived growth factor in fibrous musculoskeletal disorders: a study of pathologic tissue sections and in vivo primary cell cultures. *J Orthop Res* 1995; 13(1): 67-77
6. **Alman BA, Greel DA, Ruby LK, Goldberg MJ, Wolfe HJ.** Regulation of proliferation and platelet-derived growth factor expression in palmar fibromatosis (Dupuytren contracture) by mechanical strain. *J Orthop Res* 1996; 14(5): 722-728
7. **Antoniades HN, Scher CD, Stiles CD.** Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(4): 1809-1813
8. **Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Kiritsy CP, Lynch SE.** Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(2): 565-569
9. **Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB.** Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983; 258(11): 7155-7160
10. **Atale N, Gupta S, Yadav UCS, Rani V.** Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J Microsc* 2014; 255(1): 7-19
11. **Badalamente MA, Hurst LC, Grandia SK, Sampson SP.** Platelet-derived growth factor in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* 1992; 17(2): 317-323
12. **Badalamente MA, Hurst LC.** Efficacy and safety of injectable mixed collagenase subtypes in the treatment of Dupuytren's contracture. *J Hand Surg Am* 2007; 32(6): 767-774
13. **Badois FJ, Lermusiaux JL, Masse C, Kuntz D.** Non-surgical treatment of Dupuytren's disease using needle fasciotomy. *Rev Rhum Ed Fr* 1993; 60(11): 808-813
14. **Bailey AJ, Tarlton JF, Van der Stappen J, Sims TJ, Messina A.** The continuous elongation technique for severe Dupuytren's disease. A biochemical mechanism. *J Hand Surg Br* 1994; 19(4): 522-527
15. **Baird KS, Crossan JF, Ralston SH.** Abnormal growth factor and cytokine expression in Dupuytren's contracture. *J Clin Pathol* 1993; 46(5): 425-428
16. **Balaji N, Devy AS, Sumathi MK, Vidyalakshmi S, Kumar GS, D'Silva S.** Annexin V-affinity assay-apoptosis detection system in granular cell ameloblastoma. *J Int Oral Health* 2013; 5(6): 25-30

17. **Bali D.** Einfluss einer Telomerverkürzung auf die Strahlensensibilität von Tumorzellen. Dissertation, 2008
18. **Ballardini G, Fallani M, Biagini G, Bianchi FB, Pisi E.** Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1988; 56(1): 45-49
19. **Banerjee D, Pal SM.** Dynamics in the DNA recognition by DAPI: exploration of the various binding modes. *J Phys Chem B* 2008; 112(3): 1016-1021
20. **Bassot MJ.** Traitement de la maladie de Dupuytren par exérèse pharmaco-dynamique isolée ou complétée par un temps plastique uniquement cutané. *Lille Chir* 1965; 20: 38-44
21. **Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R.** TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 1990; 63(3): 515-524
22. **Ben-Sasson SA, Sherman Y, Gavrieli Y.** Identification of dying cells - in situ staining. *Methods Cell Biol* 1995; 46: 29-39
23. **Berger A, Hierner R.** Plastische Chirurgie: Band IV: Extremitäten. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009
24. **Bisson MA, McGroutner DA, Mudera V, Grobelaar AO.** The different characteristics of Dupuytren's disease fibroblasts derived from either nodule or cord: expression of alpha-smooth muscle actin and the response to stimulation by TGF-beta1. *J Hand Surg Br* 2003; 28(4): 351-356
25. **Böck P, Breitenecker G, Lunglmayr G.** Kontraktile Fibroblasten (Myofibroblasten) in der Lamina propria der Hodenkanälchen vom Menschen. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1972; 133(4): 519-527
26. **Böhm I, Schild H.** Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imaging Biol* 2003; 5(1): 2-14
27. **Bowen-Pope DF, Malpass TW, Foster DM, Ross R.** Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance. *Blood* 1984; 64(2): 458-469
28. **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): 1-13
29. **Brenner P, Krause-Bergmann A, Ha Van V.** Die Dupuytren-Kontraktur in Norddeutschland. Epidemiologische Erfassungsstudie anhand von 500 Fällen. *Unfallchirurg* 2001; 104: 303-311
30. **Brenner P, Rayan GM.** Morbus Dupuytren - Ein chirurgisches Therapiekonzept. Springer-Verlag, Wien New York, 2003
31. **Brenzel C.** Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung durch Taurolidin und TRAIL in humanen Fibrosarkomzellen (HT1080). Dissertation, 2010
32. **Bressler R.** Myoid cells in the capsule of the adrenal gland and in monolayers derived from cultured adrenal capsules. *Anat Rec* 1973; 177(4): 525-531
33. **Bruch H-P, Trentz O.** Berchtold Chirurgie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München, 2008
34. **Bühling KJ, Lepenis J, Witt K.** Intensivkurs - Allgemeine und spezielle Pathologie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München, 2004

35. **Bürk RR.** A factor from a transformed cell line that affects cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 369-372
36. **Buisson AC, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E, Birembaut P, Tournier JM.** Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. *J Cell Physiol* 1996; 166: 413-426
37. **Burge P, Hoy G, Regan P, Milne R.** Smoking, alcohol and the risk of Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br* 1997; 79(2): 206-210
38. **Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M.** Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 463-519
39. **Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R.** Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13(6): 245-251
40. **Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell CJ, Aglietta M, Arese P, Mantovani A.** Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 1989; 337(6206): 471-473
41. **Canalis E.** Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism* 1981; 30(10): 970-975
42. **Carle GF, Frank M, Olson MV.** Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 1986; 232(4746): 65-68
43. **Chicurel ME, Chen CS, Ingber DE.** Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10(2): 232-239
44. **Clark RAF, Folkvord JM, Hart CE, Murray MJ, McPherson JM.** Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. *J Clin Invest* 1989; 84(3): 1036-1040
45. **Collins T, Pober JS, Gimbrone MA, Hammacher A, Betsholtz C, Westermarck B, Heldin CH.** Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor A chain. *Am J Pathol* 1987; 126(1): 7-12
46. **Comtet J, Bourne-Branchu B.** La maladie de Dupuytren est-elle d'origine vasculaire? In: Tubiana R, Hueston JT (Hrsg.): *La maladie de Dupuytren*. Expansion Scientifique Française, Paris, 1986; S. 79-83
47. **Cramer EM, Meyer D, Le Menn R, Breton-Gorius J.** Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies. *Blood* 1985; 66(3): 710-713
48. **Cross MJ, Claesson-Welsh L.** FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22(4): 201-207
49. **Darby I, Skalli O, Gabbiani G.** Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63(1): 21-29
50. **Decker T, Lohmann-Matthes ML.** A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988; 115(1): 61-69
51. **Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G.** Transforming growth factor-beta1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122(1): 103-111

52. **Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G.** Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146(1): 56-66
53. **Deuel TF, Huang JS.** Platelet-derived growth factor. Structure, function, and roles in normal and transformed cells. *J Clin Invest* 1984; 74(3): 669-676
54. **Dietrich, DR.** Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23(1): 77-109
55. **Dorovini-Zis K, Huynh H.** Ultrastructural localization of factor VIII-related antigen in cultured human brain microvessel endothelial cells. *J Histochem Cytochem* 1992; 40(5): 689-696
56. **Dupuytren G.** De la rétraction des doigts par suite d'une affection de l'aponévrose palmaire. Description de la maladie. Opération chirurgicale qui convient dans de cas. *Compte rendu de la clinique chirurgicale de l'Hôtel Dieu par MM, les docteurs Alexandre Paillard et Marx.* *J Univ Hebd Méd Chir Pract* 1831; 5: 352-365
57. **Early PF.** Population studies in Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg* 1962; 44(3): 602-613
58. **Eddy RJ, Petro JA, Tomasek JJ.** Evidence for the nonmuscle nature of the "myofibroblast" of granulation tissue and hypertrophic scar. An Immunofluorescence Study. *Am J Pathol* 1988; 130(2): 252-260
59. **Elliot D.** The early history of Dupuytren's disease. *Hand Clin* 1999; 15(1): 1-19
60. **El-Shishtawy RM, Oliveira AS, Almeida P, Ferreira DP, Conceição DS, Ferreira LFV.** Photophysical studies of a new water soluble indocarbocyanine dye adsorbed onto microcrystalline cellulose and β -cyclodextrin. *Molecules* 2013; 18(5): 5648-5668
61. **Eul B, Rose F, Krick S, Savai R, Goyal P, Klepetko W, Grimminger F, Weissmann N, Seeger W, Hänze J.** Impact of HIF-1 α and HIF-2 α on proliferation and migration of human pulmonary artery fibroblasts in hypoxia. *FASEB J* 2006; 20(1): 163-165
62. **Falanga V, Kirsner RS.** Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells. *J Cell Physiol* 1993; 154(3): 506-510
63. **Fischer CP.** Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 2006; 12: 6-33
64. **Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K.** Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(10): 5034-5038
65. **Freehafer AA, Strong JM.** The treatment of Dupuytren's contracture by partial fasciectomy. *J Bone Joint Surg Am* 1963; 45: 1207-1216
66. **Fujimoto T, Singer SJ.** Immunocytochemical studies of endothelial cells in vivo. I. The presence of desmin only, or of desmin plus vimentin, or vimentin only, in the endothelial cells of different capillaries of the adult chicken. *J Cell Biol* 1986; 103(6): 2775-2786
67. **Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G.** Granulation tissue as a contractile organ. *J Exp Med* 1972; 135(4): 719-734
68. **Gabbiani G, Majno G.** Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1972; 66(1): 131-146
69. **Gabbiani G.** The biology of the myofibroblast. *Kidney Int* 1992; 41(3): 530-532

70. **Ganten D, Ruckpaul K.** Grundlagen der molekularen Medizin. Springer-Verlag, Heidelberg, 2008
71. **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(4): 1710-1715
72. **Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD.** Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138(4): 867-873
73. **Hall PA, Levison DA.** Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990; 43(3): 184-192
74. **Halliday NL, Tomasek JJ.** Mechanical properties of the extracellular matrix influence fibronectin fibril assembly in vitro. *Exp Cell Res* 1995; 217(1): 109-117
75. **Heldin CH, Westermark B.** Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev* 1999; 79(4): 1283-1316
76. **Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C.** Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001; 12(9): 2730-2741
77. **Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA.** Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56(4): 549-580
78. **Hof H, Dörries R.** Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005
79. **Holzer LA, Cör A, Pfandlsteiner G, Holzer G.** Expression of VEGF, its receptors, and HIF-1 α in Dupuytren's disease. *Acta Orthop* 2013; 84(4): 420-425
80. **Hsieh HJ, Li NQ, Frangos JA.** Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor mRNA levels. *Am J Physiol* 1991; 260(2): H642-H646
81. **Hueston JT.** Limited fasciectomy for Dupuytren's contracture. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull* 1961; 27: 569-585
82. **Hueston JT.** Enzymic fasciotomy. *Hand* 1971; 3(1): 38-40
83. **Hurst LC, Badalamente MA, Hentz V, Hotchkiss RN, Kaplan TD, Meals RA, Smith TM, Rodzvilla J.** Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture. *N Engl J Med* 2009; 361(10): 968-979
84. **Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL.** Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1973; 52(11): 2757-2764
85. **Jensen CM, Haugegaard M, Rasmussen SW.** Amputations in the treatment of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Br* 1993; 18(6): 781-782
86. **Kapanci Y, Ribaux C, Chaponnier C, Gabbiani G.** Cytoskeletal features of alveolar myofibroblasts and pericytes in normal human and rat lung. *J Histochem Cytochem* 1992; 40(12): 1955-1963
87. **Kapuscinski J.** Interactions of nuclei acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes. *J Histochem Cytochem* 1990; 38(9): 1323-1329
88. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-257

89. **Kischer CW, Speer DP.** Microvascular changes in Dupuytren's contracture. *J Hand Surg* 1984; 9(1): 58-62
90. **Kohler N, Lipton A.** Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res* 1974; 87(2): 297-301
91. **Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ.** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84(5): 1415-1420
92. **Kourembanas S, Morita T, Liu Y, Christou H.** Mechanism by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int* 1997; 51(2): 438-443
93. **Kowarik MC.** Expression, Lokalisation und funktionelle Bedeutung von PDGF und PDGF-Rezeptoren in der Hypophyse und in Hypophysentumorzellen. Dissertation, 2007
94. **Krebs H.** Erfahrungen bei 350 operativ behandelten Dupuytren'schen Kontrakturen. *Langenbecks Arch Chir* 1975; 338(1): 67-80
95. **Krishan A, Dandekar PD.** DAPI fluorescence in nuclei isolated from tumors. *J Histochem Cytochem* 2005; 53(8): 1033-1036
96. **Legueu F, Juvara E.** Des aponévroses de la paume de la main. *Bull Soc Anat Paris* 1892; 6: 383-400
97. **Lindahl P, Betsholtz C.** Not all myofibroblasts are alike: revisiting the role of PDGF-A and PDGF-B using PDGF-targeted mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7(1): 21-26
98. **Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ.** Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992; 97(5): 4-13
99. **Liss GM, Stock SR.** Can Dupuytren's contracture be work-related? Review of the evidence. *Am J Ind Med* 1996; 29(5): 521-532
100. **Livingstone JA, Field J.** Algodystrophy and its association with Dupuytren's disease. *J Hand Surg Br* 1999; 24(2): 199-202
101. **Löffler G, Petrides PE.** Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2003
102. **Luck JV.** Dupuytren's contracture; a new concept of the pathogenesis correlated with surgical management. *J Bone Joint Surg Am* 1959; 41(4): 635-664
103. **Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S.** Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(9): 4219-4223
104. **McFarlane RM.** Patterns of the diseased fascia in the fingers in Dupuytren's contracture. Displacement of the neurovascular bundle. *Plast Reconstr Surg* 1974; 54(1): 31-44
105. **McFarlane RM.** Dupuytren's disease. *J Hand Ther* 1997; 10(1): 8-13
106. **McFarlane RM.** On the origin and spread of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* 2002; 27(3): 385-390
107. **McGruther DA.** The microanatomy of Dupuytren's contracture. *Hand* 1982; 14(3): 215-236
108. **McIndoe A, Beare RLB.** The surgical management of Dupuytren's contracture. *Am J Surg* 1958; 95(2): 197-203
109. **Modarressi A, Pietramaggiori G, Godbout C, Vigato E, Pittet B, Hinz B.** Hypoxia impairs skin myofibroblast differentiation and function. *J Invest Dermatol* 2010; 130(12): 2818-2827

110. **Moodley YP, Misso NL, Scaffidi A, Fogel-Petrovic M, McAnulty RJ, Laurent GJ, Knight DA.** Inverse effects of interleukin-6 on apoptosis of fibroblasts from pulmonary fibrosis and normal lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29(4): 490-498
111. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63
112. **Müller M und Mitarbeiter.** Chirurgie für Studium und Praxis. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach, 2008
113. **Murrell GAC, Francis MJO, Bromley L.** Free radicals and Dupuytren's contracture. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987; 295(6610): 1373-1375
114. **Murrell GAC, Francis MJO, Bromley L.** Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 1990; 265(3): 659-665
115. **Murrell GAC.** The role of the fibroblast in Dupuytren's contracture. *Hand Clin* 1991; 7(4): 669-681
116. **Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H.** Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer* 2014; 110(2): 469-478
117. **Newman PJ.** The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997; 99(1): 3-8
118. **Ng YS, Krilleke D, Shima DT.** VEGF function in vascular pathogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312(5): 527-537
119. **Nilsson J, Sjölund M, Palmberg L, Thyberg J, Heldin CH.** Arterial smooth muscle cells in primary culture produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(13): 4418-4422
120. **Noble J, Heathcote JG, Cohen H.** Diabetes mellitus in the aetiology of Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Br* 1984; 66(3): 322-325
121. **Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M.** Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993; 12(9): 3679-3684
122. **Oberringer M, Jennewein M, Motsch SE, Pohlemann T, Seekamp A.** Different cell cycle responses of wound healing protagonists to transient in vitro hypoxia. *Histochem Cell Biol* 2005; 123(6): 595-603
123. **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(4): 197-207
124. **Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T.** In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. *J Mol Histol* 2008; 39(1): 37-47
125. **Ogawa Y, Chung YS, Nakatan B, Takatsuka S, Maeda K, Sawada T, Kato Y, Yoshikawa K, Sakurai M, Sowa M.** Microvessel quantitation in invasive breast cancer by staining for factor VIII-related antigen. *Br J Cancer* 1995; 71(6): 1297-1301
126. **Orlidge A, D'Amore PA.** Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1987; 105: 1455-1462

127. **Otte, N.** Untersuchung der Einflussnahme verschiedener UVB Bestrahlungsquellen auf die Mikronukleus Entstehung in humanen Keratinozyten. Dissertation, 2004
128. **Otto AK.** Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen am Gewebsverband und an in der Zellkultur gezüchteten Myofibroblasten zur Klärung der Pathogenese des Morbus Dupuytren. Dissertation, 2004
129. **Owen AJ, Geyer RP, Antoniades HN.** Human platelet-derived growth factor stimulates amino acid transport and protein synthesis by human diploid fibroblasts in plasma-free media. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(10): 3203-3207
130. **Paulsson Y, Hammacher A, Heldin CH, Westermark B.** Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature* 1987; 328(6132): 715-717
131. **Petroll WM, Cavanagh HD, Barry P, Andrews P, Jester JV.** Quantitative analysis of stress fiber orientation during corneal wound contraction. *J Cell Sci* 1993; 104(2): 353-363
132. **Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ.** Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension* 2002; 39(2): 258-263
133. **Philpott NJ, Turner AJC, Scopes J, Westby M, Marsh JCW, Gordon-Smith EC, Dagleish AG, Gibson FM.** The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 1996; 87(6): 2244-2251
134. **Piper HM.** Cell culture techniques in heart and vessel research. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1990
135. **Platter F.** Observationum, in hominis affectibus plerisque, corpori et animo, functionum laesione, dolore, aliave molestia et vitio incommodantibus, libri tres. Vol. 3 Basel, König und Brandmyller, S. 137-145, 1614
136. **Postlethwaite AE, Lachman LB, Kang AH.** Induction of fibroblast proliferation by interleukin-1 derived from human monocytic leukemia cells. *Arthritis Rheum* 1984; 27(9): 995-1001
137. **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(1): C1-C19
138. **Pozarowski P, Darzynkiewicz Z.** Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2004; 281: 301-311
139. **Purins K, Enblad P, Sandhagen B, Lewén A.** Brain tissue oxygen monitoring: a study of in vitro accuracy and stability of Neurovent-PTO and Licox sensors. *Acta Neurochir* 2010; 152(4): 681-688
140. **Rabinowitz JL, Ostermann L, Bora FW, Staeffen J.** Lipid composition and de novo lipid biosynthesis of human palmar fat in Dupuytren's disease. *Lipids* 1983; 18(5): 371-374
141. **Rand JH, Gordon RE, Sussman II, Chu SV, Solomon V.** Electron microscopic localization of factor-VIII-related antigen in adult human blood vessels. *Blood* 1982; 60(3): 627-634
142. **Rayan GM, Tomasek JJ.** Generation of contractile force by cultured Dupuytren's disease and normal palmar fibroblasts. *Tissue Cell* 1994; 26(5): 747-756
143. **Rayan GM, Parizi M, Tomasek JJ.** Pharmacologic regulation of Dupuytren's fibroblast contraction in vitro. *J Hand Surg Am* 1996; 21(6): 1065-1070
144. **Rayan GM.** Palmar fascial complex anatomy and pathology in Dupuytren's disease. *Hand Clin* 1999; 15(1): 73-86

145. **Rayan GM, Moore J.** Non-Dupuytren's disease of the palmar fascia. *J Hand Surg Br* 2005; 30(6): 551-556
146. **Rayan GM.** Dupuytren disease: Anatomy, pathology, presentation, and treatment. *J Bone Surg Am* 2007; 89(1): 189-198
147. **Ritter MA.** The anatomy and function of the palmar fascia. *Hand* 1973; 5(3): 263-267
148. **Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrls JH, Fauci AS.** Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(12): 4167-4171
149. **Rontó G, Tarján I.** Einführung in die Biophysik mit medizinischer Orientierung. Semmelweis Verlag, Budapest, 2002
150. **Ross R.** Platelet-derived growth factor. *Annu Rev Med* 1987; 38: 71-79
151. **Rubbia-Brandt L, Sappino AP, Gabbiani G.** Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1991; 60(2): 73-82
152. **Saraste A.** Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 1999; 24(3): 189-195
153. **Schmid E, Osborn M, Rungger-Brändle E, Gabbiani G, Weber K, Franke WW.** Distribution of vimentin and desmin filaments in smooth muscle tissue of mammalian and avian aorta. *Exp Cell Res* 1982, 137(2): 329-340
154. **Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV.** Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13(2): 204-208
155. **Schmid I, Uittenbogaart CH, Jamieson BD.** Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. *Nat Protoc* 2007; 2(1): 187-190
156. **Schmidt RF, Lang F, Thews G.** Physiologie des Menschen. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2005
157. **Scholzen T und Gerdes J.** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182(3): 311-322
158. **Schrader M, Lang K, Schramm U.** Arterielle und nervale Versorgung der Haut der Palma manus. Chirurgisch-anatomische Befunde beim Morbus Dupuytren. *Ann Anat* 1997; 179(4): 349-353
159. **Schürch W, Seemayer TA, Lagacé R, Gabbiani G.** The intermediate filament cytoskeleton of myofibroblasts: an immunofluorescence and ultrastructural study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1984; 403(4): 323-336
160. **Schwarz F, Jennewein M, Bubel M, Holstein JH, Pohlemann T, Oberringer M.** Soft tissue fibroblasts from well healing and chronic human wounds show different rates of myofibroblasts in vitro. *Mol Biol Rep* 2013; 40(2): 1721-1733
161. **Sehested M, Hou-Jensen K.** Factor VIII related antigen as an endothelial cell marker in benign and malignant diseases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1981; 391(2): 217-225
162. **Serini G, Gabbiani G.** Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 1999; 250(2): 273-283

163. **Shinoguchi E, Ito E, Kudo A, Nakamura S, Taniguchi K.** Fluorescence energy transfer between N-[P-(2-benzimidazolyl)-phenyl]maleimide, N-(1-anilinonaphthyl-4) maleimide, Fluorescein 5'-isothiocyanate, and Anthrolyouabain in Na⁺, K⁺-ATPase. In: Kaplan JH, De Weer P (Hrsg.): *The Sodium Pump: Recent Developments* 1991; 44: 363-367
164. **Shum DT, McFarlane RM.** Histogenesis of Dupuytren's disease: an immunohistochemical study of 30 cases. *J Hand Surg Am* 1988; 13(1): 61-67
165. **Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E.** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359(6398): 843-845
166. **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(2): 211-218
167. **Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G.** A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986; 103(6): 2787-2796
168. **Skalli O, Schürch W, Seemayer T, Lagacé R, Montandon D, Pittet B, Gabbiani G.** Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 1989; 60(2): 275-285
169. **Stamenkovic I, Skalli O, Gabbiani G.** Distribution of intermediate filament proteins in normal and diseased human glomeruli. *Am J Pathol* 1986; 125(3): 465-475
170. **Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD.** DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992; 31(12): 3103-3112
171. **Terek RM, Jiranek WA, Goldberg MJ, Wolfe HJ, Alman BA.** The expression of platelet-derived growth-factor gene in Dupuytren contracture. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77(1): 1-9
172. **Toccanier-Pelte MF, Skalli O, Kapanci Y, Gabbiani G.** Characterization of stromal cells with myoid features in lymph nodes and spleen in normal and pathological conditions. *Am J Pathol* 1987; 129(1): 109-118
173. **Tomasek JJ, Schultz RJ, Haaksma CJ.** Extracellular matrix-cytoskeletal connections at the surface of the specialized contractile fibroblast (myofibroblast) in Dupuytren disease. *J Bone Joint Surg Am* 1987; 69(9): 1400-1407
174. **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(5): 349-363
175. **Tubiana R, Michon J.** Evaluation chiffrée de la déformation dans la maladie de Dupuytren. *Mém Acad Chir* 1961; 87: 887-888
176. **Tubiana R, Simmons BP, DeFrenne HAR.** Location of Dupuytren's disease on the radial aspect of the hand. *Clin Orthop Relat Res* 1982; 168: 222-229
177. **Van Diest PJ, Brugal G, Baak JP.** Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998; 51(10): 716-724
178. **Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM.** Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31(1): 1-9
179. **Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ.** Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 2000; 257(1): 180-189

180. **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(10): 1316-1318
181. **Verheijen R, Kuijpers HJH, Schlingemann RO, Boehmer ALM, van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FCS.** Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. *J Cell Sci* 1989; 92(1): 123-130
182. **Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C.** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184(1): 39-51
183. **Wagner DD.** Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 217-246
184. **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: 325-333
185. **Welch MP, Odland GF, Clark RAF.** Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol* 1990; 110(1): 133-145
186. **Wilson E, Mai Q, Sudhir K, Weiss RH, Ives HE.** Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Biol* 1993; 123(3): 741-747
187. **Wurster-Hill DH, Brown F, Park JP, Gibson SH.** Cytogenetic studies in Dupuytren contracture. *Am J Hum Genet* 1988; 43(3): 285-292
188. **Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK.** IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101(2): 311-320
189. **Zachariae L.** Extensive versus limited fasciectomy for Dupuytren's contracture. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1967; 1(2): 150-153
190. **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(2): 273-282
191. **Zupančič G, Ogden D, Magnus CJ, Wheeler-Jones C, Carter TD.** Differential exocytosis from human endothelial cells evoked by high intracellular Ca(2+) concentration. *J Physiol* 2002; 544(3): 741-755

8. Publikationen

Veröffentlichter Vortrag:

Feistel AP, Mayer RD, Jennewein M, Bubel M, Pohlemann T, Oberringer M.

Gibt es spezifische proliferative und biochemische Eigenschaften der Fibroblasten bei

Morbus Dupuytren? Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. German

Medical Science GMS Publishing House,

<http://www.egms.de/static/en/meetings/dkou2012/12dkou506.shtml>; Berlin (2012)

9. Danksagung

Diese Dissertation wurde durch die Zusammenarbeit, Beratung und Unterstützung vieler Menschen ermöglicht, bei denen ich mich bedanken möchte.

Meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. (apl.) Dr. rer. nat. Martin Oberringer möchte ich für das Vermitteln fundierter wissenschaftlicher Kenntnisse, praktischer Fertigkeiten und die hervorragende Betreuung ganz herzlich danken.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie.

Ich danke Herrn Dr. med. Rolf-Dieter Mayer für die Bereitstellung der palmaren Gewebeproben nach Durchführung der partiellen Fasziektomie.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des molekular- und zellbiologischen Forschungslabors bedanken, besonders bei Frau M. Jennewein, Frau M. Bubel und Frau S. Schlimmer für die tatkräftige Unterstützung bei der Herstellung der Präparate.

Ein herzlicher Dank gebührt meinen lieben Eltern und meiner Familie, die mir das Studium der Humanmedizin im In- und Ausland ermöglicht haben und deren Unterstützung mir stets gewiss war.

10. Lebenslauf