

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik für Gefäßmedizin

Prof. Dr. E. Sebastian Debus

**Kombinatorische Anwendung von TRH und GRP in einem  
humanen in-vitro-Wundheilungsmodell**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Edgar Kleinspehn  
aus Berlin

Hamburg 2016

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.11.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** Prof. Dr. E. Sebastian Debus

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** Prof. Dr. Matthias Augustin

## Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                                         |          |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>                                                                       | <b>1</b> |
| 1.1      | Hinführung zum Thema                                                                    | 1        |
| 1.2      | Anatomie und Physiologie humaner Haut und Wundheilung                                   | 1        |
| 1.2.1    | Aufbau und Funktion intakter menschlicher Haut                                          | 1        |
| 1.2.2    | Keratinocytenproliferation und -differenzierung in der Epidermis                        | 3        |
| 1.2.3    | Wundheilung beim Menschen                                                               | 4        |
| 1.2.3.1  | Hämostase und Koagulation                                                               | 5        |
| 1.2.3.2  | Beginn der Inflammationsphase durch Chemotaxis                                          | 5        |
| 1.2.3.3  | Reepithelialisierung durch Keratinocytenproliferation und -migration                    | 7        |
| 1.2.3.4  | Wiederaufbau der Extrazellulärmatrix durch Fibroblasten, Angiogenese und Wundverschluss | 9        |
| 1.2.3.5  | Maturation und Remodeling                                                               | 10       |
| 1.3      | Wundheilungsstörungen im klinischen Kontext                                             | 11       |
| 1.3.1    | Pathogenese von Wunden und Wundheilungsstörungen                                        | 11       |
| 1.3.2    | Risikofaktoren für chronische Wundheilungsstörungen                                     | 11       |
| 1.3.3    | Epidemiologische Betrachtung assoziierter Krankheiten                                   | 14       |
| 1.3.4    | Topische Wundtherapeutika und lokale Therapieoptionen bei chronischen Wunden            | 16       |
| 1.4      | Überblick über etablierte Wundheilungsmodelle                                           | 18       |
| 1.4.1    | Zellmigrationsmodelle und Scratch-Assay                                                 | 19       |
| 1.4.2    | Hautäquivalenzmodelle                                                                   | 19       |
| 1.4.3    | Tiermodelle                                                                             | 20       |
| 1.4.4    | Humane Wundheilungsmodelle und klinische Forschung                                      | 21       |
| 1.4.5    | Humanes Vollhautkultursystem zur praxisnahen Wundforschung                              | 21       |
| 1.4.6    | Marker für die Wundheilung                                                              | 22       |
| 1.4.6.1  | Ki67/TUNEL                                                                              | 22       |
| 1.4.6.2  | Keratine und insbesondere Zytokeratin CK 6                                              | 23       |
| 1.4.6.3  | Involucrin für die terminalen Keratinocyten-differenzierung                             | 25       |
| 1.4.6.4  | CD31 als Marker für Endothelzellen                                                      | 26       |
| 1.5      | Auf wundheilungsfördernde Wirkung untersuchte Substanzen                                | 26       |
| 1.5.1    | Thyrotropin Releasing Hormone und der hypothalamisch-hypophysäre Schilddrüsenregelkreis | 26       |
| 1.5.2    | Gastrin Releasing Peptide als Mitglied der Bombesin-Familie                             | 29       |
| 1.5.3    | TRH und GRP als potenziell wundheilungsfördernde Substanzen                             | 30       |

|          |                                                                                                      |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.6      | Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit                                                             | 31        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>                                                                         | <b>32</b> |
| 2.1      | Material                                                                                             | 32        |
| 2.1.1    | Hautproben                                                                                           | 32        |
| 2.1.2    | Chemikalien und Reagenzien                                                                           | 33        |
| 2.1.3    | Antikörper                                                                                           | 34        |
| 2.1.4    | Verbrauchsmaterialien                                                                                | 34        |
| 2.1.5    | Laborgeräte                                                                                          | 35        |
| 2.1.6    | Software und EDV                                                                                     | 35        |
| 2.2      | Methoden                                                                                             | 35        |
| 2.2.1    | Anlage der Hautorgankultur                                                                           | 35        |
| 2.2.2    | Kulturpflege und Probenkonservierung                                                                 | 36        |
| 2.2.3    | Anfertigung der Gefrierschnitte auf Objektträgern                                                    | 37        |
| 2.2.4    | Immunfluoreszenzfärbung für CK 6, CD31 und Involucrin                                                | 38        |
| 2.2.5    | Immunfluoreszenzdoppelfärbung für Ki67 und TUNEL                                                     | 38        |
| 2.2.6    | Fotomikroskopische Dokumentation und quantitative<br>Immunhistomorphometrie                          | 39        |
| 2.2.7    | Statistische Analyse und Auswertung                                                                  | 42        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                    | <b>43</b> |
| 3.1      | Einfluss der Kulturmedien auf die Wundzungenfläche                                                   | 43        |
| 3.1.1    | Vergleich innerhalb eines Kulturtages (Intraday)                                                     | 43        |
| 3.1.2    | Vergleich zwischen den einzelnen Kulturtagen (Interday)                                              | 44        |
| 3.1.3    | Reepithelialisierung von gefäßgeschädigter Haut in vitro möglich                                     | 47        |
| 3.2      | Einfluss der Kulturmedien auf die Signalintensität von CK 6                                          | 47        |
| 3.2.1    | Vergleich der Intensität innerhalb eines Kulturtages (Intraday)                                      | 48        |
| 3.2.2    | Vergleich der Intensität zwischen den Kulturtagen (Interday)                                         | 49        |
| 3.2.3    | TRH und GRP haben keinen Einfluss auf CK 6                                                           | 52        |
| 3.3      | Einfluss der Kulturmedien auf Involucrin                                                             | 52        |
| 3.3.1    | Vergleich der Intensität innerhalb eines Kulturtages (Intraday)                                      | 53        |
| 3.3.2    | Vergleich der Intensität zwischen den Kulturtagen (Interday)                                         | 54        |
| 3.3.3    | Immunhistomorphologische Veränderungen des Verteilungsmusters von<br>Involucrin über die Kulturdauer | 57        |
| 3.4      | Einfluss der Kulturmedien auf die Fläche des CD31-positiven Areal                                    | 58        |
| 3.4.1    | Vergleich innerhalb eines Kulturtages (Intraday)                                                     | 59        |

|           |                                                                                                                          |            |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.4.2     | Vergleich zwischen den Kulturtagen (Interday)                                                                            | 60         |
| 3.4.3     | In vitro Zunahme der CD31-positiven Fläche bei gefäßgeschädigter Haut<br>möglich                                         | 63         |
| 3.5       | Einfluss der Kulturmedien auf die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl proliferativer<br>und apoptotischer Zellen am Wundrand | 64         |
| 3.5.1     | Intraday-Vergleich der absoluten Zellzahlen                                                                              | 64         |
| 3.5.2     | Interday-Vergleich der absoluten Zellzahlen                                                                              | 65         |
| 3.5.3     | Intraday-Vergleich des relativen Anteils Ki67- und TUNEL-positiver Zellen an<br>der Gesamtzellzahl                       | 66         |
| 3.5.4     | Interday-Vergleich des relativen Anteils Ki67- und TUNEL-positiver Zellen an<br>der Gesamtzellzahl                       | 68         |
| 3.5.5     | Zunahme der proliferativen Aktivität gefäßgeschädigter Vollhaut nach<br>Verletzung in vitro nachweisbar                  | 70         |
| <b>4</b>  | <b>Diskussion</b>                                                                                                        | <b>72</b>  |
| 4.1       | Anwendbarkeit des Vollhaut-Organokultur-Modells bei Patienten mit<br>geschädigter Wundheilung                            | 72         |
| 4.2       | Einfluss der Einzelanwendung von TRH und GRP bei Patienten mit<br>geschädigter Wundheilung                               | 74         |
| 4.3       | Einfluss der kombinatorischen Anwendung von TRH und GRP bei Patienten mit<br>geschädigter Wundheilung                    | 77         |
| 4.4       | Ausblick und zukünftige Forschungsansätze                                                                                | 79         |
| <b>5</b>  | <b>Zusammenfassung / Summary</b>                                                                                         | <b>82</b>  |
| <b>6</b>  | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                                                                             | <b>84</b>  |
| <b>7</b>  | <b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>                                                                               | <b>86</b>  |
| <b>8</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                                                              | <b>88</b>  |
| <b>9</b>  | <b>Danksagung</b>                                                                                                        | <b>98</b>  |
| <b>10</b> | <b>Lebenslauf</b>                                                                                                        | <b>99</b>  |
| <b>11</b> | <b>Eidesstattliche Erklärung</b>                                                                                         | <b>101</b> |

## **1 Einleitung**

### **1.1 Hinführung zum Thema**

Chronische Wunden und die Behandlung von Wundheilungsstörungen im weitesten Sinne sind seit je her ein klassisches Betätigungsfeld für die sich mit der Gefäßmedizin befassenden Professionen. Der demographische Wandel und die damit verbundene Zunahme von Gefäßleiden wie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) einerseits und die Zunahme von chronischen Wunden bedingt durch metabolische Erkrankungen (Diabetes Mellitus) andererseits werden auch in Zukunft das Bild der vaskulären Medizin prägen (Debus 2013).

Neben der ausreichenden Behandlung der ätiologisch zu Grunde liegenden Pathologie (z.B. Revaskularisation bei pAVK, Infektsanierung, Behandlung des Diabetes mellitus) einer chronischen Ulzeration, gilt es vorhandene Wunden effektiv und schnell zur Abheilung zu bringen, um die Gesundheit des Patienten wiederherzustellen und langfristige Spätfolgen, wie zum Beispiel Amputationen für den Patienten zu vermeiden (Khanna und Tiwary 2016).

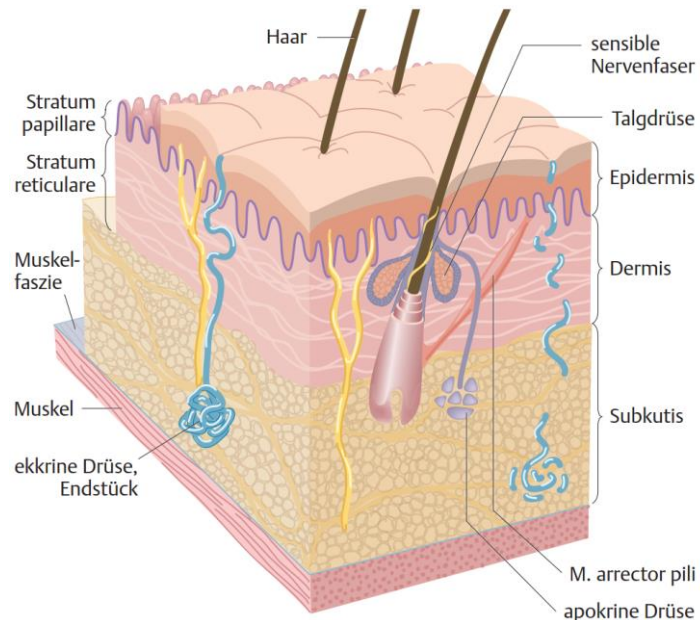
Abgesehen von den traditionellen lokalen Wundbehandlungsprinzipien (Debridement, feuchter Wundverband, Infektbehandlung und Antiseptik) gibt es bisher keine klinisch fest etablierten pharmazeutischen Wirkstoffe zur medikamentös-topischen Förderung der Wundheilung. Grundlagenmedizinisch werden verschiedenen Stoffen wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren entsprechende Effekte zugeschrieben, jedoch ist eine Validierung und Übertragung der experimentellen Erkenntnisse in die klinische Praxis bisher ausstehend (Bedürftig und Eder 2015). Die praxisnahe Untersuchung potentiell wundheilungsstimulierender Substanzen im direkten Patientenversuch ist durch hohe praktische und ethische Anforderungen limitiert, um dem „primum-nihil-nocere“-Prinzip nicht zu widersprechen (Eskes et al. 2012; Brölmann et al. 2013).

### **1.2 Anatomie und Physiologie humaner Haut und Wundheilung**

#### **1.2.1 Aufbau und Funktion intakter menschlicher Haut**

Die Haut bildet als Teil des Integuments die äußerste Schicht des menschlichen Körpers und ist gleichzeitig sein größtes Organ. Sie besteht aus mehreren Schichten, die den Körper zur Außenwelt hin abgrenzen (siehe Abbildung 1). Die äußerste Schicht wird als Cutis bezeichnet und setzt sich aus Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut) zusammen. Gemeinsam liegen sie der als Subkutis bezeichneten Unterhaut auf. Neben Zellen der glatten Muskulatur, Nerven, Blutgefäßen und Sinneszellen befinden sich in die Haut verschiedene Hautanhangsgebilde eingebettet, die der Haut ihre

umfangreichen und unterschiedlichen Funktionen ermöglichen. Hierzu gehören Haare (Pili), Nägel (Ungues) und verschiedene Hautdrüsen (Glandulae: Schweiß-, Talg- und Milchdrüsen). Darüber hinaus nimmt der Körper seine Umwelt über die in die Haut eingebetteten Zellen mit Rezeptoreigenschaften wahr (Serry und Czaika 2011; Herrmann und Trinkkeller 2015).



**Abbildung 1: Aufbau der Haut.** Darstellung des dreischichtigen Aufbaus der Haut aus Epidermis, Dermis und Subkutis, sowie Darstellung einiger Hautanhangsgebilde. Zudem ist der Aufbau der Dermis aus Stratum reticulare und Stratum papillare erkennbar. Aus Serry et al. 2010.

Die Haut dient ferner als Schutz- und Abgrenzungsbarriere zu unserer Umwelt. Sie schützt den Körper vor Wärme, Kälte, Mikroorganismen und mechanischen Reizen. Insbesondere die Zellen der obersten Hautschicht der Epidermis (= Hornschicht) verfügen über einen speziellen Zellwandaufbau (*cornified envelope*), deren lipidhaltiger Außenanteil ein Eindringen beziehungsweise Austreten von Flüssigkeiten verhindert und deren Proteine den Körper aktiv schützen (Serry et al. 2010; Candi et al. 2005).

Als Stoffwechselorgan kann die Haut Abbauprodukte des Körpers ausscheiden, aber auch Nährstoffe aufnehmen. Im geringen Maße dient die Haut zudem dem Gasaustausch mit der Umgebung. Eng verbunden mit der Funktion als Stoffwechselorgan sind die regulatorischen Möglichkeiten der Haut im Wasser- und Elektrolythaushalt (Transpiration). Als Interaktionsorgan ermöglicht die Haut über verschiedenste Sinneszellen die Wahrnehmung der Umwelt (Tast-, Druck-, Dehnungsrezeptoren). Schmerzrezeptoren warnen und bewahren den Körper vor Gefahren. Die Haut gibt dem Körper Auskunft über die Temperatur der Umgebung (Thermorezeptoren) und kann aktiv über die Thermoregulation die Temperatur des

Körpers beeinflussen (Serry et al. 2010; Tansey und Johnson 2015; Herrmann und Trinkkeller 2015)

Zusätzlich spielen die endokrinen Funktionen der Haut eine wichtige Rolle für den Organismus. Lange bekannt ist die Haut als Metabolisierungsort von 7-Dehydrocholesterol zu Cholecalciferol durch einfallende UV-Strahlung im Rahmen der Vitamin-D-Synthese. In den letzten Jahren setzt sich zunehmend die Erkenntnis durch, dass die Haut außerdem an den adreno-, thyreo- und gonadotropen Hormonregelkreisen sowie weiteren neuroendokrinen Prozessen beteiligt ist (Nejati et al. 2013; Zmijewski und Slominski 2011).

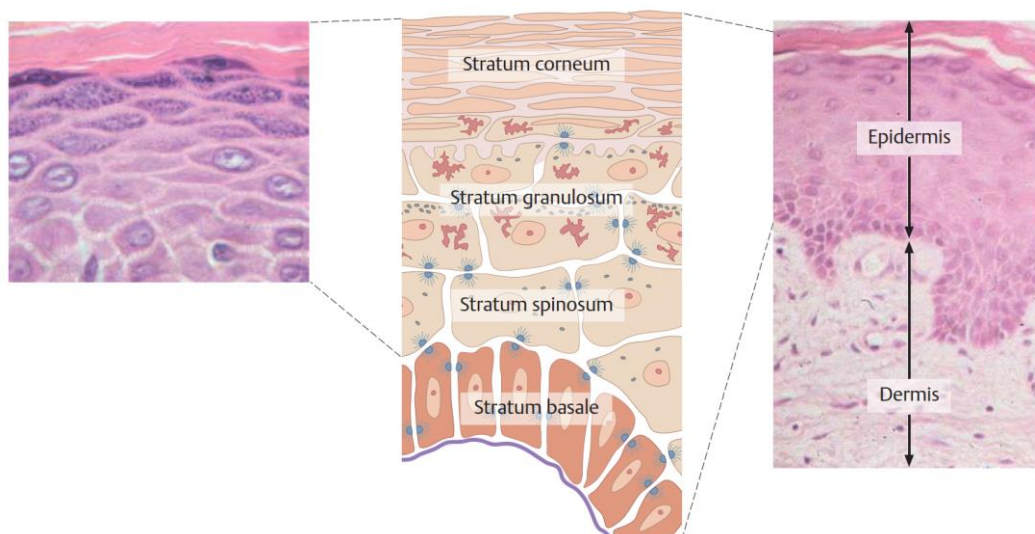
Über psychogalvanische Reaktionen wie Erröten oder die Piloerektion (Gänsehaut) übernimmt die Haut Funktionen der nonverbalen zwischenmenschlichen Kommunikation und Expression von Gefühlen (Kreibitz 2010; Benedek und Kaernbach 2011).

### **1.2.2 Keratinozytenproliferation und -differenzierung in der Epidermis**

Da die Epidermis für die kutane Wundheilung eine zentrale Rolle spielt, soll an dieser Stelle auf ihren Aufbau genauer eingegangen werden.

Histologisch ist die Epidermis aus einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel aufgebaut, dessen Zellen (= Keratinozyten) einem ständigen, konstanten Erneuerungsprozess unterliegen (siehe Abbildung 2). In der untersten Schicht – dem direkt der Basalmembran (Abgrenzung zur darunterliegenden Dermis) aufliegenden einschichtigen *Stratum basale* – befinden sich die epidermalen Stammzellen der Keratinozyten. Die hier durch Zellteilung neu gebildeten Zellen bilden die Grundlage für die konstante Regeneration der Epidermis. Die neu entstandenen Keratinozyten steigen in einem Differenzierungsprozess langsam Richtung Oberfläche auf und passieren dabei nacheinander folgende weiteren Schichten: Das drei- bis zehnschichtige *Stratum spinosum* ist durch seine feste Verbindungen (mittels Desmosomen) der Keratinozyten untereinander gekennzeichnet, die den Zellen mikroskopisch das namensgebende stachelige Aussehen verleihen. In dieser Schicht beginnt der Verhornungsprozess (Keratinisierung) der Hautzellen, eine Zellteilung ist nicht mehr möglich (Herrmann und Trinkkeller 2015). Darüber liegend folgt das *Stratum granulosum*. Die Keratinozyten dieser Schicht sind durch eine zunehmende Abflachung des Zellkörpers, die Bildung spezifischer Granula und durch die nach außen zunehmende Einlagerung spezifischer stabilisierender Proteine (z.B. Involucrin, Loricrin; siehe auch Abbildung 8 und Kapitel 1.4.6.3) in die Zellwand gekennzeichnet. Die abschließende Schicht bildet das *Stratum corneum* (Hornschicht). Die Keratinozyten dieser Schicht haben einen programmierten Zelltod (Apoptose) durchlaufen und werden als Korneozyten bezeichnet. Der Zellkern

und die Zellorganellen haben sich aufgelöst und die Zellmembran wurde durch eine spezielle Zellwandstruktur ersetzt, die als „cornified envelope“ bezeichnet wird. Diese avitale Anordnung besteht zum größten Teil aus Proteinen und Lipiden. Die Hornschicht umfasst je nach Lokalisation am Körper zwischen 20 und 200 Lagen, von der die äußersten Korneozytenschichten kontinuierlich als Hornschuppen (= Abschilferung) abgestoßen werden (Candi et al. 2005; Herrmann und Trinkkeller 2015). Der gesamte Prozess der Verhornung (Keratinisierung) dauert circa einen Monat. Neben der normalen physiologischen Orthokeratose sind Pathologien mit vermehrter (Hyperkeratosen) oder mangelhafter Verhornung (Hypokeratosen) bekannt (Sterry und Czaika 2011).



**Abbildung 2: Aufbau der Epidermis.** Schematische Darstellung des schichtweisen Aufbaus der Epidermis aus Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum, sowie entsprechende mikroskopische Abbildungen der korrespondierenden Bereiche. Aus Sterry & Czaika 2011.

### 1.2.3 Wundheilung beim Menschen

Die humane Wundheilung ist ein äußerst komplexer Prozess, in den eine Vielzahl von Zellen und Zellsignalmolekülen involviert ist. Im Nachfolgenden sollen die einzelnen Phasen der Wundheilung näher erklärt werden. Es hat sich etabliert, den Wundheilungsprozess in drei überlappende Phasen zu gliedern (Singer und Clark 1999). Unmittelbar nach Verletzung setzen Homöostase und Entzündung ein. Nach drei bis vier Tagen erfolgt ein Übergang in die Proliferations-/Migrationsphase. Abschließend kommt es nach mehreren Wochen zur Maturations-/Remodeling-Phase, in der die Wunde ihre endgültige, dauerhafte Konfiguration erhält (Singer und Clark 1999).

### **1.2.3.1 Hämostase und Koagulation**

Bei einer Verletzung der Haut kommt es zwangsläufig zur Eröffnung kleinerer, kapillärer oder größerer Blutgefäße mit daraus resultierender Blutung. Um den Körper vor Blutverlust zu bewahren, werden die unterschiedlichen Systeme der Blutgerinnung aktiviert.

Die plasmatische Gerinnung (durch die im Blutplasma vorhandenen Proteine) wird überwiegend über das sogenannte extrinsische System durch den Kontakt von Blut zu freiliegenden Gewebestrukturen aktiviert. Das auf subendothelialen Zellen freiliegende Thromboplastin (= Tissue Factor) setzt eine Gerinnungskaskade in Gang, an deren Ende die Polymerisation von Fibrinogen zu Fibrin steht (Martin 1997; Broughton et al. 2006). Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung der zellulären Blutgerinnung über die Thrombozyten. Sie binden über den von-Willebrand-Jürgens-Faktor an freiliegendes Kollagen (Thrombozytenadhäsion) und werden aktiviert (Thrombozytenaktivierung). Neben der Freisetzung von lokalen vasokonstriktorisches Substanzen (Thromboxan A<sub>2</sub>, Prostaglandin 2- $\alpha$ ), sorgen die aktivierten Thrombozyten für eine Selbstverstärkung ihrer Aggregation durch autokrine Signale (Sinno und Prakash 2013). Es kommt schließlich zur Bildung eines Blutgerinnsels (Koagel), das aus einem Netzwerk aus polymerisiertem Fibrin, Fibronectin, Vitronectin und eingelagerten Thrombozyten besteht. Dieses sorgt für einen primären Wund- und Gefäßverschluss und die Blutung kommt zum Stillstand. Daneben stellt dieses Blutgerinnsel ein vorübergehendes Gewebegerüst dar, über das die an der Wundheilung beteiligten Zellen an ihren Wirkungsort gelangen können (Broughton et al. 2006; Martin 1997; Singer und Clark 1999).

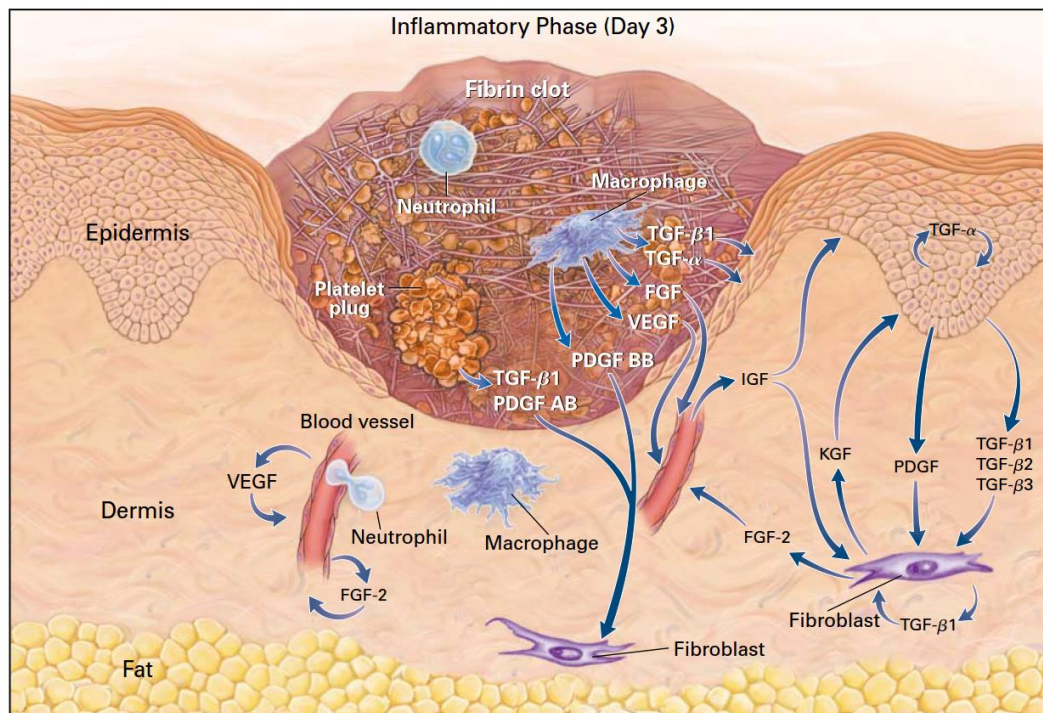
### **1.2.3.2 Beginn der Inflammationsphase durch Chemotaxis**

Das sich bildende Blutgerinnsel steht im Mittelpunkt der beginnenden Entzündungsphase. Innerhalb des Gerinnsels werden durch die Thrombozyten und verletzten Zellen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren freigesetzt, die im Blut zirkulierende Entzündungszellen an den Wundort rekrutieren (siehe Abbildung 3).

Angelockt durch sich im Thrombus akkumulierende proinflammatorische Signalmoleküle (u.a. von degranulierenden Thrombozyten sezerniert) wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Transforming Growth Factor Beta (TGF $\beta$ ) beginnen Leukozyten in die Wunde einzuwandern. Ihre Diapedese durch die Endothelwände der benachbarten, noch intakten Kapillaren wird durch ein verändertes Expressionsmuster von Selektinen gefördert. Neutrophile Granulozyten und Monozyten rollen langsamer im Blutstrom (Haftung über Integrine an Selektinen), um dann in den Extrazellulärraum

auszutreten und zur Wunde zu gelangen (Falanga 2005; Barrientos et al. 2008). Auch andere Zytokine wie Interleukine, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), der saure pH-Wert der Wunde und Fragmente von Bakterien bzw. Abbau- und Spaltprodukte des Fibringerinnsels stellen chemotaktisch wirksame Signale dar, die neutrophile Granulozyten und Monozyten zur Wunde zu leiten.

Die phagozytierenden Immunzellen haben zwei Funktionen. Zum einen schützen sie den Körper vor bakteriellen Infektionen und entfernen Zelltrümmer und andere Verschmutzungen aus der Wunde. Zum anderen sezernieren sie Zytokine, die die Entzündung in Gang halten. Proteolytische Substanzen aus neutrophilen Granulozyten lösen nichtvitale Proteine und Kollagene auf. Unverletztes Gewebe wird dabei durch Proteaseinhibitoren geschützt. Im Zeitraum von 48 - 96 Stunden nach Verletzung modifizieren sich die eingewanderten Monozyten zu ortsständigen, immobilen Gewebemakrophagen um. Die von ihnen freigesetzten Mediatoren nehmen fortan eine zentrale, dirigierende Rolle in der Wundheilung ein. Sie haben Einfluss auf die Fibroblasten (über Interleukine und TNF $\alpha$ ), die Keratinozyten (u.a. über TGF $\beta$ ) und steuern die Angiogenese (Vascular Endothelial Growth Factor = VEGF). Wie die neutrophilen Granulozyten produzieren die Makrophagen eine beachtliche Menge an Enzymen mit abbauenden Eigenschaften, die ihrerseits zum Wunddebridement beitragen. Ohne die vermittelnde Rolle der Gewebemakrophagen kann es zu schweren Wundheilungsstörungen kommen (Broughton et al. 2006; Singer und Clark 1999; Sinno und Prakash 2013).



**Abbildung 3: Inflamationsphase der Wundheilung.** Während der Inflamationsphase tragen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Chemokinen über vielfältige sich gegenseitig beeinflussende Signalwege zur Koordination der unterschiedlichen Zellen bei. Dabei dient der in der Hämostase entstandene Koagel als vorläufiges Gewebegerüst für die nachfolgenden Zellen der Wundheilung (z.B. Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten). Die in ihm enthaltenen Plättchen sind ebenfalls chemotaktisch aktiv. Aus Singer & Clark 1999.

### 1.2.3.3 Reepithelialisierung durch Keratinozytenproliferation und –migration

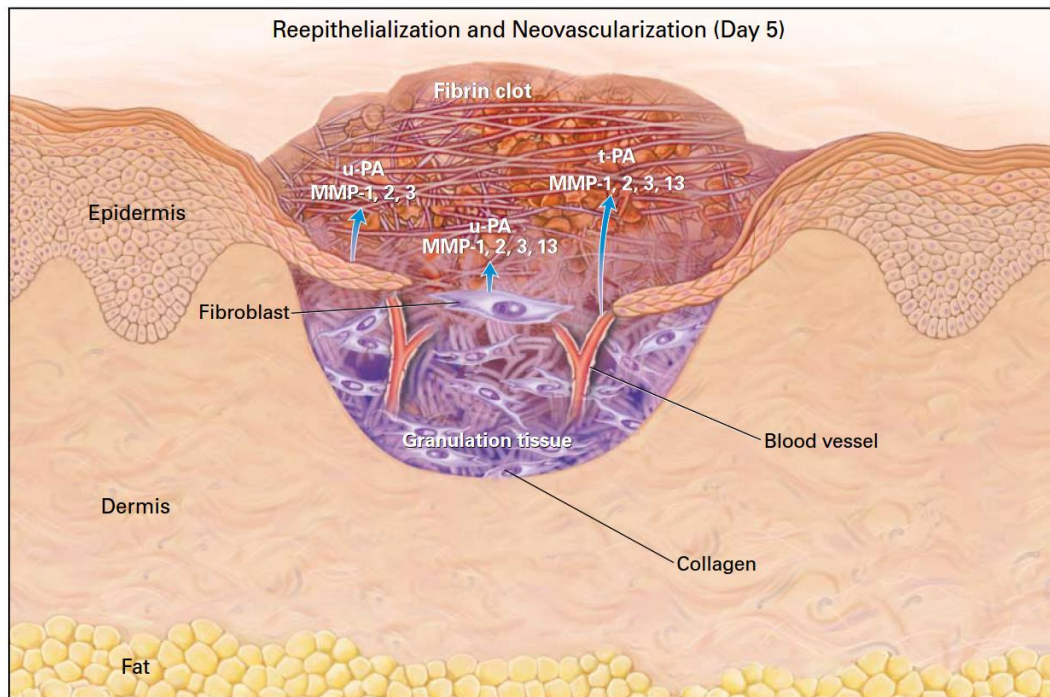
Bei oberflächlichen Wunden, bei denen nur die Epidermis verletzt wurde und die Basalmembran intakt geblieben ist, erfolgt die Wundheilung über den Prozess der zyklischen Keratinozytenerneuerung wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben. Dieser Prozess dauert zwei bis drei Tage und Verletzungen dieser Art heilen narbenlos ab.

Bei der Mehrzahl der Wunden ist jedoch die Basalmembran mitverletzt und es kommt zu einer Kontinuitätsunterbrechung in der Epidermis. Dieser Defekt kann, von zwei Punkten aus, durch eine Reepithelialisierung via Zellmigration von neuen Keratinozyten behoben werden: Einerseits kann die Zellmigration von den Wundrändern ausgehen und zum anderen von den Überresten der Hautanhangsgebilde wie Haarfollikeln oder Schweißdrüsen, die tiefer in die Dermis hineinreichen und die durch die Verletzung verschont geblieben sind (Martin und Nunan 2015; Martin 1997; Pastar et al. 2014).

Damit die Keratinozyten migrieren können, müssen sie ihre bisherige enge Verbindung (über Hemidesmosomen) zur Extrazellulärmatrix lösen. Dies geschieht unter anderem durch einen Shift in der Expression der beteiligten Integrine. Die neuexprimierten Integrine vermitteln Bindungen an die Bestandteile des Blutgerinnsels

(z.B. Fibrin, Vitronectin) bzw. des subdermalen Bindegewebes (Kollagene) und ermöglichen eine Bewegung der Keratinozyten entlang dieser Strukturen (Falanga 2005). Die migrierenden Keratinozyten sind zu dem in der Lage behindernde Strukturen aufzulösen. Ähnlich wie im Rahmen des Wunddebridements durch Makrophagen können sie Matrixmetalloproteasen (MMPs), Kollagenasen und andere Enzyme lokal sezernieren, um ihr Vorankommen zu sichern. Von den Keratinozyten werden die Gene für die Produktion von Tissue Plasminogen Activator (tPA) und Urokinase Plasminogen Activator (uPA) hochreguliert, um die fibrinösen Anteile des Blutgerinnsels abzubauen (siehe auch Abbildung 4; Singer und Clark 1999).

Ausgelöst wird die Keratinozytenmigration vornehmlich durch chemotaktische Signale aus den Makrophagen und Thrombozyten. Neben PDGF, EGF (Epidermal Growth Factor) und TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ) aus diesen Zellen, haben auch KGF 1/2 (Keratinocyte Growth Factor 1/2) und IL-6 (Interleukin 6) aus Fibroblasten eine keratinozytenmigrationsfördernde Wirkung (Barrientos et al. 2008; Broughton et al. 2006; Pastar et al. 2014). Reicht die Anzahl der Keratinozyten an den Wundrändern nicht aus, um große Defekte zu reepithelialisieren, kommt es zu einer rapiden Steigerung der Keratinozytenproliferation im Stratum basale, um diesen Bedarf zu decken (*proliferative/mitotic burst*). Der Effekt wird im Wesentlichen zeitgleich über die gleichen Mediatoren vermittelt wie die Migration. Eine Selbststimulation der Keratinozyten durch auto- und parakrine Signalübertragungswege hält diesen Prozess zusätzlich in Gang (Falanga 2005; Martin 1997; Pastar et al. 2014).



**Abbildung 4: Proliferations-/Migrationsphase der Wundheilung.** Ausgehend von den Wundrändern erfolgt die Reepithelisation durch Keratinozytenmigration. Dabei wird sukzessive das Fibringerinnsel durch neue Extrazellulärmatrix ersetzt. Zur Auflösung des Gerinnsels tragen unter anderem Plasminogen Aktivtoren bei, die von den Keratinozyten sezerniert werden. Aus Singer & Clark 1999.

#### 1.2.3.4 Wiederaufbau der Extrazellulärmatrix durch Fibroblasten, Angiogenese und Wundverschluss

Neben der Keratinozytenstimulation ist eine Förderung der Fibroblastenmigration und -proliferation notwendig, da parallel zur Epidermis auch die Extrazellulärmatrix neu aufgebaut werden muss. Hierbei sind PDGF und EGF aus den Makrophagen und Thrombozyten des Blutgerinnsels die Hauptstimulanzen. Fibroblasten wandern aus dem umliegenden Gewebe ein und beginnen mit der Produktion einer provisorischen Extrazellulärmatrix aus Kollagen Typ III, Glykosaminoglykanen und Fibronectin, nachdem sie sich als dauerhafte Wundfibroblasten in der Wunde niedergelassen haben (siehe Abbildung 4; Werner et al. 2007).

Alle diese Prozesse bedürfen einer suffizienten Nährstoffversorgung durch Blutgefäße. Deshalb hat die parallele Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) einen entscheidenden Anteil an der Wundheilung. Die wichtigsten angiogenetisch wirksamen Substanzen sind  $\text{TNF}\alpha$ , VEGF,  $\text{TGF}\beta$  und bFGF (basic Fibroblast Growth Factor; Tonnesen et al. 2000). Über deren Freisetzung induzieren hauptsächlich Keratinozyten, aber auch Makrophagen und Fibroblasten das Endothelwachstum und die Neubildung von kapillären Strukturen. Interessanterweise müssen die Endothelzellen spezifisch entweder das Integrin  $\alpha\text{v}\beta 3$  (für bFGF und  $\text{TNF}\alpha$ ) oder  $\alpha\text{v}\beta 5$  (VEGF und  $\text{TGF}\beta$ )

exprimieren, um dann ein Endothelwachstum zu ermöglichen (Newman et al. 2011; Silva et al. 2008). Sind diese Integrine nicht funktionsfähig oder werden durch Antikörper blockiert, findet keine Angiogenese statt. Letzteres ist als therapeutisches Ziel in den Fokus neuer Therapien in der Krebsforschung gerückt (Weis und Cheresch 2011).

Außerdem ist die Hypoxie in und an der Wunde ein zusätzlicher Stimulator für die Endothelzellen Stickstoffmonoxid (NO) zu produzieren, das wiederum zu einer Erhöhung der VEGF-Konzentration führt. Hierbei handelt es sich um ein weiteres Beispiel für einen Selbstverstärkungsprozess in der Wundheilung (Broughton et al. 2006).

Überlappend mit der Ablagerung neuer Extrazellulärmatrix durch die Fibroblasten kommt es zu einer Wundkontraktion. Durch die Adaptation der Wundränder wird ein schnellerer Verschluss des Defektes erreicht, da kürzere Distanzen den Keratinozyten eine schnellere Reepithelialisierung ermöglichen. Für die Wundkontraktion sind Myofibroblasten verantwortlich, die sich durch Transformation (Induktion über TGF $\beta$ 1 aus Makrophagen) aus residualen Wundfibroblasten entwickeln (Broughton et al. 2006; Gurtner et al. 2008).

Der Wiederaufbau der Extrazellulärmatrix verlangsamt sich mit der Zeit durch die Abnahme der Anzahl und Aktivität der Fibroblasten. Unter anderem vermittelt Interferon-Inducible Protein (IP-10) eine Unterdrückung der Fibroblastenmigration zur Wunde. Zusätzlich wird die Fibroblastenproliferation und auch die Angiogenese durch Platelet Factor 4 (PF4) reduziert beziehungsweise gehemmt (Henry und Garner 2003; Perollet et al. 1998).

#### **1.2.3.5 Maturation und Remodeling**

Über den Verlauf von mehreren Wochen kommt es zu einem Umbau der primären Extrazellulärmatrix in ein dauerhaftes Narbengewebe. Das zunächst eher ungeordnete, dünnere Kollagengewebe vom Typ III mit einer Ausrichtung parallel zur Haut wird dabei durch dickeres, stabiles Kollagen vom Typ I ersetzt. Die Ausrichtung von diesem orientiert sich zudem vermehrt entlang der mechanischen Zugbelastungslinien, was der späteren Narbe eine größere Reißfestigkeit verleiht. Das Kollagengewebe der gebildeten Narbe unterscheidet sich biochemisch von normalem Hautkollagengewebe durch mehr Hydroxylierungen und vermehrte Glykolisierungen an Lysinresten. Trotz der stetigen Zunahme der Reißfestigkeit der Narbe (ca. 3 % nach der ersten Woche, 30 % nach der dritten Woche), wird sie mit maximal ca. 80 % nicht mehr die volle Belastbarkeit unverletzter Haut erreichen (Broughton et al. 2006; Gurtner et al. 2008). Die Kollagensynthese und somit der Maturations- und Remodelingprozess sind in

Abhängigkeit von der Wundgröße frühestens nach vier bis fünf Wochen abgeschlossen. Bei großen Wunden kann er bis zu einem Jahr dauern (Broughton et al. 2006).

### **1.3 Wundheilungsstörungen im klinischen Kontext**

#### **1.3.1 Pathogenese von Wunden und Wundheilungsstörungen**

Wunden werden an Hand ihrer Entstehungsgeschichte als akute oder chronische Wunden klassifiziert. Akute Wunden heilen nach den in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Prozessen über den Verlauf von zwei bis vier Wochen hinweg aus. Man spricht von einer chronischen Wunde, wenn diese akute Wundheilung verlangsamt oder unphysiologisch abläuft und es nach acht Wochen (Definition nach Leitlinie der AWMF; Burckhardt et al. 2012) nicht zu einem Wundverschluss gekommen ist. Bestehen zusätzlich zum zeitlichen Kriterium der chronischen Wunde Hinweise auf eine bakterielle Besiedlung der Wunde verbunden mit den klinischen Zeichen einer Entzündung (Tumor, Rubor, Calor, Dolor, Functio laesa) so wird diese als „komplizierte Wunde“ bezeichnet (Velnar et al. 2009).

Die zugrundeliegenden Ursachen für komplizierte Wunden sind vielfältig, jedoch ist allen gemein, dass bei ihnen der feinregulierte Prozess der Wundheilung an einer Stelle aus dem Gleichgewicht geraten ist. Oft ist es nicht ein singulärer Umstand der einer Wundheilungsstörung zu Grunde liegt, sondern vielmehr die überlappende Kombination mehrerer Faktoren, die sich gegenseitig herbeiführen bzw. verstärken und so zu chronischen Wunden führen (Velnar et al. 2009). Die wichtigsten Risikofaktoren werden im Folgenden exemplarisch dargestellt.

#### **1.3.2 Risikofaktoren für chronische Wundheilungsstörungen**

Die Risikofaktoren für die Entwicklung von chronischen Wundheilungsstörungen und dauerhafte Wunden sind vielgestaltig. Als ein weithin anerkannter Risikofaktor gelten verschmutzte und mikrobiell kontaminierte Wunden, da diese ein hohes Risiko für Infektionen besitzen. In einer infizierten Wunde findet eine Immunantwort und -reaktion ausgerichtet auf die Bekämpfung des eindringenden Mikroorganismus statt. Viele Mikroorganismen verfügen über pathogene Strukturen, die die Inflammation über die gleichen Immunzellen (z.B. neutrophile Granulozyten und Makrophagen) und Signalmoleküle vermittelt wie die physiologische Wundheilung. Durch Fehl- und Überstimulierung gerät das feinregulierte Wundheilungsmuster der Zytokine bei einer Infektion aus der Balance und es kann zu Wundheilungsstörungen kommen (Grice und Segre 2012).

Für eine erfolgreiche Wundheilung müssen Nährstoffe und Sauerstoff in ausreichendem Maße im Wundbereich zur Verfügung stehen. Ein Mangel an diesen Stoffen kann in einer einseitigen Fehlernährung oder Kachexie auf Grund anderer Krankheiten (z.B. Tumorerkrankungen) begründet sein (Kavalukas und Barbul 2011). Auch die veränderte Stoffwechsellage bei Diabetikern ist hierunter aufzuführen. Neben den metabolischen Entgleisungen im Rahmen des Glucosestoffwechsels sind die betroffene Patienten prädisponiert für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Wundheilungsstörungen. Bei Diabetikern entstehen Wunden einerseits leichter durch polyneuropathisch bedingte Defizite in der taktilen und nozizeptiven Wahrnehmung (Hypästhesie und Hypalgesie) vornehmlich an den Füßen. Zusätzlich kann die Neuropathie die motorischen Nervenfasern betreffen, was in der Ausbildung von muskuloskelettalen Fußfehlstellungen münden kann (Charcot-Fuß), die wiederum lokale Druckulzerationen begünstigen (Alavi et al. 2014; Noor et al. 2015). Andererseits führen diabetische Mikro- und Makrozirkulationsstörungen zu einer Verringerung des Blutflusses und somit der Nährstoffversorgung einer Wunde. Die Konstellation von schwerheilenden Fußulzerationen bei diesen Risikofaktoren kann im als „diabetisches Fußsyndrom“ bezeichneten Krankheitsbild münden und geht dann nicht selten mit Amputationen einher (Falanga 2005; Tsourdi et al. 2013).

In gleichem Maße wie der Diabetes mellitus sind vaskuläre Pathologien ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung chronischer Wunden. Auf arterieller Seite ist die Ursache häufig eine periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Artherosklerotisch bedingte intravasale Plaqueablagerungen führen zu Stenosen und sukzessive zu Verschlüssen der Gefäße mit der Folge einer Minderperfusion und damit Mangelversorgung der Peripherie mit Nährstoffen und Sauerstoff (z.B. Muskeln, Wunden; Muller et al. 2013). Die zugrundeliegende Pathophysiologie mit wiederkehrenden Prozessen von Lipidablagerungen, endothelialer Dysfunktion, Inflammation, kleinen Plaquerupturen und intimaler Endothelregeneration ist dabei ähnlich wie bei der koronaren Herzkrankheit (Weber und Noels 2011; Sakakura et al. 2013). Als Risikofaktoren für diese Erkrankung und damit indirekt ebenso für Wundheilungsstörungen gelten Hyperlipidämie, arterieller Hypertonus, chronische Nierenfunktionsstörungen und der Diabetes mellitus (Eraso et al. 2014). Hauptursache ist jedoch der Nikotinabusus, dessen Stellenwert auf die Entwicklung einer pAVK im Vergleich höher liegt als bei der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung, wie in einem aktuellen Review ermittelt werden konnte (Lu et al. 2014).

Auf venöser Seite sind chronische Wunden fast ausschließlich einer chronisch-venösen Insuffizienz geschuldet. Die Ursachen hierfür sind zum Beispiel sekundäre Insuffizienzen nach Thrombosen im Rahmen eines postthrombotischen Syndroms,

Venenklappenfehlfunktionen, Angiodysplasien mit unphysiologischen venösen Flussverhältnissen oder als Folge einer langjährigen primären Varikosis. Allen Ätiologien ist gemeinsam, dass es durch die chronische Stauung zu einer Erhöhung des Drucks im venösen System kommt (Wittens et al. 2015). Die seit vielen Jahrzehnten bestehende Theorie, dass die lokale Hypertension eine Nähr- und Sauerstoffmangelversorgung bedinge (u.a. durch lokale Fibrinausschwitzungen: *fibrin cuff theory*), die zur Ulkusbildung führen, wurde in den letzten Jahren ergänzt um Konzepte, die die chronischen Inflammations- und Remodelingprozesse in den Fokus rücken (*white blood cell theory*). Gemeinhin anerkannt ist, dass die Veränderung der venösen Hämodynamik zu einer Entzündungskaskade aus Leukozytenaktivierung, Endothelveränderungen, Freisetzung von Zytokinen und zellulären Umbauprozessen führt, die letztendlich in einer chronischen Wunde resultieren kann (Comerota und Lurie 2015; Eberhardt und Raffetto 2014; Raffetto 2013). Schließlich ist die Relevanz der venösen Gefäße im Sinne eines Drainagesystems für Wunden nicht zu unterschätzen. Über den venösen (und lymphatischen) Abfluss werden zelluläre Wundabfallprodukte entfernt und eliminierte Infektionserreger/-toxine zu den Exkretionsorganen Leber/Darm und Nieren abtransportiert (Grissmer et al. 2012).

Auch bei immunsupprimierten Patienten (zum Beispiel medikamentös induziert nach Transplantationen und/oder Steroiddauertherapie bei rheumatischen/immunologischen Krankheiten; immunsuppressive Krankheiten wie AIDS = Acquired Immune Deficiency Syndrome) können die notwendigen Wundheilungsprozesse beeinträchtigt und die Entwicklung chronischer Wunden begünstigt sein (Bootun 2013). In diesem Zusammenhang ist für Tumorpatienten eine besondere Vulnerabilität für Wundheilungsstörungen festzustellen. Neben der per se konsumierenden Grunderkrankung mit kataboler Stoffwechsellage und Mangelernährung, fördern die immunsuppressiven Nebenwirkungen einer Chemotherapie die Chronifizierung von Wundprozessen. Strahlendinduzierte Schäden an Haut und Bindegewebe im Rahmen einer Radiotherapie können als zusätzlicher Faktor auftreten (Payne et al. 2008).

Bettlägerigkeit und Immobilisation sind die Hauptursachen für die Entstehung von Druckgeschwüren (Dekubitalulkus). Hiervon sind vorrangig pflegebedürftige, ältere Menschen (z.B. nach Schlaganfall) oder Personen mit Schäden des Nervensystems (z.B. nach Schädel-Hirn-Trauma, Komapatienten, neurodegenerative Erkrankungen) betroffen (Medical Advisory Secretariat 2009), denen die Möglichkeit zur Selbstmobilisation fehlt (Moore und Cowman 2015).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass folgende Patientengruppen auf Grund zusammenfallender Risikokonstellationen für die Entwicklung chronischer

Wunden in besonderem Maße prädisponiert sind: ältere Menschen, Raucher, Diabetiker, Tumorpatienten und immobilisierte Menschen.

### **1.3.3 Epidemiologische Betrachtung assoziierter Krankheiten**

Konkrete Angaben zu Inzidenzen und Prävalenzen von chronischen Wunden sind schwierig zu ermitteln, da in vielen Studien unterschiedliche Definitionen und Betrachtungsweisen zu Grunde gelegt werden (Graves und Theng 2014). Im Allgemeinen werden die Häufigkeitsangaben gemäß den Hauptursachen chronischer Wunden gemacht.

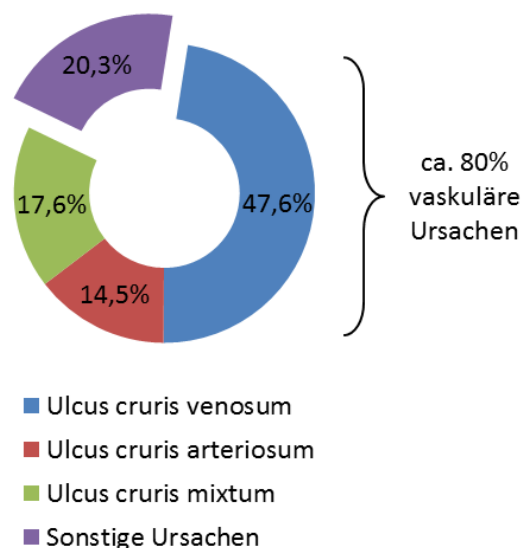
Die Prävalenz der Druckgeschwüre ist in internationalen Studien scheinbar abhängig vom Ort der Erhebung: sie schwankt zwischen 1,1 % - 26,7 % in Krankenhäusern und 7,6 % - 53,2 % in Pflegeeinrichtungen (Graves und Theng 2014). Für Deutschland geht man von einer Gesamtprävalenz von 9,2 % aus, wobei die Zahlen für Krankenhäuser (5 % - 10 %) und Pflegeeinrichtungen (30 %) in der Größenordnung den internationalen Studien entsprechen (Anders et al. 2010). Regionale Unterschiede in Deutschland können dabei zumindest zum Teil den unterschiedlichen Versorgungsstrukturen zugeschrieben werden (Kröger et al. 2014).

Diabetisch bedingte Ulzerationen stellen die zweite große Gruppe im Spektrum der chronischen Wunden dar. Weltweit sind im ambulanten Bereich zwischen 0,02 % - 10 % der Bevölkerung betroffen, während die Prävalenz im Krankenhausbereich mit 1,2 % - 20,4 % höher eingeschätzt wird (Graves und Theng 2014). In Deutschland lag die Gesamtprävalenz des Diabetes mellitus im Jahr 2012 bei ca. 8 % der erwachsenen Bevölkerung, wie das Robert-Koch-Institut ermittelt hat (Hoebel et al. 2014). Dies entspricht bei einer Bevölkerung von 80,5 Mio. Menschen einer Zahl von circa 6,44 Millionen Diabetikern (eigene Berechnung nach Zahlen des Statistischen Bundesamts 2012). Die Prävalenz steigt mit dem Lebensalter an und liegt ab 65 Jahren bei 17,4 % für Frauen und 18,6 % für Männer. Regional betrachtet weisen Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen und Sachsen-Anhalt die höchsten Prävalenzraten auf (Hoebel et al. 2014). Der Anteil an Diabetikern, die als Komplikation ihrer Krankheit wiederum ein behandlungsbedürftiges Ulkus aufweisen, liegt bei 2,9 % (Sämann et al. 2008). Bei angenommen 6,44 Millionen Diabetikern in Deutschland entspricht dies einer Anzahl in der Größenordnung von circa 187.000 Patienten (eigene Berechnung). Pro Patient und Jahr entstehen dabei für die Behandlung Kosten von 2611 € (Korber et al. 2013).

Die Prävalenz von chronischen Beingeschwüren (Ulcus cruris) aller nicht-diabetischen Ursachen liegt in internationalen Studien bei 0,6 % - 3,6 % der Bevölkerung (Graham et al. 2003). Es wird geschätzt, dass in Deutschland ca. 3 - 4 Millionen

Menschen betroffen sind (Purwins et al. 2010). Innerhalb dieser Gruppe ist der weitaus größte Anteil (ca. 80 %) auf eine vaskuläre Ursache zurückzuführen (siehe Abbildung 5). Körber et al. konnten mit ihrer Studie an 31.619 Patienten zeigen, dass die Verteilung in Deutschland ähnlich der in anderen Ländern der westlichen Welt ist: 47,6 % der Ulcera sind überwiegend venös bedingt, 17,6 % haben eine gemischt arteriell-venöse Ätiologie. Eine rein arterielle Genese wird bei 14,5 % der Patienten angenommen. Die restlichen 20,3 % umfassen verschiedenste, seltenere Ursachen für chronische Beinulzerationen wie zum Beispiel Vaskulitiden, Pyoderma gangraenosum, Neoplasien oder Calciphylaxie (Körber et al. 2011). Eine aktuelle Auswertung von Routinedaten des Patientengutes der Barmer GEK Krankenversicherung bestätigt die Größenordnung der Verteilung. Hier wurde für das Jahr 2012 die Gesamtprävalenz eines floriden Ulcus cruris von 0,28 % ermittelt. Standardisiert und auf die Bevölkerung Deutschlands bezogen ergeben sich rechnerisch 210.000 Betroffene. Die standardisierte populationsbezogene 4-Jahres-Inzidenz beträgt 249 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner bzw. ca. 50.000 Neumanifestationen pro Jahr in Deutschland. Die ätiologische Verteilung ist vergleichbar den von Körber et al. ermittelten Anteilen: venös 67,37 %; arteriell 18,05 %, gemischt 13,39 %, nicht näher bezeichnet 11,50 % (Heyer und Augustin 2014). Die Behandlung der chronischen Beingeschwüre ist dabei mit hohen sozioökonomischen Kosten verbunden. Pro Patient und Jahr wird durchschnittlich ein rechnerischer Betrag von 9569 € an direkten und indirekten Behandlungskosten aufgewandt (Purwins et al. 2010).

### Ätiologie der Ulcera crura



**Abbildung 5: Ätiologie der Ulcera crura.** Die große Mehrzahl (ca. 80 %) der Ulcera crura in Deutschland sind auf vaskuläre Ursachen zurückzuführen. Eigene Darstellung in Anlehnung an Körber et al. 2011.

Betrachtet man die unterschiedlichen Ursachen der chronischen Beingeschwüre individuell so ergibt sich folgendes Bild:

Die venös bedingten Ulzerationen weisen im internationalen Vergleich eine Prävalenz von 0,05 % - 1 % in der ambulanten Bevölkerung auf. Die Inzidenzraten liegen dabei zwischen 0,02 % - 0,35 % innerhalb eines Jahres (Graves und Theng 2014). Die Zahlen für Deutschland liegen im internationalen Durchschnitt, wie die Bonner Venenstudie von 2002 ermitteln konnte (Prävalenz der abgeheilten oder floriden Ulcera 0,7 %, nur floride Ulcera 0,1 %; Rabe et al. 2003).

Die Datenlage zu arteriell bedingten Wunden ist limitiert. Graves und Theng konnten in ihrer Metaanalyse nur zwei internationale Studien zu dieser Fragestellung identifizieren, die eine Prävalenz von 0,01 % und eine Einjahresinzidenz zwischen 0,02 % - 0,35 % angeben (Graves und Theng 2014). Betrachtet man hilfsweise die pAVK als Hauptursache arterieller Wunden, so gehen länderübergreifende Schätzungen von einer Prävalenz von 5,28 % für Frauen im Alter von 45 - 49 Jahren in Industrieländern aus (Männer 5,41 %). Die Prävalenz steigt mit dem Alter an und erreicht Werte von 18,38 % in der Altersgruppe der 85 - 89jährigen Frauen (Männer 18,83 %; Fowkes et al. 2013). Die der pAVK zugeschriebenen Todesfälle sind in Westeuropa von 1,37 Fällen pro 100.000 Personen im Jahr 1990 auf 3,47 Fälle pro 100.000 Personen im Jahr 2010 gestiegen (Sampson et al. 2014). Der Trend zur Zunahme der pAVK ist auch in Deutschland nachzuvollziehen, wie es sich aus den steigenden Krankenhausinzidenzen ableiten lässt (Eckstein et al. 2014). Die Anzahl der Krankenhausesfälle mit der Hauptdiagnose einer pAVK im Stadium III/IV ist von 70.943 Fällen im Jahr 2005 auf 97.750 Fälle im Jahr 2013 angestiegen (Eckstein und Kühnl 2015). Die allgemeine Prävalenz wird dabei zwischen 3 % und 10 % angenommen und steigt auf 15 % - 20 % für die Gruppe der über 70jährigen Patienten an (Diehm et al. 2004; Kröger et al. 2006; Espinola-Klein et al. 2008; Espinola-Klein 2011).

#### **1.3.4 Topische Wundtherapeutika und lokale Therapieoptionen bei chronischen Wunden**

Für eine erfolgreiche Therapie von chronischen Wunden sollte primär die zugrundeliegende Pathologie adäquat behandelt werden. Dies beinhaltet eine konsequente Therapie des Diabetes mellitus, bei venösen Ulzerationen im allgemeinen eine Kompressionstherapie bei zu grundlegender chronisch-venöser Insuffizienz und für arterielle Läsionen die Evaluation hinsichtlich revaskularisierender Maßnahmen (z.B. chirurgische Bypass-Anlage oder endovaskuläre Intervention). Dekubitalgeschwüre sollten durch entsprechende präventive Maßnahmen (Druckentlastung durch z.B. regelmäßige Lagerungswechsel) primär verhindert werden (Burckhardt et al. 2012).

Darüber hinaus stehen verschiedene lokale Therapieoptionen zur Verfügung, die die Abheilung chronischer Wunden fördern sollen.

Damit Wunden heilen können benötigen sie ein feuchtes Wundmilieu, das durch unterschiedliche Wundverbände erreicht werden kann. Je nach klinischem Zustand der Wunde existieren Wundauflagen, die eine übermäßige Wundsekretion aufnehmen können (z.B. Alginate, Superabsorber), die trockene Wunden feuchthalten (z.B. Hydrogele) oder Materialien, deren feuchtigkeitsregulierende Wirkung dazwischen anzusiedeln ist (z.B. Schaumverbände, Hydrokolloide) (Bedürftig und Eder 2015; Burckhardt et al. 2012). Die Kombination von Wundverbänden mit Silber-Komponenten als lokalen, antimikrobiellen Wirkstoff wird von vielen Herstellern angeboten. Die Wirksamkeit von Silber ist jedoch wissenschaftlich weiterhin nicht eindeutig belegt (Storm-Versloot et al. 2010; Toy und Macera 2011). Die topische Antibiotikaaanwendung bei Nachweis eines mikrobiellen Keims in einer chronischen Wunde ist weitestgehend obsolet (Klein et al. 2013). Hinsichtlich der systemischen Anwendung besteht aktuell die Empfehlung, diese nur bei Patienten mit den klinischen Zeichen einer Infektion anzuwenden, da ein positiver Effekt auf die Wundheilung nicht-infizierter Wunden nicht belegt werden kann (Dissemond 2014; O'Meara et al. 2014). Für die seit vielen Jahren postulierte wundheilungsfördernde Wirkung von Honig in topischer Anwendung bei chronischen Wunden gibt es nach Analyse der Cochrane Collaboration keine belastbare evidenzbasierte Grundlage (Jull et al. 2015).

Als lokales Verfahren ist zudem die Wundunterdrucktherapie (*negative pressure wound therapy*) etabliert. Dabei wird mittels eines auf die Wunde aufgelegten Schaumswammes und eines okklusiven Folienverbandes ein luftdichtes Wundkompartiment geschaffen, an das eine Saugpumpe angeschlossen wird. Durch kontinuierlichen Unterdruck wird die Granulation der Wunde gefördert. Trotz breiter klinischer Anwendung sind die evidenzbasierten Belege der Wirksamkeit bisher als gering bis unzureichend zu bewerten, wie die aktuellen Reviews der Cochrane Collaboration aufzeigen (Dumville et al. 2013; Dumville et al. 2015a; Dumville et al. 2015b).

Weitere lokal-physikalische Verfahren zur Stimulation der Wundheilung umfassen unter anderem die Elektrostimulationstherapie, die hyperbare Sauerstofftherapie, die Anwendung von Magnet- oder Stoßwellen und der therapeutische Ultraschall. Die Evidenzlage lässt für die meisten Verfahren keine Schlussfolgerungen hinsichtlich Nutzen oder Schaden der Therapieformen zu. Lediglich die hyperbare Sauerstofftherapie wird beim diabetischen Fußsyndrom nach Ausschöpfung revaskularisierender Maßnahmen als zusätzliche Therapieoption empfohlen.

Bei venösen Ulzerationen kann eine Magnetfeldtherapie erwogen werden (S3-Leitlinie Lokalthherapie chronischer Wunden; Burckhardt et al. 2012; Kranke et al. 2015).

Die regenerative Medizin bietet verschiedene neue Ansätze zur topischen Wundheilungsförderung. In der lokalen Anwendung von Wachstumsfaktoren ist in den USA PDGF (Becaplermin) zugelassen. Der Wirkstoff wurde aber in Europa 2011 auf Grund der vermuteten Wachstumsunterstützung gleichzeitig bestehender maligner Erkrankungen vom Markt genommen. FGF (Fibroblast Growth Factor) und EGF wurden in kleinen Studien in Asien und Kuba getestet (Frykberg und Banks 2015). Vielversprechend ist die Gewinnung von körpereigenen Thrombozyten, Wachstumsfaktoren und Fibrin aus Patientenblut und deren direkte, autologe Anwendung auf die Wunden des Patienten. Dieser Platelet-Rich-Fibrin/Plasma-Therapie (PRF/PRP-Therapie) wird eine gute Wirksamkeit insbesondere bei diabetischen Ulzerationen zugeschrieben, auch wenn weitere Studien zur Effektivität als notwendig betrachtet werden (Picard et al. 2015; Martinez-Zapata et al. 2012).

Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse aus der grundlagenmedizinischen Wundheilungsforschung an Stammzellen finden zunehmend ihren Weg in die Behandlung beim Menschen. In mehreren Fallbeschreibungen und kleinen Studien über die topische Anwendung von autologen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (Bone Marrow - Mesenchymal Stem Cells = BM-MSC) zeigen sich vielversprechende heilungsfördernde Aspekte auf chronische Wunden. Auch an Stammzellen aus dem Fettgewebe (Adipose Tissue - Mesenchymal Stem Cells = AT-MSC) wird in dieser Richtung geforscht. Es bleibt abzuwarten, ob die breite medizinische Anwendung und Übertragung in den klinischen Alltag in den nächsten Jahren gelingt (Amato et al. 2015; Li et al. 2015).

#### **1.4 Überblick über etablierte Wundheilungsmodelle**

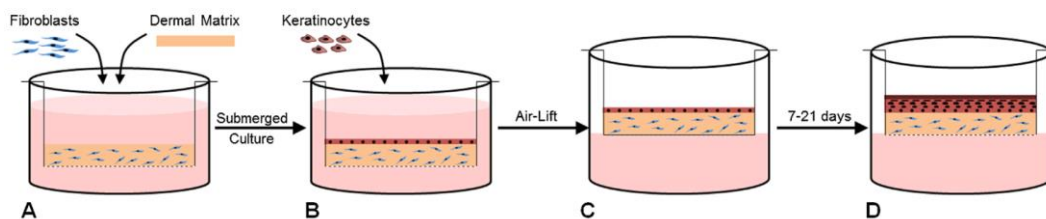
In der experimentellen Wundheilungsforschung sind verschiedene Modelle etabliert, deren Spektrum von einfachen Zellkulturen über komplexere tierexperimentelle Versuche bis zur klinischen Anwendungsforschung am Menschen reicht. Die Ansprüche an Durchführbarkeit und die Validität bzw. Übertragbarkeit der erworbenen Erkenntnisse variieren je nach Modell. Im Folgenden werden die wichtigsten Aspekte etablierter Wundheilungsmodelle in einer Übersicht dargestellt, anschließend wird näher auf das humane Vollhautkultursystem eingegangen.

### 1.4.1 Zellmigrationsmodelle und Scratch-Assay

Zellmigrationsmodelle sind seit vielen Jahren bekannt und in der biomedizinischen Forschung weit verbreitet. Das ursprünglich von Boyden für die Untersuchung der Leukozytenchemotaxis entwickelte Modell ist vielfach angepasst und modifiziert worden (Chen 2005; Rodriguez et al. 2005). In Anlehnung daran ermöglicht das Scratch-Assay eine isolierte Betrachtung der Rolle der Keratinozyten in der Wundheilung (Liang et al. 2007). Eine Schicht von Keratinozyten wird auf einer Kulturplatte aufgetragen und diese dann artifiziell verletzt. Über die Beobachtung der Proliferations- und Migrationsprozesse werden Rückschlüsse auf die Wundheilung gezogen. Die bewusste Einfachheit des Modelles vernachlässigt jedoch die Tatsache, dass die physiologische Wundheilung ein viel komplexerer Vorgang ist, an dem alle Schichten der Haut intensiv beteiligt sind und der nicht nur auf die Keratinozyten beschränkt ist (Liang et al. 2007).

### 1.4.2 Hautäquivalenzmodelle

Realitätsnäher sind künstliche Hautmodelle, bei denen Fibroblasten und epidermale Keratinozyten in einer Kollagenmatrix eingebettet werden, die die Verhältnisse menschlicher Haut nachbilden soll (siehe Abbildung 6; Carlson et al. 2008). Diese Modelle erlauben eine gute Beobachtung von Wachstum und Differenzierung der Keratinozyten im Zusammenspiel mit Extrazellulärmatrix und Fibroblasten, deren wesentliche Rolle in der Extrazellulärmatrixproduktion anerkannt ist (Sriram et al. 2015). Verschiedene Hautäquivalenzmodelle werden von der Industrie als Fertigprodukte für die pharmakologische und kosmetische Forschung kommerziell angeboten (Mathes et al. 2014). Nachteilig ist die Fokussierung auf zwei dermale Zellpopulationen, außerdem vernachlässigen die Modelle die Bedeutung der Innervation, Blutversorgung, Hautanhangsgebilde und anderer Zellen (z.B. Immunzellen) für die Wundheilung, deren Bedeutung heute belegt ist (Busse et al. 2014; Sriram et al. 2015).



**Abbildung 6: Herstellung eines Hautäquivalenzmodells.** Fibroblasten und eine kollagene Grundmatrix werden in Organkultur gegeben (A), auf die dann eine Keratinozytenschicht aufgetragen wird (B). Nach Anhebung an die Luft-Organokultur-Grenze (C) entwickelt sich eine Epidermis (D). Aus Sriram et al. 2015.

### 1.4.3 Tiermodelle

Die Untersuchung der Wundheilung mittels in-vivo-Tiermodellen ist ebenfalls weit verbreitet und akzeptiert. Im Bereich der Grundlagenforschung eignet sich die Drosophila-Fliege in allen Stadien ihrer Entwicklung (Embryo, Larve, Puppenstadium, adulte Fliege) hinsichtlich genetischer Untersuchungen. Dabei können insbesondere die der Wundheilung zu Grunde liegenden Signalwege sowie Zytoskelettmechanismen erforscht werden (Razzell et al. 2011).

Mit Hilfe von transgenen Mausmodellen und Knockout-Mäusen lassen sich die Funktionen einzelner Proteine und Gene untersuchen. Insbesondere diabetische Mausmodelle konnten zur Klärung einiger Pathomechanismen bei insuffizienter Wundheilung beitragen (Fang und Mustoe 2008). Die direkte Hautverletzung durch Biopsienadeln (*punch wound*) oder das Setzen chirurgischer Schnitt- bzw. Exzisionswunden (*incisional/excisional wound*) wird neben Mäusen auch an Ratten oder Hasen tierexperimentell studiert. Dabei fließen typischerweise die Zeit bis zum Wundverschluss, die Reepithelialisierungszeit und Narbenfestigkeit als Wundheilungsparameter in die Analysen mit ein (Kim et al. 2015; Dunn et al. 2013).

Die Wundheilung des Schweines ist der des Menschen wesentlich ähnlicher als die der Maus, so dass auch dieses Tiermodell Anwendung findet. Die Übereinstimmung der Wundheilungsprozesse beträgt einer Untersuchung nach 78 % zwischen Schwein und Mensch im Vergleich zu 53 % zwischen Mensch und Maus (Sullivan et al. 2001; Lindblad 2008). Nachteile ergeben sich aus den höheren Unterhaltungskosten basierend auf den Erfordernissen an die Pflege der Tiere, der aufwendigeren Experimentgestaltung und -durchführung (ggf. tierärztliche Begleitung) sowie durch die höheren tierschutzrechtlichen Vorgaben, die es zu beachten gilt (Lindblad 2008; Seaton et al. 2015). Im Großtierversuch kommen teilweise Pferde zum Einsatz, wie die Forschung zur Transplantation von epithelialen Stammzellen zeigt (Broeckx et al. 2015). Mit Hilfe von Experimenten an gentechnisch modifizierten, transparenten Zebrafischen lassen sich Mechanismen bei vaskulären Verletzungen direkt mikroskopisch visualisieren (Clay und Coughlin 2015).

Bekanntermaßen sind die Erkenntnisse aus allen Tiermodellen nur bedingt auf die Verhältnisse bei menschlicher Haut übertragbar. So heilen zum Beispiel Wunden bei Mäusen überwiegend über den Mechanismus der Wundkontraktion, während die Wundheilung beim Menschen stärker auf die Reepithelialisierung zurückzuführen ist (Park et al. 2015; Wong et al. 2011).

#### **1.4.4 Humane Wundheilungsmodelle und klinische Forschung**

Voll valide Erkenntnisse über Wundheilungsprozesse beim Menschen lassen sich nur durch Experimente an realen Probanden beziehungsweise Patienten gewinnen. Die experimentelle Grundlagenforschung an gesunden Menschen in vivo erfordert einen invasiven, verletzenden Eingriff und ist dementsprechend mit hohen ethischen Anforderungen verbunden. Außer den hohen Kosten verursacht durch mehrwöchige Beobachtungen und finanzielle Entschädigung der Probanden gilt es die medizinischen Risiken zu beachten: Neben dem kosmetischem Aspekt verbleibender Narben kann es zu übermäßiger Bindegewebsvermehrung (Keloiden), Narbenkontrakturen oder Wunddehiszenzen kommen. Folgeschäden durch lokale oder gar systemische Infektionen sind möglich und machen artifizielle Verletzungsexperimente bei gesunden Menschen – insbesondere wenn keine therapeutische Intervention geplant ist – zu aufwändigen Projekten. Etablierte Verletzungsmethoden sind in solchen Studien unter anderem: die chirurgische Inzision/Exzision, definierte Hautbiopsien, die Applikation von Säuren oder Unterdruck (*suction blister wound* - Kottner et al. 2013; Smith et al. 2015), die Hitzeverletzungen durch Laseranwendung (Vits et al. 2013; Ferrag et al. 2012) oder kryotechnische Verfahren mit flüssigem Stickstoff (Vivas et al. 2015; Ferrag et al. 2012; Kottner et al. 2013; Smith et al. 2015).

Aus den dargestellten Aspekten erfolgt die Wundheilungsforschung am Menschen zum großen Teil durch klinischen Studien an Patienten mit bestehenden chronischen Wunden oder im Rahmen ohnehin geplanter chirurgischer Operationen. Je nach Umfang der Untersuchungen reicht das Spektrum von experimentellen Einzelfallstudien für die Erprobung innovativer Therapieformen bis zu umfangreichen, randomisierten, klinischen Trials (Randomized Clinical Trial = RCT) zur Zulassung neuer Wundtherapeutika, die den Anforderungen der modernen, evidenzbasierten Medizin genügen sollen (Eskes et al. 2012; Brölmann et al. 2013).

#### **1.4.5 Humanes Vollhautkultursystem zur praxisnahen Wundforschung**

Moll et al. entwickelten in den 1990er Jahren ein humanes Vollhaut-Organkulturmodell, um ein möglichst realitätsnahes Modell zur Verfügung zu haben, ohne die hohen Anforderungen der klinischen Wundheilungsforschung erfüllen zu müssen. In diesem Modell erfolgt nach Exzision von Vollhaut (entnommen im Rahmen plastischer Operationen) eine Verletzung der Epidermis und Dermis ex vivo mit Hilfe von Hautbiopsienadeln. Die verletzten Hautproben werden in eine Organkultur gegeben und es kann die von den entstandenen Wundrändern ausgehende Reepithelialisierung untersucht werden. Die Vitalität der Zellen konnte auch ohne den Einfluss von

systematischen Faktoren wie Perfusion, Innervation und Entzündungsreaktion für bis zu sieben Tagen Dauer nachgewiesen werden (Moll et al. 1998).

Das Modell konnte später erfolgreich weiterentwickelt werden, als dass die Zugabe von fetalem Rinderserum entfiel und die Kulturdauer auf bis zu zwei Wochen ausgedehnt werden konnte. Gerade die serumfreien Kulturbedingungen ermöglichen eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da interindividuelle Unterschiede in den Serum-Chargen entfallen und der Einfluss des animalen Serums auf die humane Wundheilung ausgeschlossen wird (Lu et al. 2007).

Durch die Einführung eines Stanze-in-Stanze-Modells (Schaffung von Haut-Ringen) durch die Arbeitsgruppe Paus wurde die Anzahl der untersuchbaren Wundränder auf einfache Weise verdoppelt und das Modell kam in Experimenten zur wundheilungsfördernden Wirkung von Thyroid Stimulating Hormone (TSH), Thyrotropin Releasing Hormone (TRH), Gastrin Releasing Peptide (GRP), Bombesin und Neuromedin B (NMB) zum Einsatz (Bodó et al. 2010; Schäfer 2010; Meier et al. 2013).

Die Vorteile des Modells liegen in seiner einfachen Handhabung und Durchführbarkeit mit einer großen Probenanzahl verbunden mit einem alle physiologischen Hautschichten umfassenden (im Gegensatz zu Scratch-Assays oder Hautäquivalenzmodellen), humanen (im Gegensatz zu Tiermodellen) Experimentdesign. In der Organkultur können Perfusion, Innervation und systemische Reaktionen, wie Entzündung und Immunantwort des Körpers, nicht im physiologischen Maße abgebildet werden, was als nachteilig kritisiert werden kann (Schäfer 2010).

#### **1.4.6 Marker für die Wundheilung**

##### **1.4.6.1 Ki67/TUNEL**

Die Ki67/TUNEL-Doppelfärbung dient dazu, die Kerne proliferierender Zellen (Ki67) einerseits als auch apoptotische Zellen (TUNEL = TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) andererseits darzustellen.

Das Ki67-Antigen wurde 1983 erstmals durch Pathologen in Kiel beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass dieses Antigen während aller Phasen der Zellteilung exprimiert wird (Gerdies et al. 1984). Während der Ruhephase des Zellzyklus ist es nicht nachweisbar, wodurch eine Unterscheidung zwischen ruhenden und proliferierenden Zellen möglich wird (Gerdies et al. 1984). Es sind zwei verschiedene Isoformen (320 und 359 kDa) des assoziierten Proteins bekannt, wobei die physiologische Funktion des Ki67-Proteins trotz intensiver Forschungsbemühungen bis heute unbekannt ist. Die strikte Korrelation zum Zellzyklus machen Ki67 zu einem gut etablierten und weit verbreiteten Marker für die Proliferation von Zellen in der Forschung (Scholzen und

Gerdes 2000). In der Klinik findet Ki67 zunehmend Beachtung als Tumor-/Prognosemarker für die onkologische Medizin (z.B. bei Brust- und Lungenkrebs; Luporsi et al. 2012; Jakobsen und Sørensen 2013; Warth et al. 2014).

Die TUNEL-Methode wurde auf der Annahme entwickelt, dass der programmierte Zelltod (Apoptose) mit regelhafter Zerteilung der Zellkern-DNA (Fragmentation) einhergeht (Gavrieli 1992). Die dabei entstehenden freien OH-Enden der DNA-Bruchstücke werden durch das Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) mit 2'-Deoxyuridin, 5'-Triphosphat (dUTP)-Nukleotiden verbunden, an denen wiederum ein detektierbarer Marker gebunden ist. Zwischenzeitlich geäußerte Bedenken, dass die Methode neben apoptotischen Zellen auch Zellen markiert, die durch Nekrose oder postmortale Autolyse zu Grunde gehen, wurden durch Verbesserungen der Methode ausgeräumt (Kraupp et al. 1995; Negoescu et al. 1996; Negoescu et al. 1998).

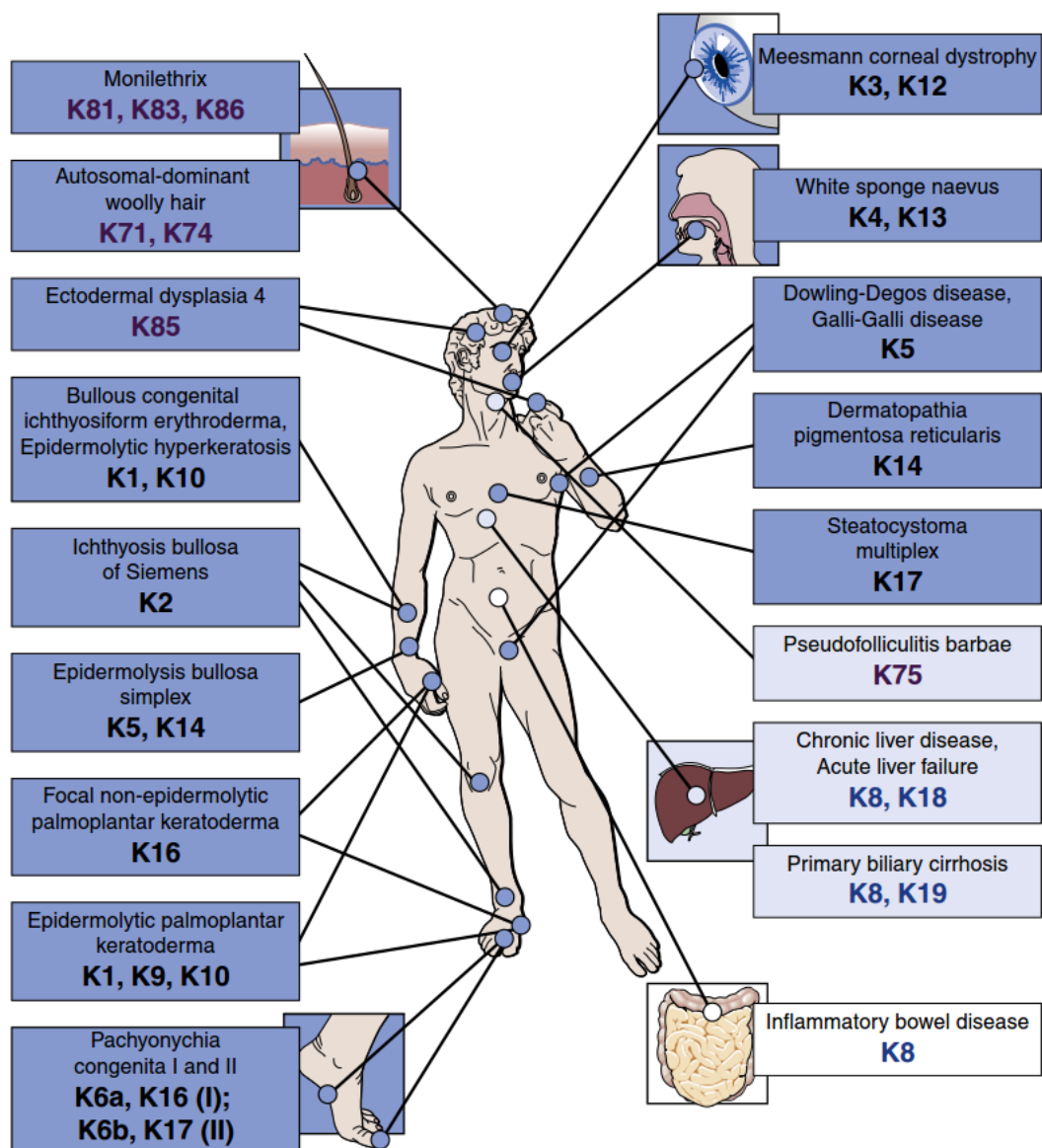
#### **1.4.6.2 Keratine und insbesondere Zytokeratin CK 6**

Keratine (auch Zytokeratin; Abkürzung K oder CK) sind Teil des Zytoskeletts von Epithelien. Sie verleihen der Epidermis Stabilität und Zusammenhalt und übernehmen zudem Funktionen im intrazellulären Transportsystem und in der Zelldifferenzierung (Bragulla und Homberger 2009; Loschke et al. 2015; Ramms et al. 2013). Es gibt 54 bekannte Keratine, die nach ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften in Typ I (saurer pH-Wert, 40 - 65 kDa, K9 - K40) oder Typ II (basischer pH-Wert, 50 - 60 kDa, K1 - K8, K71 - K86) eingeteilt werden. Zwei Keratine aus je einer Gruppe bilden zusammen typische Heterodimerpaare wie zum Beispiel K1/K10 oder K8/18. Die einzelnen Keratine beziehungsweise ihre Kombination und Expressionsmuster sind spezifisch für die unterschiedlichen Epithelien des Körpers. In der klinischen Pathologie wird dies bei der Identifikation unbekannter Karzinome genutzt, in dem mittels einer Keratin-Analyse das Ursprungsgewebe maligner Zellen bestimmt werden kann (Moll et al. 2008; Karantza 2011).

(Zyto)-Keratin 6 ist ein Typ I Keratin (56 kDa, pH-Wert 7,8), von dem drei verschiedene Isoformen (K6a - K6c) existieren. Es ist zusammen mit seinem Partner K16 normalerweise vorwiegend an zwei Orten im Körper zu finden: Zum einen in der suprabasalen Schicht der Epidermis von Handflächen/Fußsohlen und Nägeln und zum anderen im einschichtigen Outer Root Sheath (ORS, äußere Haarwurzelscheide) des Haarfollikels (Bragulla und Homberger 2009). Keratin 6 hat als Wundheilungsmarker gerade deswegen eine große Bedeutung, weil es als Hyperproliferationsmarker bei Belastungs- und Stressreaktionen in vielen anderen Geweben induziert werden kann. So wird K6 zum Beispiel bei epithelialen Tumoren oder bei vielen Krankheiten

hochreguliert und kann als Hinweis auf eine Aktivierung der Keratinozyten gesehen werden (Paladini et al. 1996; Moll et al. 2008; Rotty und Coulombe 2012).

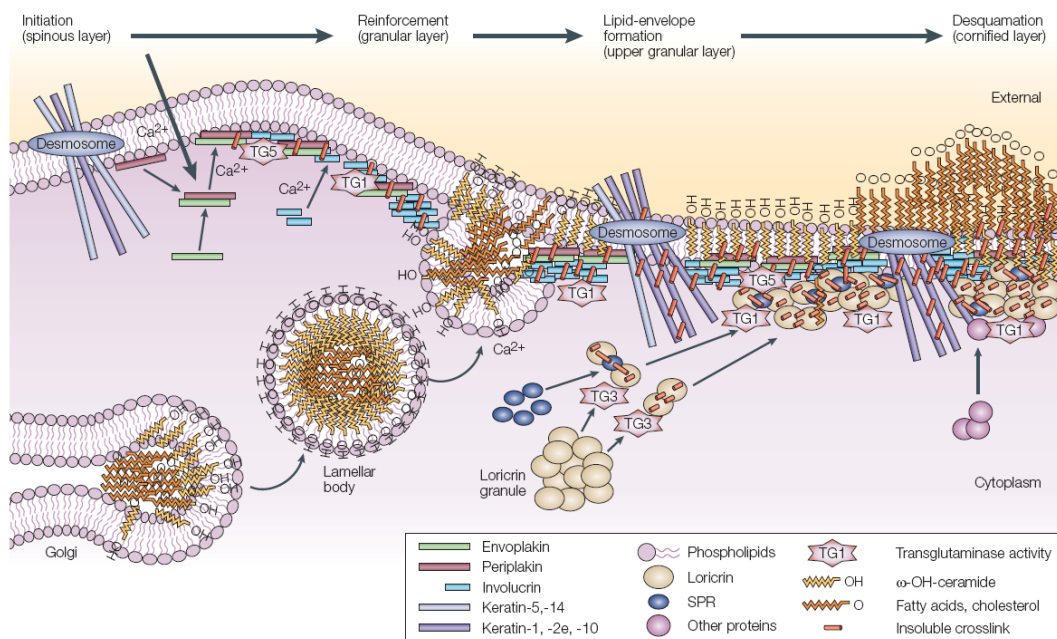
Es sind über 60 Genodermatosen (Keratinopathien) wie zum Beispiel die Epidermolysis bullosa simplex und die epidermolytische Hyperkeratose bekannt, die auf spezifischen Mutationen der Keratine beruhen (siehe Abbildung 7). Die meisten dieser Krankheiten werden autosomal-dominant vererbt. Veränderungen im Keratin 6 konnten für die Krankheit der Pachyonychia congenita als ursächlich belegt werden (Toivola et al. 2015; Bowden et al. 1995).



**Abbildung 7: Keratinopathien und assoziierte Keratine.** Darstellung verschiedener, durch genetisch bedingte Veränderungen der Keratine verursachte Krankheiten. Aus Toivola et al. 2015.

### 1.4.6.3 Involucrin als Marker der terminalen Keratinozytendifferenzierung

Involucrin ist ein lösliches zytoplasmatisches Protein der Keratinozyten, das im Laufe des Stratifizierungsprozesses der Haut zunehmend an die Zellmembran angelagert wird (siehe Abbildung 8) und dann einen integralen Bestandteil der *cornified envelope* der Hornschicht darstellt. Es ist 68 kDa groß und durch seine längliche, stangenartige Konfiguration (Achsenverhältnis 30:1) im Stande eine Vielzahl an Bindungen mit den anderen Bestandteilen der *cornified envelope* einzugehen (Yaffe et al. 1992). Man findet es in verschiedenen, mehrschichtigen Epithelien jeweils im Stratum granulosum oder höheren Schichten der Epidermis. Basale und suprabasale Keratinozyten produzieren kein Involucrin (Murphy et al. 1984).



**Abbildung 8: Einbau von Involucrin im Rahmen des Verhornungsprozesses.** Beginnend im Stratum granulosum wird Involucrin zunehmend unterhalb der Zellmembran angelagert. Es folgen Quervernetzungen der Involucrin-Moleküle untereinander und mit anderen Proteinen durch Transglutaminasen. Auf der Zellaußenseite werden Lipide angelagert und es bildet sich die „cornified envelope“. Aus Candi et al. 2005.

Die aufsteigenden Keratinozyten beginnen nach circa einem Drittel der Distanz zwischen Stratum basale und dem obersten Stratum corneum mit der Expression von Involucrin. Mit dem Aufstieg wird das lösliche Involucrin unterhalb der Zellwand angelagert und bildet das primäre Gerüst der *cornified envelope*. Mit zunehmender Differenzierung in den höheren Schichten werden neben weiteren Involucrinmolekülen auch andere Proteine an das bestehende Involucringерüst angelagert (Loricrin, Small-Proline-Rich Proteins, Profilaggrin) und durch Transglutaminasen kovalent miteinander verbunden. Man geht davon aus, dass mit dem Funktionsverlust der Zellmembran im Stratum corneum, das Involucringерüst die Funktion einer Zellabgrenzungslinie (Demarkation)

übernimmt. Auf der Innenseite (zum Zytosol orientiert) sind die Proteine der cornified envelope platziert und auf der Außenseite finden sich verankerte Lipide und Ceramide (Candi et al. 2005). Innerhalb der cornified envelope sorgt Involucrin durch Ausbildung von Crosslinks für einen zusätzlichen Zusammenhalt zwischen den Zellen des Stratum corneum (siehe Abbildung 8). Aufgrund der frühen zeitlichen Integration wird Involucrin als ein Marker für den Formationsbeginn der cornified envelope und ergo den Beginn der terminalen Differenzierung der aus den basalen Schichten aufsteigenden Keratinozyten angesehen (Steinert und Marekov 1997).

#### **1.4.6.4 CD31 als Marker für Endothelzellen**

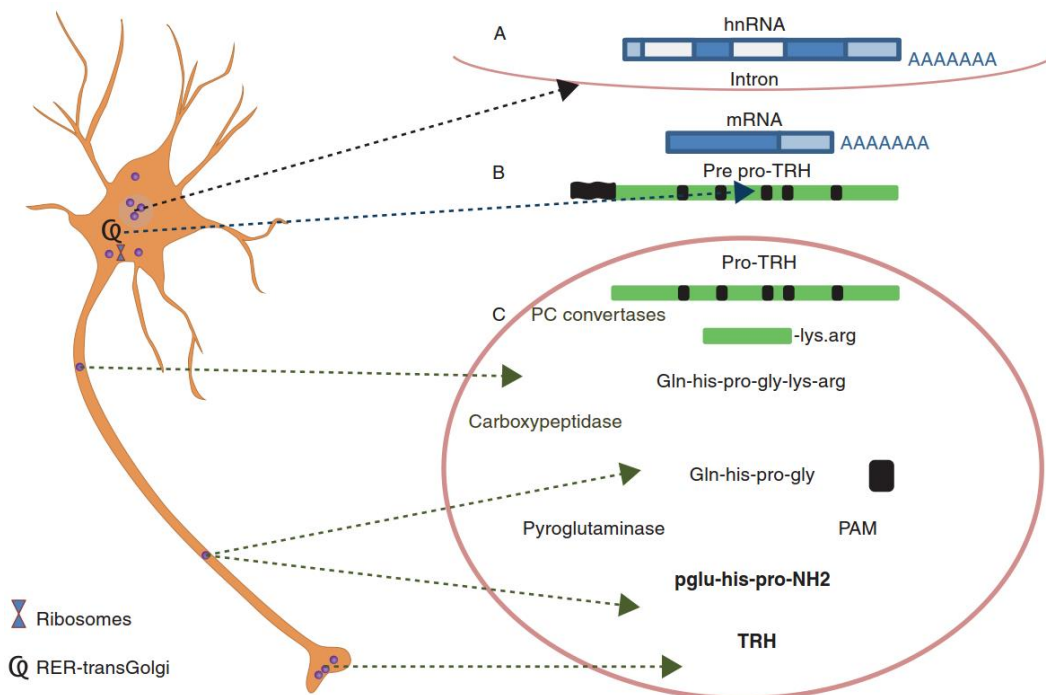
CD31 (Cluster of Differentiation 31, auch bekannt als PECAM-1 = Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) ist ein 120 - 130 kDa großes Glykoprotein der Zellmembran, das zu den Immunglobulinen zählt und dessen Hauptfunktion im Bereich der Zelladhäsion und -interaktion liegt (Newman et al. 1990; Albelda 1991). Neben der Vermittlung von Zellkontakten wird CD31 zusätzlich in der Angiogenese und Inflammation einschließlich der transendothelialen Leukozytenmigration eine regulierende Rolle zugeschrieben (Privratsky et al. 2010; DeLisser et al. 1997). Das CD31-Protein findet sich in großer Anzahl in Endothelzellen und seine immunhistochemische Darstellung ist als sensibler Marker für Endothelien in der Forschung etabliert. Darüber hinaus lässt es sich unter anderem in Thrombozyten, Leukozyten und braunen Fettgewebe nachweisen (Ordóñez 2012). Klinische Anwendung findet der Nachweis von CD31 in der pathologisch-differentialdiagnostischen Bewertung von Tumorgeweben (Young et al. 1998; Ordóñez 2012).

### **1.5 Auf wundheilungsfördernde Wirkung untersuchte Substanzen**

#### **1.5.1 Thyrotropin Releasing Hormone und der hypothalamisch-hypophysäre Schilddrüsenregelkreis**

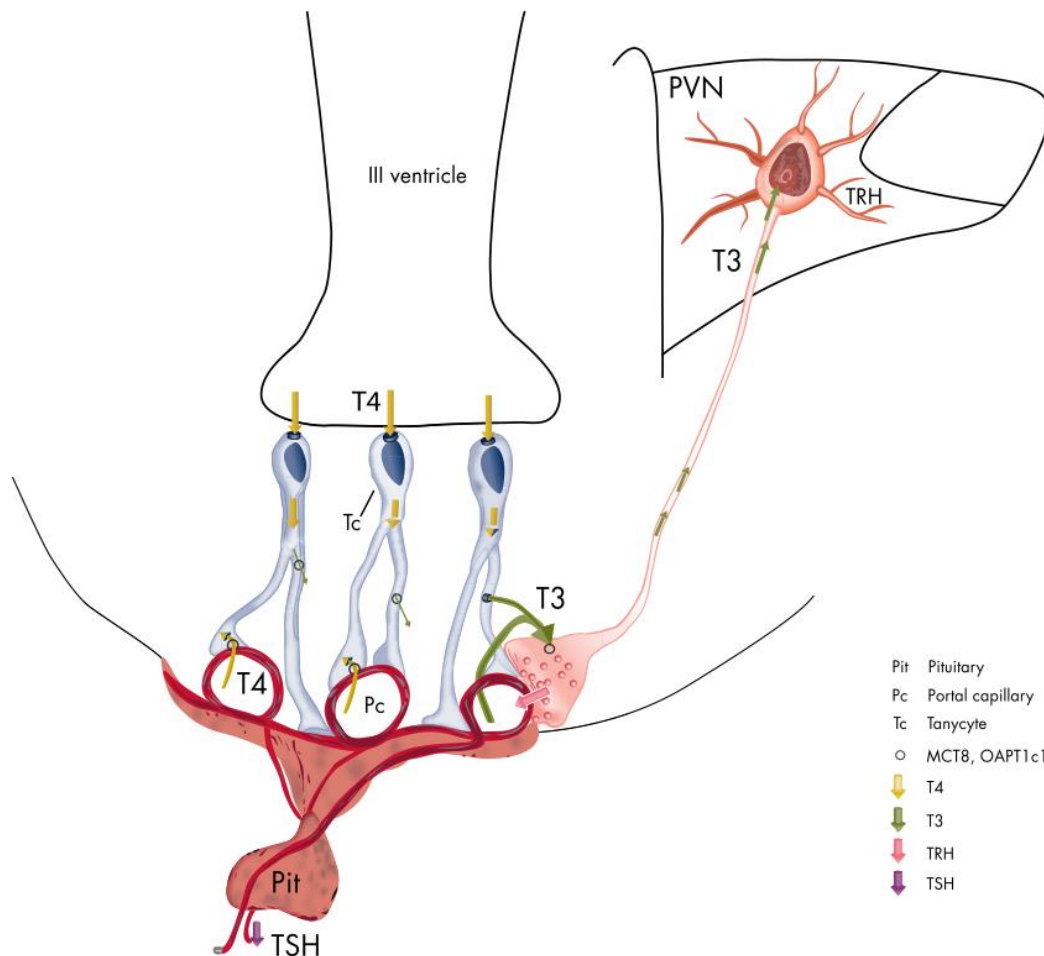
Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) steht an oberster Stelle der hypothalamisch-hypophysären Achse des Schilddrüsenregelkreises. Dieses Peptidhormon wurde 1969 erstmals von Guillemin und Schally unabhängig voneinander aus tierischen Gehirnen isoliert und später synthetisch hergestellt (Burgus et al. 1969; Boler et al. 1969; Duntas und Emerson 2009). Es ist ein modifiziertes Tripeptid bestehend aus den Aminosäuren Glutamin-Histidin-Prolin und wird an verschiedenen Orten im Gehirn produziert. Aus einem 242 Aminosäuren großem Vorläuferprotein (Prepro-TRH) werden sechs Pro-TRH-Peptide herausgespliced und anschließend das Prolin am C-terminalen Ende

amidiert und die N-terminale Glutaminsäure zyklisiert. (siehe Abbildung 9; Joseph-Bravo et al. 2015a; Joseph-Bravo et al. 2015b; Fekete und Lechan 2014).



**Abbildung 9: Synthese von TRH.** Nach Transkription der DNA in das Prepro-TRH wird in verschiedenen, enzymatisch katalysierten Schritten aus diesem das TRH synthetisiert. Ort der Synthese sind überwiegend die Neurone des Nucleus paraventricularis des Hypothalamus. Aus Joseph-Bravo et al. 2015a.

Für seine regulatorischen Aufgaben im Schilddrüsenstoffwechsel wird der Hauptteil des menschlichen TRHs in den Neuronen des Nucleus paraventricularis des Hypothalamus gebildet. Durch direkte Freisetzung in das speziell abgeschlossene Gefäßsystem der Hypophysenpfortader gelangt es unter Umgehung des Körperkreislaufes zur Adenohypophyse, wo es die Freisetzung von TSH induziert. Der TSH-Spiegel und das ihm nachgeschaltete  $T_3/T_4$  (Trijodthyronin/Thyroxin) regeln die TRH-Freisetzung über eine negative Feedbackhemmung. In den Tanyzyten (spezielle Ependymzellen der Neuroglia in der Nähe des dritten Ventrikels) des Nucleus paraventricularis werden die Serum-Spiegel dieser Hormone gemessen und dementsprechend die Freisetzung von TRH gehemmt, wenn der Spiegel ein ausreichendes Level erreicht hat (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis.** Durch negatives Feedback erfolgt die Kontrolle des TRH-Spiegels. Hohe Konzentrationen von  $T_3/T_4$  (gemessen in den Tanyzyten = blaue Zellen) führen zu einer verminderten Ausschüttung von TRH aus den Neuronen des Nucleus paraventricularis (PVN) in den hypophysären Pfortaderkreislauf (rosa Pfeil). Aus Fekete und Lechan 2014.

Die Hemmung erfolgt sowohl über Reduktion der Transkription des TRH-Genes als auch über die Verminderung der Prozessierung des Prepro-TRHs. Das TRH-Level kann außerdem über die Inaktivierung des TRHs durch ein Enzym, die Pyroglutamyl Peptidase II (PPII), gesteuert werden (Fekete und Lechan 2014; Joseph-Bravo et al. 2015a; Chiamolera und Wondisford 2009).

Durch eine zirkadiane Rhythmik kommt es zu schwankenden TSH-Freisetzungen alle zwei bis vier Stunden, wobei gegen Mitternacht die täglichen Maximalwerte gemessen werden und am späten Nachmittag die geringsten Konzentrationen vorhanden sind (Roelfsema und Veldhuis 2013). Zusätzlich steht die TRH-Produktion noch im Zusammenhang mit anderen physiologischen Adaptionsprozessen. Über adrenerge Neuronen aus der Medulla oblongata werden Stressreaktionen und Thermoregulation des autonomen Nervensystems auf TRH-Neurone übermittelt. Im Rahmen des Ernährungsstoffwechsels kann die Schilddrüse auf anabole und katabole

Stoffwechsellagen TRH/TSH-vermittelt reagieren. (Chiamolera und Wondisford 2009; Fekete und Lechan 2014; Roelfsema und Veldhuis 2013).

### **1.5.2 Gastrin Releasing Peptide als Mitglied der Bombesin-Familie**

Gastrin Releasing Peptide (GRP) ist ein aus 27 Aminosäuren bestehendes Polypeptid des menschlichen Körpers, dessen zugehöriges Gen auf Chromosom 18 zu finden ist. Aus dem Transkriptionsprodukt des Prepro-GRP erfolgte über mehrere Prozessierungsschritte die Synthese des GRP (Ischia et al. 2009). Zusammen mit dem amphibischen Bombesin aus der Haut des Frosches und dem ebenfalls humanen Neuromedin B (NMB) wird GRP heute in einer biochemischen Gruppe (Bombesin-Familie) zusammengefasst. Da alle drei Stoffe eine sehr ähnliche Struktur aufweisen, können sie mit unterschiedlichen Präferenzen an drei bekannte G-gekoppelte-Rezeptoren binden: GRP bindet mit einer fünfzigfach höheren Affinität als NMB an den  $BB_2$ -Rezeptor, so dass dieser auch als GRP-Rezeptor bezeichnet wird. Der  $BB_1$ -Rezeptor dagegen bindet überwiegend NMB. Für den dritten Rezeptor ( $BB_3$ -Rezeptor) gilt der physiologische Ligand zur Zeit als noch unbekannt, da alle drei Peptide nicht mit bevorzugter Affinität an diesen binden (Jensen et al. 2008; Majumdar und Weber 2011).

Sowohl zwischen den Stoffen selber als auch zwischen ihren Rezeptoren bestehen große Übereinstimmungen in der Gensequenz (50 % – 90 %). Da sich Homologien in der gleichen Größenordnung zu den Analogpeptiden/-rezeptoren anderer, niederer Spezies feststellen lassen, geht man davon aus, dass es sich bei den Peptiden der Bombesin-Familie um einen phylogenetisch konserviertes Muster der Evolution handelt (Gonzalez et al. 2008).

GRP kommt beim Menschen insbesondere in den Nervenzellen des zentralen Nervensystems und des Gastrointestinaltraktes vor. Seine Funktionen sind dabei vielfältig. Erwiesenermaßen hat GRP im Nucleus suprachiasmaticus einen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik und Thermoregulation. Es wird diskutiert, ob Fehlregulationen von GRP im Zusammenhang mit psychiatrischen Krankheiten wie Angst- und Panikstörungen sowie Störungen des autistischen Formenkreises stehen. Daneben scheint GRP eine wesentliche Rolle in der zentralnervösen Vermittlung von chronischem Pruritus zu spielen (Guo et al. 2015; Kallingal und Mintz 2014; Majumdar und Weber 2011).

GRP vermittelt die Freisetzung von Gastrin aus den G-Zellen der Magenwand. Im Rahmen der Verdauung wirkt es promotil auf die Peristaltik des Darmes und vermittelt die Sekretion anderer Verdauungshormone durch weitere endokrine bzw. parakrine Zellpopulationen des Verdauungstraktes (Magen, Leber, Pankreas). Die Regulierung

des Körpermetabolismus (Nahrungsaufnahme, Abstimmung im Rahmen des Glucosestoffwechsels) erfolgt zudem über GRP-vermittelte Wirkungen im zentralen Nervensystem (Gonzalez et al. 2008; Weber 2009; Jha et al. 2015).

In den letzten Jahren sind GRP und seine Rezeptoren zunehmend in den Fokus der onkologischen Forschung gerückt. Es konnte gezeigt werden, dass GRP-Rezeptoren auf einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert (Lunge, Prostata, Mamma, Magen, Kolon) werden und das GRP das Wachstum maligner Zellen fördert. Zunächst experimentelle Ansätze über spezifische GRP-Rezeptor-Agonisten/Antagonisten, die mit radioaktiver Markierung eine Bildgebung von Tumorgeweben ermöglichen, können inzwischen in der Praxis erfolgreich angewandt werden. Therapeutisch werden Konzepte getestet, bei denen über die spezifische Bindung radioaktiver GRP-Analoga (gezielte Radiotherapie) bzw. über eine Internalisation zytotoxisch-konjugierter Liganden der Untergang von Tumorzellen induziert werden kann. Am weitesten fortgeschritten ist hierzu das Wissen auf dem Gebiet der Prostatakrebsforschung (Mansi et al. 2013; Ramos-Álvarez et al. 2015).

### **1.5.3 TRH und GRP als potenziell wundheilungsfördernde Substanzen**

In den Fokus der Wundheilungsforschung gelang TRH über Versuche am Frosch. Amphibische Haut ist für ihre enorme Fähigkeit zur Regeneration und narbenfreien Wundheilung bekannt - so kann die mexikanische Querschlammolch des Axolotl amputierte Gliedmaßen vollständig wiederherstellen (Godwin 2014; Seifert et al. 2012; Kawasumi et al. 2013). Von Froschhaut ist zudem seit langer Zeit bekannt, dass sie eine ungewöhnlich hohe Anzahl an TRH-Rezeptoren exprimiert und als Syntheseort für TRH fungiert (Bennett et al. 1981; Jackson und Reichlin 1977). Verschiedene Forschergruppen konnten zeigen, dass sich die Wundheilung beim Frosch und Menschen durch TRH-Gabe verbessern lässt (Meier et al. 2013; Nie et al. 2014; Pattwell et al. 2010). Für die Mitglieder der Bombesin-Familie wurden Hinweise auf positive Effekte in der Wundheilung zunächst durch Analysen der Keratinozyten-Migration im Scratch-Assay festgestellt: Yamaguchi et al. untersuchten GRP hinsichtlich dieser Eigenschaften. Für Bombesin führten Baroni et al. entsprechende Versuche durch (Yamaguchi et al. 2002; Baroni et al. 2008). Später konnte das Wundheilungspotential von Bombesin, NMB und GRP auch bei humanen in-vitro-Vollhaut-Organokultur-Experimenten an gesunder Haut nachgewiesen werden (Schäfer 2010).

## 1.6 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Welche Auswirkungen die *kombinatorische* Anwendung von TRH und GRP auf die Wundheilung hat ist bisher nicht bekannt, da zuweilen nur die Einzelsubstanzen getestet wurden. Denkbar sind sowohl synergistisch-additive als auch antagonistische Effekte. Ebenso interessant erscheint die Frage, inwieweit sich die wundheilungsstimulierenden Eigenschaften von TRH und GRP in der Anwendung an der Haut von *erkrankten* bzw. von Wundheilungsstörungen betroffenen Personen reproduzieren lassen. Die bisherigen Versuche beschränkten sich auf die Haut von als *gesund* eingestuften Patienten (aus plastischen Operationen). In diesem Zusammenhang steht des Weiteren die Validierung und Überprüfung der Anwendbarkeit und Durchführbarkeit des Vollhaut-Organkulturmodells mit *erkrankter* humaner Haut aus.

Aus diesen neuen Ansätzen und den bisherigen Erkenntnissen vom Einfluss von TRH und GRP auf die Wundheilung lassen sich folgende Fragestellungen ableiten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollen:

1. Ist die Kultivierung von humaner Vollhaut von Patienten mit geschädigter Wundheilung vaskulärer Genese möglich - und lässt sich das Vollhautkultursystem somit prinzipiell für dieses Patientenkontingent anwenden?
2. Zeigen die (Einzel-)Anwendung von TRH beziehungsweise GRP bei gefäßgeschädigten Patienten vergleichbare Wirkungen wie bei gesunder Patientenhaut?
3. Welchen Einfluss hat die kombinatorische Anwendung von TRH und GRP auf die in-vitro-Wundheilung im Vollhautkulturmodell? Lassen sich synergistische oder antagonistische Effekte auf die Wundheilung feststellen?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Hautproben**

Für die Experimente wurde menschliche Haut von den gefäßchirurgischen Patienten der Klinik für Gefäßmedizin (Universitäres Herzzentrum Hamburg, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) verwendet, die im Rahmen von Major Amputationen gewonnen wurde. Durch die operierenden Chirurgen wurde unmittelbar nach der Amputation unter sterilen Kautelen ein ausreichend großes, alle Hautschichten umfassendes Hautstück vom proximalen Amputatende entfernt und in vorbereitete Urinbecher mit Williams E Medium gegeben. Die Proben wurden gekühlt gelagert und sofort in das Labor der Klinik weitertransportiert, um eine schnelle Verarbeitung sicherzustellen. Die Versuche fanden an der Haut von sechs verschiedenen Patienten im Alter von 48 – 81 Jahren statt. Davon waren fünf männlichen Geschlechts und eine weibliche Patientin. Bei allen Patienten bestand die Indikation zur einer Major Amputation auf Grund einer kritischen Ischämie bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit.

Sämtliche Experimente fanden in dem Labor der Klinik für Gefäßmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf statt. Die Versuche fanden entsprechend den Statuten und nach vorheriger Genehmigung durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg statt.

### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die für die Experimente verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind als Übersicht in der nachfolgenden Tabelle 1 dargestellt.

| Bezeichnung                      | Hersteller/Zusammensetzung                                                                                                                              |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aceton                           | Th. Geyer                                                                                                                                               |
| Antibody Diluent                 | Dako                                                                                                                                                    |
| DAPI                             | Roth                                                                                                                                                    |
| Fluoromount G                    | Southern Biotech                                                                                                                                        |
| GRP                              | Sigma                                                                                                                                                   |
| Einfriermedium Cryomatrix        | Thermoc Scientific                                                                                                                                      |
| Eisessig                         | Sigma                                                                                                                                                   |
| Equilibrationspuffer             | Millipore                                                                                                                                               |
| Ethanol                          | Roth                                                                                                                                                    |
| Salzsäure                        | Roth                                                                                                                                                    |
| Hydrocortison                    | Sigma                                                                                                                                                   |
| Insulin                          | Sigma                                                                                                                                                   |
| L-Glutamin                       | Gibco                                                                                                                                                   |
| Natriumchlorid                   | Merck                                                                                                                                                   |
| Natriumdihydrogencarbonat        | Roth                                                                                                                                                    |
| Penicillin/Streptomycin          | Gibco                                                                                                                                                   |
| Paraformaldehyd, 1%              | Sigma                                                                                                                                                   |
| Stickstoff (flüssig)             | Sigma                                                                                                                                                   |
| Stopp-Puffer-Gebrauchsverdünnung | Millipore                                                                                                                                               |
| TdT-Enzym-Verbrauchsverdünnung   | Millipore                                                                                                                                               |
| TRH                              | Sigma                                                                                                                                                   |
| Tris-Base                        | Sigma                                                                                                                                                   |
| Williams E Medium                | Biochrom                                                                                                                                                |
| Kulturmedium                     | Williams E Medium (2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> )<br>L- Glutamin (200 mM)<br>Hydrocortison (0,05 mg/ml)<br>Insulin (10 mg/ml)<br>Penicillin/ Streptomycin |
| TBS (0,05 M, pH 7,6)             | 6,1 g Tris-Base<br>8,8 g NaCl<br>Ad 1 l Aqua dest.<br>Einstellen des pH mit 25%iger HCl                                                                 |
| PBS (0,05 M, pH 7,2)             | 1,8g Natriumdihydrogenphosphat<br>Monophosphat<br>8 g NaCl<br>Ad 1 l Aqua dest.<br>Einstellen des pH mit 1 M NaOH                                       |

**Tabelle 1:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Hersteller bzw. Zusammensetzung

### 2.1.3 Antikörper

Die für die Experimente verwendeten primären und sekundären Antikörper, deren Hersteller und die verwendeten Verdünnungen sind als Übersicht in der nachfolgenden Tabelle 2 dargestellt.

| Bezeichnung                                        | Hersteller              | Verdünnung |
|----------------------------------------------------|-------------------------|------------|
| <u>Primärantikörper:</u>                           |                         |            |
| Mouse-anti-human CK 6                              | Progen                  | 1:10       |
| Mouse-anti-human Ki67                              | Dako                    | 1:20       |
| Mouse-anti-human CD31                              | Dako                    | 1:30       |
| Mouse-anti-human Involucrin                        | Sigma                   | 1:500      |
| <u>Sekundärantikörper:</u>                         |                         |            |
| Goat-anti-mouse FITC                               | Jackson-Immuno Research | 1:200      |
| Goat-anti-mouse Rhodamine Red                      | Jackson Immuno Research | 1:200      |
| Fluorescein-markierter anti-Digoxigenin-Antikörper | Millipore               | 1:200      |
| Goat-anti-rabbit FITC                              | Jackson Immuno Research | 1:200      |

**Tabelle 2:** Übersicht über die verwendeten primären und sekundären Antikörper

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Die für die Experimente verwendeten Verbrauchsmaterialien sind als Übersicht in der nachfolgenden Tabelle 3 dargestellt.

| Bezeichnung                       | Hersteller    |
|-----------------------------------|---------------|
| Deckgläser                        | Menzel-Gläser |
| Einmal-Pipettenspitzen            | Eppendorf     |
| Eppendorf Reaktionsgefäße         | Eppendorf     |
| Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)     | TPP           |
| Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl) | Eppendorf     |
| Superfrost Plus Objektträger      | Menzel-Gläser |
| Skalpellklingen, steril           | Martin        |
| Hautbiopsiestanzen (2 mm, 4 mm)   | PFM           |
| 6-Well-Zellkulturplatten          | Nunc          |

**Tabelle 3:** Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

### 2.1.5 Laborgeräte

Die für die Experimente verwendeten Laborgeräte sind als Übersicht in der nachfolgenden Tabelle 4 dargestellt.

| Bezeichnung                         | Hersteller          |
|-------------------------------------|---------------------|
| Kryostat 2800 Frigocut E            | Reichert-Jung       |
| Fluoreszenzmikroskop Biozero 8000   | Keyence             |
| Wärmeschrank Modell 200             | Memmert             |
| Lichtmikroskop Standard 25          | Zeiss               |
| pH-Meter HI 221                     | Hanna Instruments   |
| Pipettierhilfe                      | Eppendorf           |
| Sicherheitswerkbank LaminAir HB2448 | Heraeus Instruments |
| Vortex Genius 3                     | IKA Werke           |
| Waage PCB 1000-2                    | Kern und Sohn       |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator          | Sanyo               |
| Zentrifuge Biofuge 22R              | Heraeus Instruments |
| Zentrifuge Centrifuge 5810          | Eppendorf           |

**Tabelle 4:** Übersicht über die verwendeten Laborgeräte

### 2.1.6 Software und EDV

Die für die im Rahmen der Arbeit verwendete Software und EDV ist als Übersicht in der nachfolgenden Tabelle 5 dargestellt.

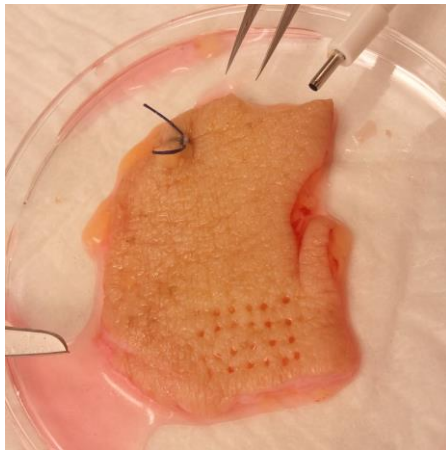
| Bezeichnung                | Hersteller                    |
|----------------------------|-------------------------------|
| ImageJ Version 1.44        | National Institutes of Health |
| Excel 2016                 | Microsoft                     |
| Word 2016                  | Microsoft                     |
| SPSS 22.0                  | IBM                           |
| Image Composite Editor     | Microsoft                     |
| BZ Observation Application | Keyence                       |

**Tabelle 5:** Übersicht über die verwendete Software und EDV

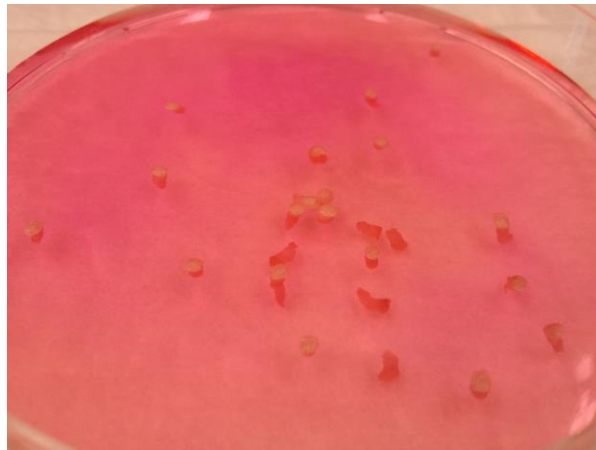
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anlage der Hautorgankultur

Die während der Operation gewonnene Haut wurde gekühlt in Williams E Medium in das Labor gebracht. Es erfolgte die Präparation und Entfernung überschüssigen Fett- und Bindegewebes mit handelsüblichen Skalpelln unter sterilen Kautelen. Anschließend wurden mit handelsüblichen Hautbiopsienadeln runde Vollhautstanzen mit einem Durchmesser von 2 mm aus dem Hautstück ausgestanzt. Die gewonnenen Stanzen wurden kurzfristig in Williams E Medium zwischengelagert bis ausreichend Stanzen (ca. 70 Stück) für das Experiment aus dem Hautstück gewonnen waren (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12).



**Abbildung 11: Vollhautpräparat zur Wundstanzengewinnung.** Bereits mehrere Hautstanzen biopsiert. Überschüssiges Fett und Bindegewebe zuvor entfernt.



**Abbildung 12: 2-mm-Wundstanzen in Williams E Kulturmedium.** Die gewonnenen Hautstanzen wurden kurzzeitig zwischengelagert bevor jeweils drei Stanzen auf die entsprechenden Kulturbedingungen verteilt wurden.

Unter der Sterilbank wurden drei 6-Well-Platten (jeweils eine Platte pro Konservierungstag des Experiments) wie folgt vorbereitet: Ein Well entsprach einer Kulturbedingung. In jeden Well wurden zunächst 2,5 ml des vorbereiteten Kulturmediums pipettiert. Anschließend wurde die entsprechende Testsubstanz in der Menge hinzupipettiert, so dass zusammen mit den 2,5 ml Kulturmedium die gewünschte Wirkstoffkonzentration (siehe Tabelle 6) im Well erreicht wurde.

| Name der Kulturbedingung | Konzentration TRH | Konzentration GRP |
|--------------------------|-------------------|-------------------|
| WE                       | -                 | -                 |
| TRH                      | $10^{-6}$ M       | -                 |
| GRP                      | -                 | $10^{-6}$ M       |
| GT 1                     | $10^{-6}$ M       | $10^{-6}$ M       |
| GT 2                     | $10^{-6}$ M       | $10^{-7}$ M       |
| GT 3                     | $10^{-7}$ M       | $10^{-6}$ M       |

**Tabelle 6: Übersicht über die Kulturbedingungen.** Angabe der Konzentrationen und Kombinationen von TRH und GRP sowie die zugehörige Abkürzung der Kulturbedingung.

Danach wurden jeweils drei Hautstanzen zufällig auf die Wells verteilt. So wurden für jedes Experiment drei Kulturplatten (für Konservierung der Hautstanzen an den Tagen 1, 2 und 6) angelegt. Aus dem Stanzenpool wurden am Tag der Kulturanlage zudem jeweils drei Stanzen als Tag-0-Kontrolle (ohne Zugabe von Testsubstanzen) entsprechend dem im Folgenden beschriebenen Procedere konserviert.

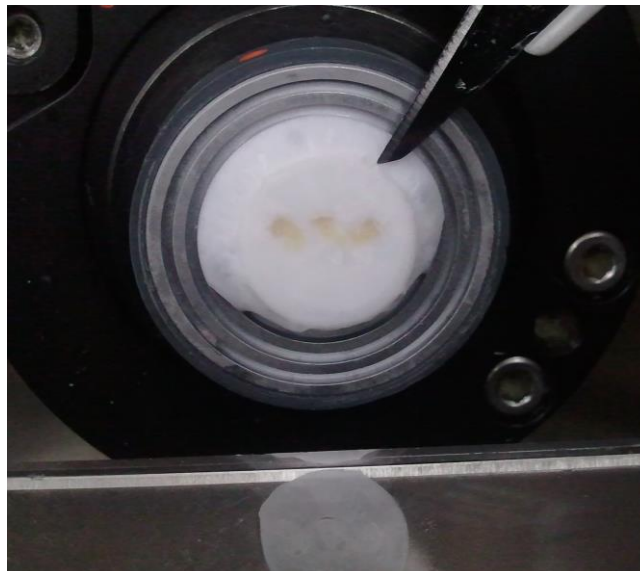
### 2.2.2 Kulturpflege und Probenkonservierung

Die angelegten Hautorgankulturplatten wurden bei 37 °C sowie bei Begasung mit 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> kontinuierlich inkubiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Wechsel des

Kulturmediums und Erneuerung des zugesetzten Testwirkstoffes bzw. Wirkstoffkombination. An den entsprechenden Konservierungstagen wurden die Stanzen wie folgt konserviert: Die drei Stanzen pro Bedingung wurden parallel nebeneinander mit Hilfe von Pinzetten in möglichst atraumatischer Weise in einem Block des Einbettmediums Cryomatrix angeordnet und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Dauerkonservierung der Probenblöcke erfolgte bei - 80 °C im Gefrierschrank.

### 2.2.3 Anfertigung der Gefrierschnitte auf Objektträgern

Aus den konservierten Hautstanzenblöcken wurden mit dem Kryostaten 7 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgetragen. Als optimale Schnittrichtung hat sich dabei eine longitudinale Schnittführung von der Subkutis in Richtung Epidermis erwiesen, die sich makroskopisch abschätzen ließ (siehe Abbildung 13). Pro Schnitt waren so sechs Wundränder sichtbar (jeweils zwei pro Stanze). Jeder Block wurde zweimal in unterschiedlichen Ebenen geschnitten und je ein Schnitt aus jeder Ebene auf einen gemeinsamen Objektträger aufgetragen, so dass sich eine Maximalzahl von zwölf Wundrändern pro Objektträger ergab. Auf einem Objektträger waren jeweils eine Kulturbedingung an einem Kulturtag wiedergespiegelt (z.B. TRH am Tag 1). Die Objektträger wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C im Gefrierschrank gelagert.



**Abbildung 13: Gefrorener Hautstanzenblock.** Im Einbettmedium sind die drei parallel zu einander angeordneten Hautstanzen zu erkennen, die Epidermis ist nach oben orientiert. Am unteren Bildrand ist ein 7 µm Kryostat-Schnitt dieses Hautstanzenblockes zu erkennen, der im nächsten Arbeitsschritt auf einen Objektträger übertragen wurde.

#### **2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung für CK 6, CD31 und Involucrin**

Die für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Protokolle waren in Vorexperimenten etabliert worden (Bodó et al. 2010; Schäfer 2010; Meier et al. 2013). Für die Färbungen mussten die Gefrierschnitte zunächst fixiert werden: Nachdem die gefrorenen Objektträger für 10 Minuten bei Raumluft erwärmt und getrocknet waren, wurden sie für 10 Minuten in Aceton bei - 20 °C fixiert. Danach wurde überflüssiges Aceton in drei fünfminütigen sukzessiven Waschschritten mit TPS entfernt. Der Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung mit Antibody Diluent (siehe Tabelle 2) und ausreichender Menge auf die Schnitte aufpipettiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Hautstanzenschnitte komplett bedeckt waren, wozu ca. 22 - 25 µl pro Schnitt nötig waren. Die Inkubation des Primärantiköpers erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde zunächst überschüssige Reagenz durch dreimaliges Waschen mit TPS entfernt, bevor in gleicher Weise wie am Vortag der korrespondierende Sekundärantikörper aufgetragen wurde (wiederum in Verdünnung mit Antibody Diluent und die Schnitte komplett bedeckend). Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 45 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit TBS gewaschen, um überschüssiges Antikörper-Reagenz zu entfernen und es wurde eine einminütige Gegenfärbung (der Kerne) mit DAPI durchgeführt. Nach einem abschließenden Waschgang mit TBS folgte die Einbettung der gefärbten Schnitte mit Fluoromount G. Die gefärbten Schnitte konnten dann nach mehrstündiger Lufttrocknung dauerhaft bei - 20 °C gelagert werden.

#### **2.2.5 Immunfluoreszenzdoppelfärbung für Ki67 und TUNEL**

Für diese Färbung wurde ebenfalls auf die etablierten Protokolle zurückgegriffen. Die unfixierten Gefrierschnitte wurden 10 Minuten an der Luft getrocknet und konnten sich an die Raumtemperatur anpassen. Dann wurden sie für 10 Minuten mit 1 % Paraformaldehyd in PBS primärfixiert. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten mit PBS erfolgte eine Postfixation bei - 20 °C in Ethanol-Eisessig (Verhältnis 2:1) für weitere 5 Minuten bevor eine erneute zweimalige Waschung mit PBS erfolgte. Zur Markierung und verlustarmen Reagenzienverbrauch wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Pro Schnitt wurden 13 µl des Equilibrierungspuffers aufpipettiert und für 5 Minuten inkubiert und anschließend durch Abkippen entfernt. Die erste Reaktionsverdünnung (für TUNEL) wurde im Verhältnis 70 % Reaktionspuffer und 30% TdT-Enzym angesetzt und ebenfalls jeweils 13 µl dieser Lösung auf jeden Schnitt aufpipettiert. Die Schnitte wurden mit Coverslips bedeckt um eine bessere Verteilung des Enzyms zu gewährleisten. Nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank wurden die Objektträger in die Stop-Puffer-Gebrauchsverdünnung

(68 ml Aqua dest. und 2 ml Stop-Puffer) getaucht, um die Reaktion zu stoppen. Dieser Schritt erfolgte ebenfalls für 10 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank. Durch Waschen mit PBS wurden überschüssige Reagenzien entfernt (dreimal für je 5 Minuten). Als nächstes wurde der Mouse-anti-human-Ki67-Primärantikörper (verdünnt mit Antibody Diluent, siehe Tabelle 2) auf die Schnitte aufgetragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden überschüssige Reagenzien mit dreimaligem Waschen mit PBS entfernt.

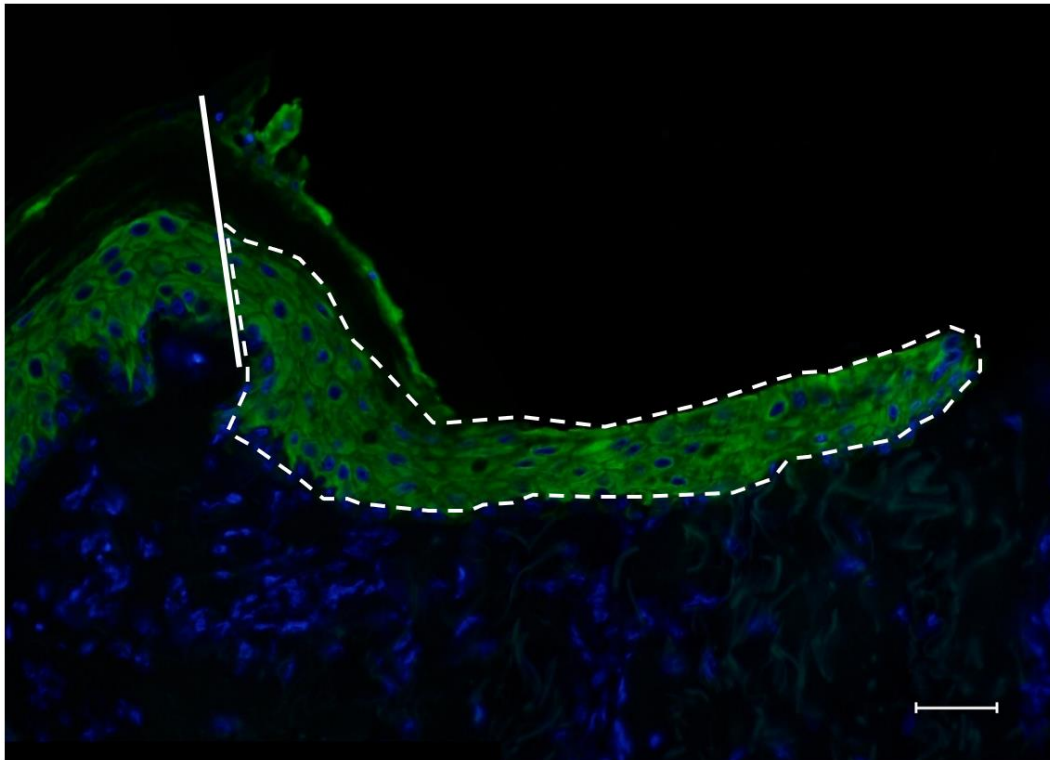
Der Fluorescein-markierter-Anti-Digoxigenin-Antikörper als erster Sekundärantikörper dient zur Darstellung der TdT-Enzym vermittelten Reaktion. Er wurde im festen Verhältnis (56 µl Blockierlösung und 59 µl Antikörperlösung) verdünnt und in jeweils ausreichender Menge auf die Schnitte aufpipettiert. Nach dreißigminütiger Inkubationszeit wurde er mittels dreimaliger Waschung mit PBS entfernt. Der zweite Sekundärantikörper (Goat-anti-mouse-rhodamine-Antikörper) zur Darstellung des Ki67-Primärantikörpers wurde mit Antibody Diluent (siehe Tabelle 2) verdünnt, aufpipettiert und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auch dieser Antikörper wurde anschließend dreimal mit PBS ausgewaschen. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger für eine Minute in DAPI getaucht und ein letztes Mal mit PBS gewaschen. Zur Einbettung wurde Fluoromount G benutzt, und nach mehrstündiger Trocknung konnten die gefärbten Objektträger bei - 20 °C dauerhaft aufbewahrt werden.

## **2.2.6 Fotomikroskopische Dokumentation und quantitative Immunhistomorphometrie**

Für die fotomikroskopische Dokumentation wurden die Schnitte zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Dann wurde in der Herstellersoftware „BZ Observation Application“ mit dem Biozero 8000 Fluoreszenzmikroskop exemplarisch an zwei bis drei verschiedenen Objektträgern die optimale Belichtungszeit für die zu dokumentierende Färbungsreihe ermittelt und anschließend systematisch alle Wundränder auf den Objektträgern fotografiert. Es wurde dabei generell eine 20-fache Vergrößerung gewählt. Nur die CD31-Färbung wurde in 10-facher Vergrößerung fotografiert, um einen größeren Ausschnitt des subdermalen Gewebes zu erfassen.

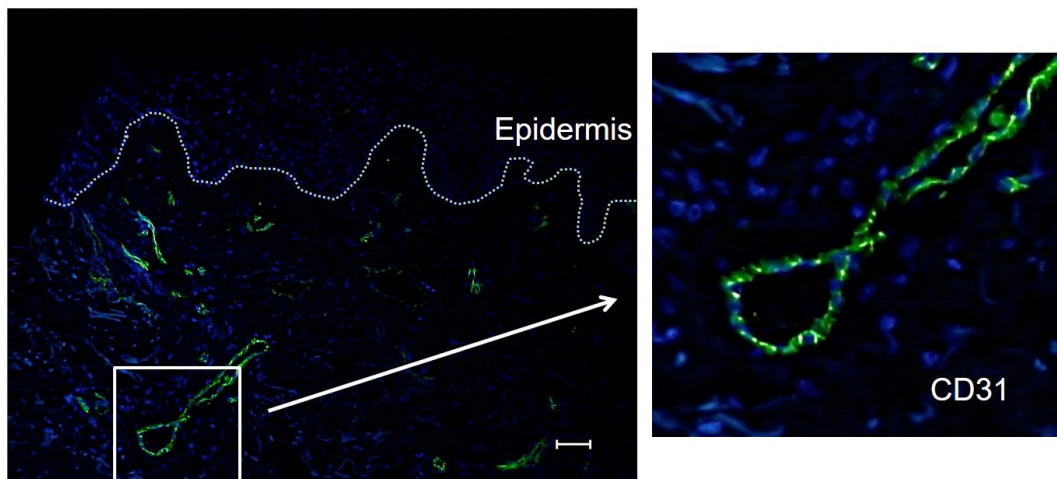
Erwiesen sich die Wundränder als zu groß für die Aufnahme in einem Bild, so wurden mehrere nebeneinander anliegende Fotos angefertigt, die anschließend im Microsoft Image Composite Editor automatisch zu einem größeren Panoramabild zusammengefügt wurden. Die Einstellungen dabei lauteten auf „Planar Motion 1“ und „Quality 100“; es erfolgte kein weiterer Zuschnitt der so generierten Gesamtaufnahme (Crop in alle Richtungen „0“).

Die Auswertung der erstellten Fotos fand mit Hilfe der Software ImageJ statt. Der Wundrand wurde aufgesucht und die gebildete Wundzunge per Freihandselektion ausgewählt. Mittels der integrierten Measure-Funktion wurde die Größe der Wundzunge in Pixeln bestimmt. Innerhalb der Wundzunge wurde bei den Färbungen für CK 6 und Involucrin die Signalintensitäten in den programmeigenen Standardeinheiten („Units“) gemessen (siehe Abbildung 14).



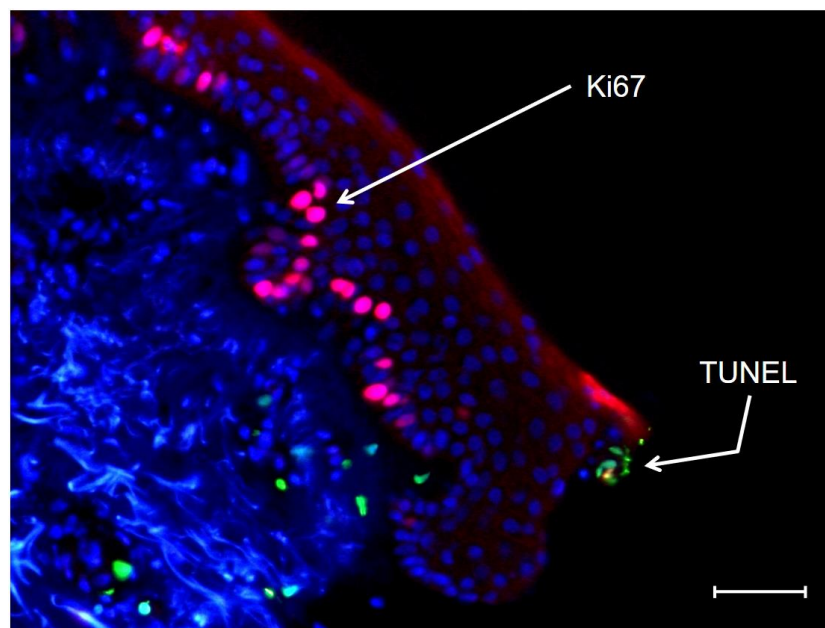
**Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung für CK 6.** Mit Grün ist das Signal für CK 6 angefärbt. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Die durchgezogene Linie markiert den Wundschrittrand, von wo ausgehend sich die Wundzunge ausgebildet hat, die mit gestrichelter Linie selektioniert wurde. Die CK 6-Signalintensitätsmessung erfolgte innerhalb dieses Areals, ebenso wurde die Größe des Areals zur Ermittlung der Wundzungenlänge bestimmt. Skalenlänge 50 µm.

Für die Auswertung des CD31-positiven Areals wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurde der Bildausschnitt so gewählt, dass neben der gesamten Wundzungenfläche ein möglichst großes Areal des subdermalen Gewebes miterfasst wurde. Das gesamte Bild wurde in ein 8-bit-Grey-Scale-Bild umgewandelt und anschließend ein Black-Threshold von „25“ gesetzt, um die nur gering gräulich gefärbten Bereiche von der Auswertung auszuschließen. Zudem wurde eine Mindestarealgröße von 75 pix<sup>2</sup> gesetzt, um kleine unspezifisch gefärbte Areale ebenfalls von Einbezug in die Kalkulation der Gesamtfläche ausschließen. Dann wurde im gesamten Bild die addierte Größe des so selektionierten Färbereichs bestimmt. Abbildung 15 gibt die Färbung für CD31 beispielhaft wieder.



**Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung für CD31.** Grün dargestellt sind die CD31-positiven Areale, die in der Subdermis liegen. Die epidermale Grenze ist durch eine gestrichelte Linie verdeutlicht. Blaue Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. In der Vergrößerung lässt sich gut der longitudinale Anschnitt eines Gefäßes nachvollziehen. Skalenlänge 50 µm.

Für die Auswertung der Doppelfärbung für Ki67- und TUNEL-positive Zellen wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach dem der Wundrandbereich wie oben beschrieben lokalisiert wurde, wurden alle Zellen innerhalb dieses Bereiches entsprechend ihrer Färbung (Rot für Ki67, Grün für TUNEL, Blau für DAPI) einer Kategorie zugewiesen. Die Anzahl der so kategorisierten Zellen wurde jeweils manuell ausgezählt. In Abbildung 16 ist eine Ki67-TUNEL-Doppelfärbung exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung für Ki67 und TUNEL.** Mit Rot dargestellt sind die Ki67-positiven Zellen, die Hinweise auf eine proliferative Aktivität dieser Zellen geben. Grün dargestellt sind die TUNEL-positiven Zellen, die für apoptotische Prozesse stehen. Blau zeigt die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI an. Gut zu erkennen ist die sich von der intakten Epidermis aus bildende Wundzunge am Hautschnitttrand. Skalenlänge 50µm.

### **2.2.7 Statistische Analyse und Auswertung**

Die statistische Auswertung und Analyse der erhobenen Daten erfolgte nach Beratung durch die Kollegen des Instituts für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Sämtliche mittels der quantitativen Immunhistomorphometrie ermittelten Werte wurden in einer SPSS-Datei eingepflegt. Es erfolgte eine univariante einfaktorielle Varianzanalyse (ANVOA) mit post-hoc-Bonferroni-Korrektur für multiples Testen. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant bewertet. Es wurden einerseits die Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen bzw. Substanzkombinationen innerhalb eines Tages (Intraday-Vergleich) als auch die Unterschiede innerhalb einer Substanz bzw. Substanzkombination über den Kulturverlauf (Interday-Vergleich) statistisch getestet. Die graphische Aufarbeitung und Erstellung der Diagramme erfolgte mit Microsoft Excel 2016.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss der Kulturmedien auf die Wundzungenfläche

In die statistische Auswertung konnten insgesamt 921 Werte für die Ermittlung der mittleren Wundzungenfläche eingeschlossen werden. Der minimale Einzelmesswert betrug 9114,00 pix<sup>2</sup>; als einzelner Maximalwert konnte 1013050,00 pix<sup>2</sup> ermittelt werden. In Tabelle 7 sind die berechneten Mittelwerte und Standardfehler der einzelnen Kulturbedingungen an den entsprechenden Kulturtagen als Übersicht dargestellt.

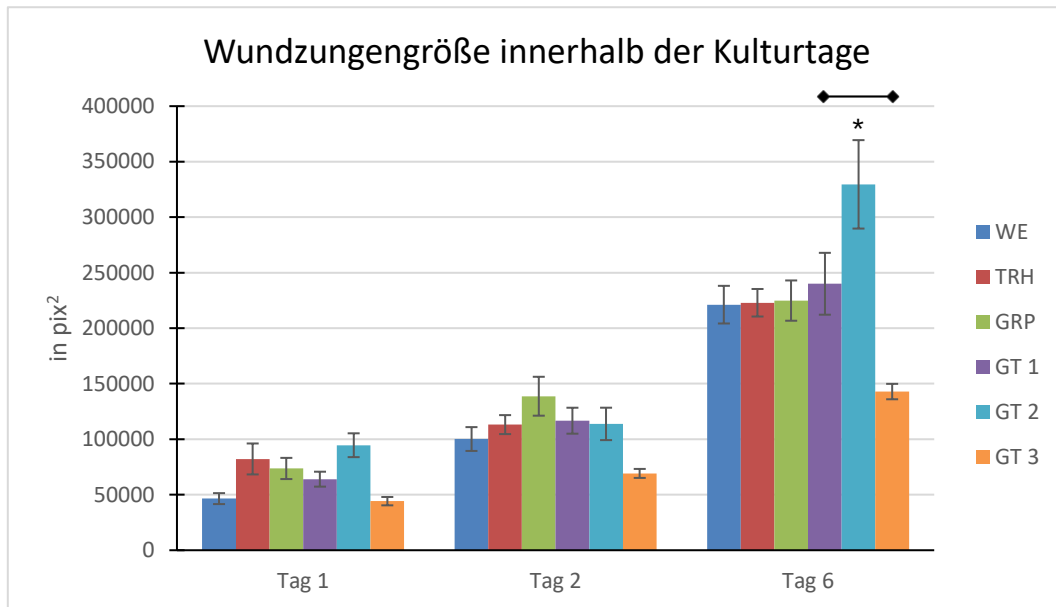
|           | Tag 1      |                | Tag 2      |                | Tag 6      |                |
|-----------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|
| Bedingung | Mittelwert | Standardfehler | Mittelwert | Standardfehler | Mittelwert | Standardfehler |
| WE        | 46500,56   | 4930,80        | 100165,05  | 10729,15       | 221202,57  | 16949,80       |
| TRH       | 82216,38   | 13936,09       | 113163,85  | 8532,39        | 222924,08  | 12393,88       |
| GRP       | 73644,12   | 9539,55        | 138719,45  | 17523,92       | 224866,62  | 18149,34       |
| GT1       | 64013,70   | 6729,06        | 116672,17  | 11679,19       | 240017,61  | 27855,12       |
| GT2       | 94579,81   | 10727,61       | 113785,44  | 14595,91       | 329574,00  | 39839,75       |
| GT3       | 44199,83   | 3753,39        | 69188,69   | 4053,34        | 142916,06  | 6941,35        |

**Tabelle 7:** Mittelwerte und Standardfehler der Wundzungengrößen nach Kulturtag und Kulturbedingung

##### 3.1.1 Vergleich innerhalb eines Kulturtages (Intraday)

In Abbildung 17 ist die durchschnittliche Fläche der Wundzungen am Rande der Stanzen in Abhängigkeit von Kulturtag und Kulturmedium abgebildet. Die statistische Auswertung ergab für den Vergleich der einzelnen Kulturmedien innerhalb des ersten Kulturtages keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell ist für die Ansätze mit TRH und GRP sowie die Kombinationen beider Hormone GT 1 und GT 2 eine leicht größere Fläche zu ermitteln. Für die Kombination GT 3 ist die Wundzungenfläche vergleichbar mit dem Wert des Standardkulturmediums WE. Die größte Wundzungenfläche findet sich für die Kombination GT 2 mit einem Wert von 94579,81 pix<sup>2</sup>, das kleinste Areal ist für die Kombination GT 3 (44199,83 pix<sup>2</sup>) festzustellen. Am zweiten Kulturtag zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis. Während die Werte für TRH und GRP sowie die Kombinationen GT 1 und GT 3 etwas über dem Wert des Standardkulturmediums liegen, liegt die Wundzungenfläche der Kombination GT 3 unterhalb dieses Wertes. Auch hier zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Intraday-Vergleich. Die minimale Wundzungenfläche beträgt 69188,69 pix<sup>2</sup> bei der Anwendung der Kulturmediumkombination GT 3, als Maximalwert lässt sich 138719,45 pix<sup>2</sup> für die alleinige Anwendung von GRP ermitteln. Für den Kulturtag 6 liegen die Werte für TRH, GRP und die Kombination GT 1 auf Niveau des Standardkulturmediums. Es fällt auf, dass die Kombinationen GT 2 eine durchschnittlich größere Wundzungenfläche aufweist als die restlichen Kulturmedien (329574,00 pix<sup>2</sup>), während die Kombination GT 3 die

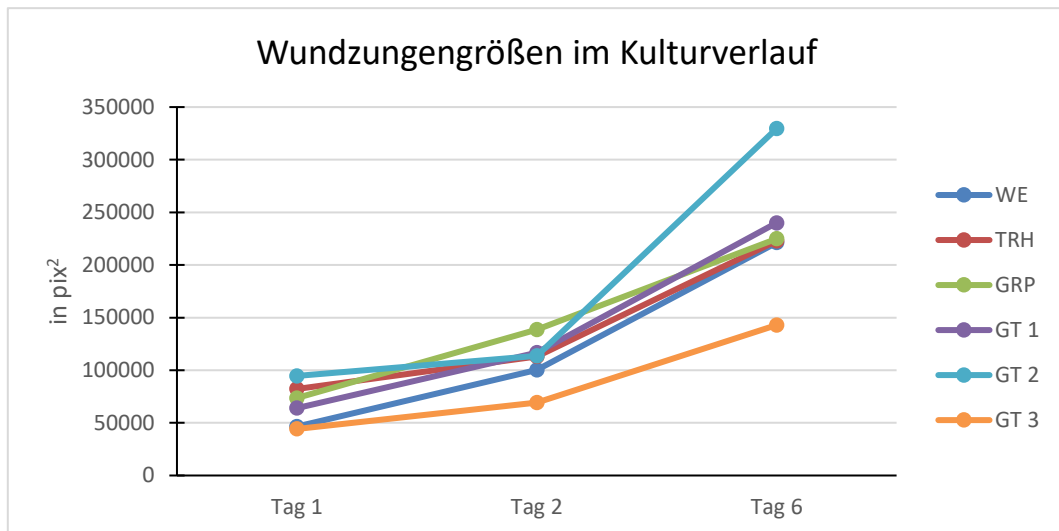
durchschnittlich kleinste Wundzungenfläche (142916,06 pix<sup>2</sup>) aufweist. Statistisch signifikant ist jeweils der Unterschied zwischen der Kombination GT 2 und den anderen Kulturmedien. Außerdem besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Kombination GT 1 und der Kombination GT 3 am sechsten Kulturtag.



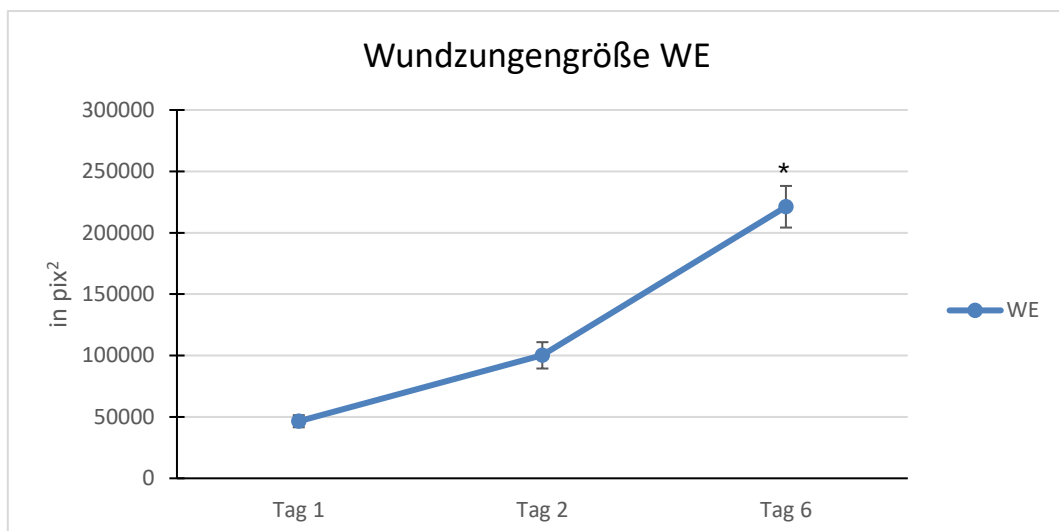
**Abbildung 17: Wundzungengröße innerhalb der Kulturtage.** Es ist die Fläche der Wundzunge nach Kulturtagen und Kulturmedium dargestellt. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen GT 2 und allen anderen Bedingungen (\*) und zwischen GT 1 und GT 3 (↔) am Kulturtag 6.

### 3.1.2 Vergleich zwischen den einzelnen Kulturtagen (Interday)

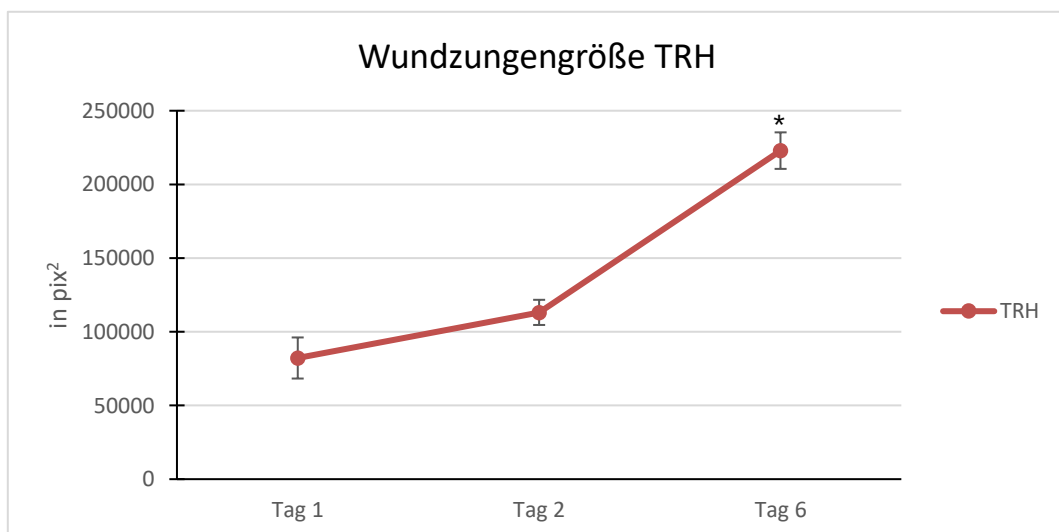
Die Abbildungen 18 bis 24 zeigen den Verlauf der Fläche der Wundzungen über den Kulturzeitraum von 6 Tagen einerseits in einer vergleichenden Darstellung für alle Kulturbedingungen als auch als Einzeldarstellung für jede Kulturbedingung. Zusammenfassend ist festzustellen, dass es unabhängig vom Kulturmedium zu einer konstanten Zunahme der Wundzungenfläche über die Kulturdauer kommt. Für alle sechs getesteten Bedingungen sind die Unterschiede zwischen Tag 1 und 6 sowie die Zunahme von Tag 2 zu Tag 6 statistisch signifikant. Die Zunahme der Wundzungenfläche zwischen Tag 1 und Tag 2 ist zwar in den absoluten Werten nachvollziehbar, bewegt sich jedoch auf nicht signifikantem Niveau.



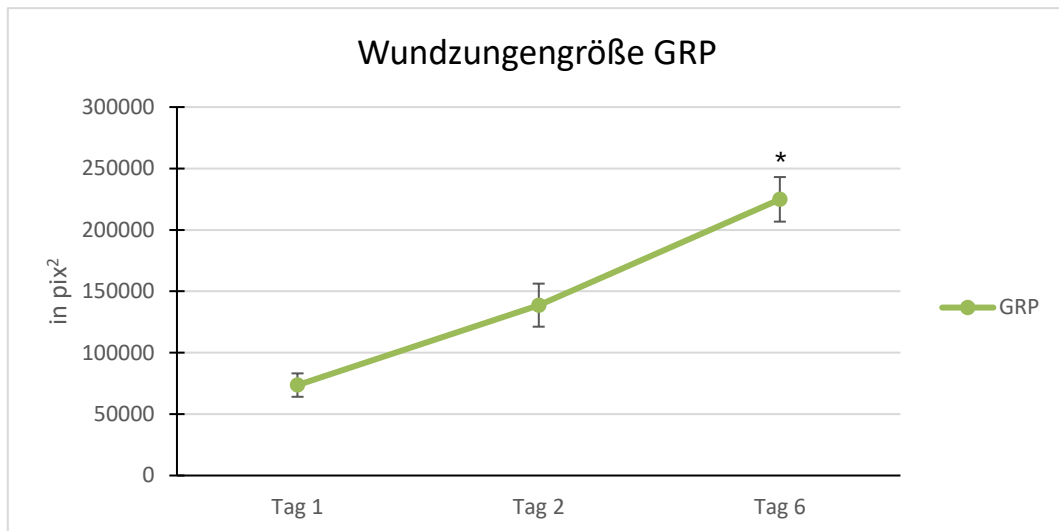
**Abbildung 18: Wundzungen Größe im Kulturverlauf.** Signifikante Unterschiede der Übersicht halber nicht dargestellt (siehe Abbildungen 19 - 24).



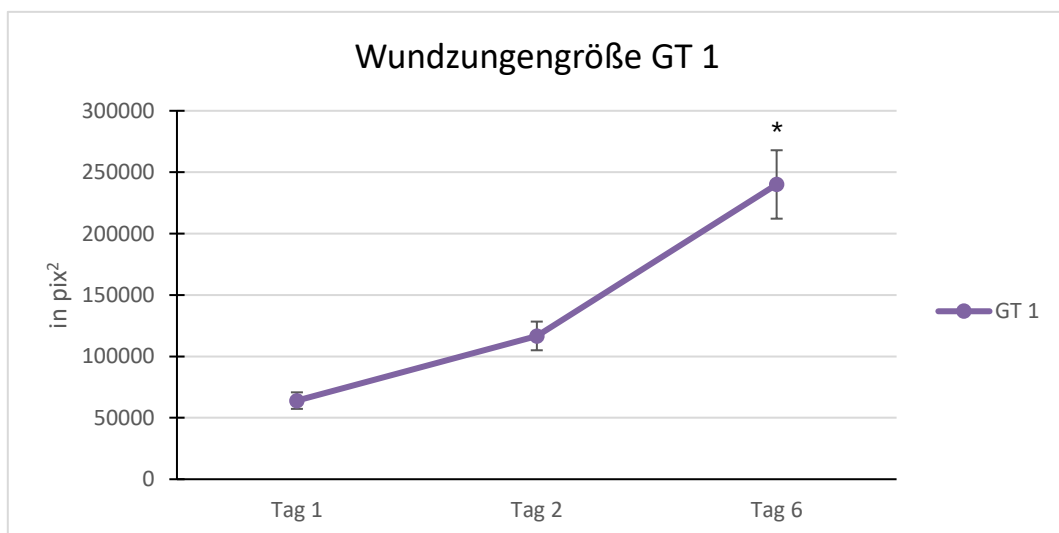
**Abbildung 19: Wundzungen Größe WE.** Darstellung der Wundzungenfläche im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (\*) zwischen Tag 6 und Tag 1 bzw. Tag 2.



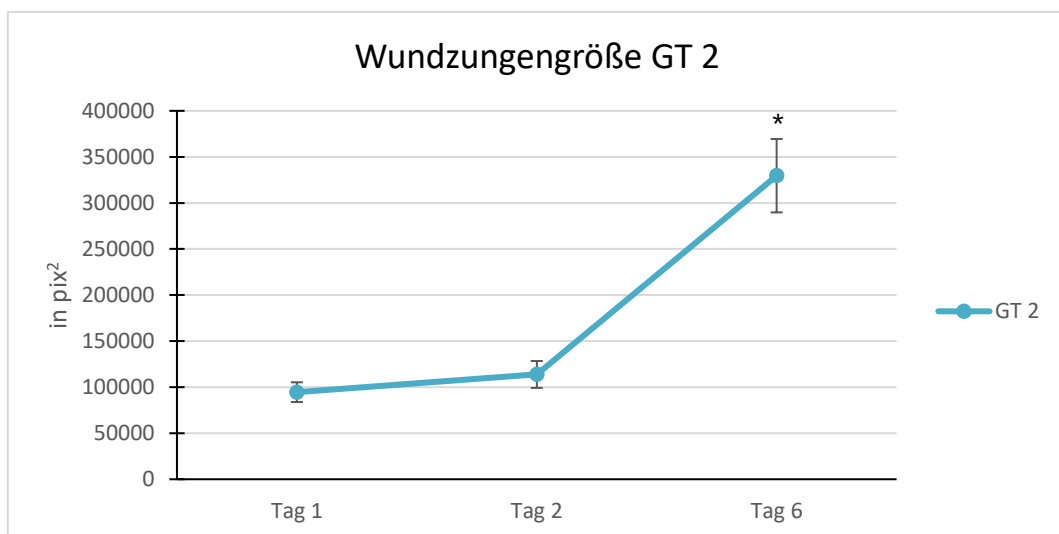
**Abbildung 20: Wundzungen Größe TRH.** Darstellung der Wundzungenfläche im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (\*) zwischen Tag 6 und Tag 1 bzw. Tag 2.



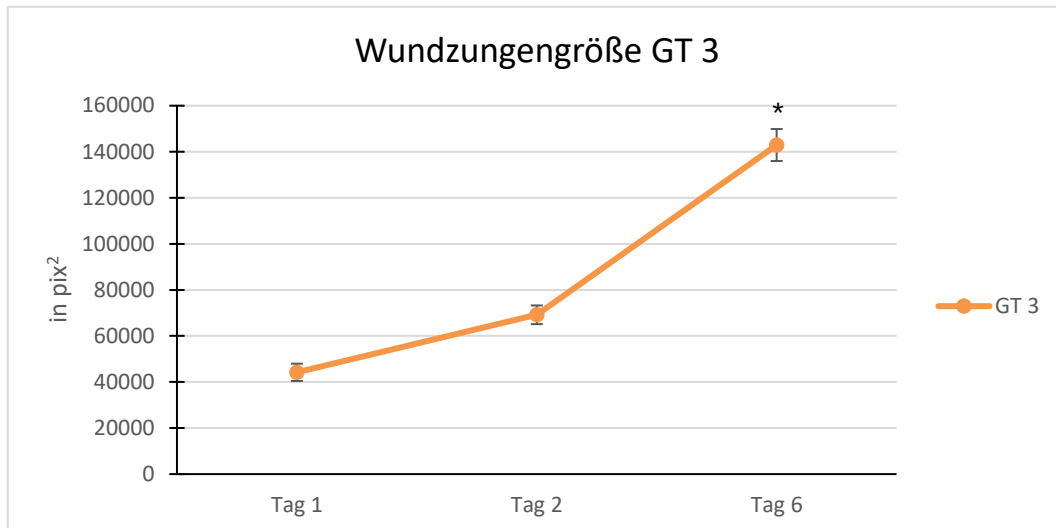
**Abbildung 21: Wundzungengröße GRP.** Darstellung der Wundzungenfläche im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (\*) zwischen Tag 6 und Tag 1 bzw. Tag 2.



**Abbildung 22: Wundzungengröße GT 1.** Darstellung der Wundzungenfläche im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (\*) zwischen Tag 6 und Tag 1 bzw. Tag 2.



**Abbildung 23: Wundzungengröße GT 2.** Darstellung der Wundzungenfläche im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (\*) zwischen Tag 6 und Tag 1 bzw. Tag 2.



**Abbildung 24: Wundzungengröße GT 3.** Darstellung der Wundzungenfläche im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (\*) zwischen Tag 6 und Tag 1 bzw. Tag 2.

### 3.1.3 Reepithelialisierung von gefäßgeschädigter Haut in vitro möglich

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass ausgehend von den Schnitträndern der Hautstanzen gefäßgeschädigter Haut eine epidermale Reepithelialisierung für dieses Patientenkollektel in vitro möglich ist. Diese Effekte nehmen mit der Länge der Kulturdauer zu, während in der Frühphase der Wundheilung (an den ersten zwei Tagen) die Zunahme der Wundzungenfläche von vergleichbarem Ausmaß zwischen den einzelnen Wirkstoffen bzw. Wirkstoffkombinationen ist. In dieser Phase sind keine statistisch nachweisbaren wundheilungsstimulierenden bzw. wundheilungsinhibierenden Effekte von den untersuchten Hormonen oder einer Kombination nachweisbar, auch wenn tendenziell eine Zunahme der Wundzungengröße feststellbar ist. Die Zugabe von TRH oder GRP bzw. eine Kombination davon führt im Allgemeinen zu keiner signifikanten Steigerung oder Inhibition der Wundzungengröße. Lediglich am sechsten Kulturtag lässt sich postulieren, dass eine Kombination von TRH mit einer geringeren Menge GRP ( $\text{GRP } 10^{-7} \text{ M} + \text{TRH } 10^{-6} \text{ M}$ ) einen wundheilungsstimulierenden Effekt hat, während der umgekehrten Kombination ( $\text{GRP } 10^{-6} \text{ M} + \text{TRH } 10^{-7} \text{ M}$ ) eher wundheilungsinhibierende Effekte zugeschrieben werden können.

### 3.2 Einfluss der Kulturmedien auf die Signalintensität von CK 6

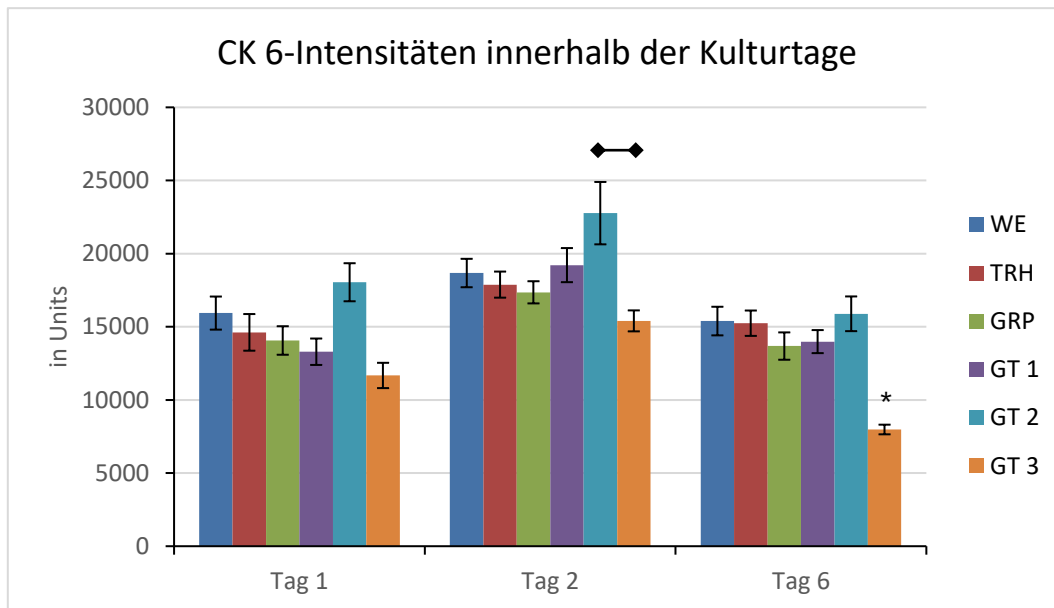
In die statistische Auswertung konnten insgesamt 861 Messwerte für die Ermittlung der durchschnittlichen Signalintensität von CK 6 einfließen. Der minimale Einzelmesswert betrug 2411,00 Units; als einzelner Maximalwert konnte 46952,00 Units ermittelt werden. In Tabelle 8 sind die berechneten Mittelwerte und Standardfehler der einzelnen Kulturbedingungen an den entsprechenden Kulturtagen als Übersicht dargestellt.

|           | Tag 1      |                     | Tag 2      |                     | Tag 6      |                     |
|-----------|------------|---------------------|------------|---------------------|------------|---------------------|
| Bedingung | Mittelwert | Standard-<br>fehler | Mittelwert | Standard-<br>fehler | Mittelwert | Standard-<br>fehler |
| WE        | 15936,81   | 1130,94             | 18674,97   | 970,90              | 15391,63   | 977,37              |
| TRH       | 14618,09   | 1252,42             | 17882,22   | 891,48              | 15244,19   | 866,86              |
| GRP       | 14063,00   | 974,53              | 17355,95   | 758,29              | 13681,83   | 934,71              |
| GT1       | 13293,65   | 903,21              | 19216,11   | 1165,36             | 13986,72   | 788,40              |
| GT2       | 18044,65   | 1299,93             | 22767,85   | 2132,60             | 15888,06   | 1185,93             |
| GT3       | 11673,06   | 864,11              | 15404,43   | 716,58              | 7977,59    | 330,17              |

**Tabelle 8:** Mittelwerte und Standardfehler der Signalintensität von CK 6 nach Kulturtag und Kulturbedingung

### 3.2.1 Vergleich der Intensität innerhalb eines Kulturtages (Intraday)

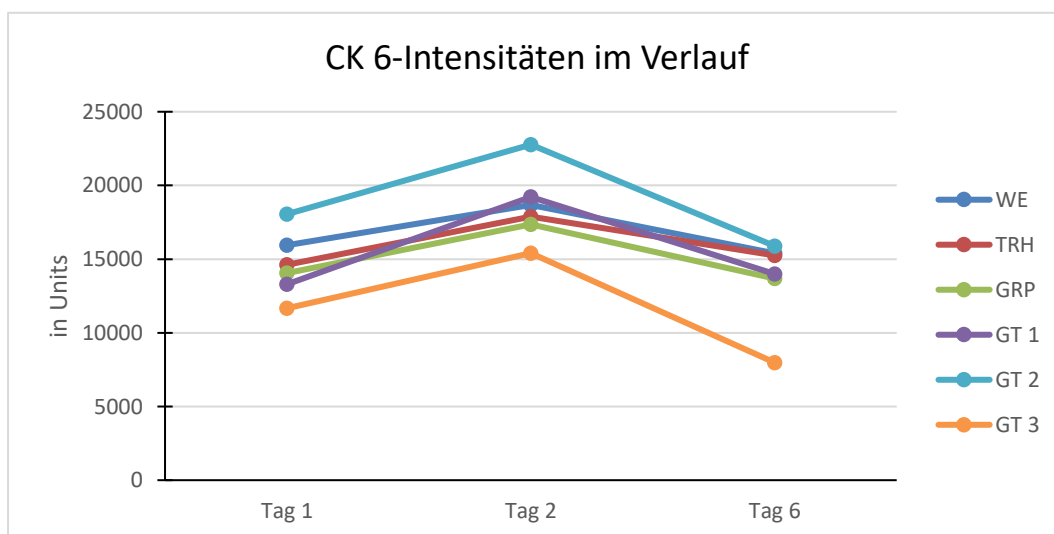
Insgesamt zeigt die Auswertung der Mittelwerte der Signalintensitäten an allen drei Kulturtagen ein homogenes Bild wie aus Abbildung 25 zu ersehen ist. Es sind keine signifikanten Unterschiede am Kulturtag 1 festzustellen. Die höchste durchschnittliche Signalintensität konnte für die Kulturbedingung GT 2 (18044,65 Units) ermittelt werden, der niedrigste Wert beträgt 11673,06 Units für die Kulturbedingung GT 3. Für den Kulturtag 2 zeigt sich ein vergleichbares Bild. Die Kulturbedingungen GT 2 und GT 3 weisen hier ebenfalls den Maximal bzw. Minimalwert auf (22767,85 Units respektive 15404,43 Units), jedoch ist der Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Kulturbedingungen in diesem Fall statistisch signifikant. Die Mittelwerte für die Signalintensitäten am sechsten Kulturtag liegen auf einem vergleichbaren Niveau (Maximalwert GT 2 von 15888,06 Units), mit der Ausnahme der Kulturbedingung GT 3. Hier ist der Mittelwert der Signalintensität niedriger als für die Vergleichsbedingungen (Minimalwert 7977,59 Units). Der statistische Vergleich zeigt, dass die Unterschiede von GT 3 zu den anderen Kulturmedien an diesem Tag jeweils statistisch signifikant ist.



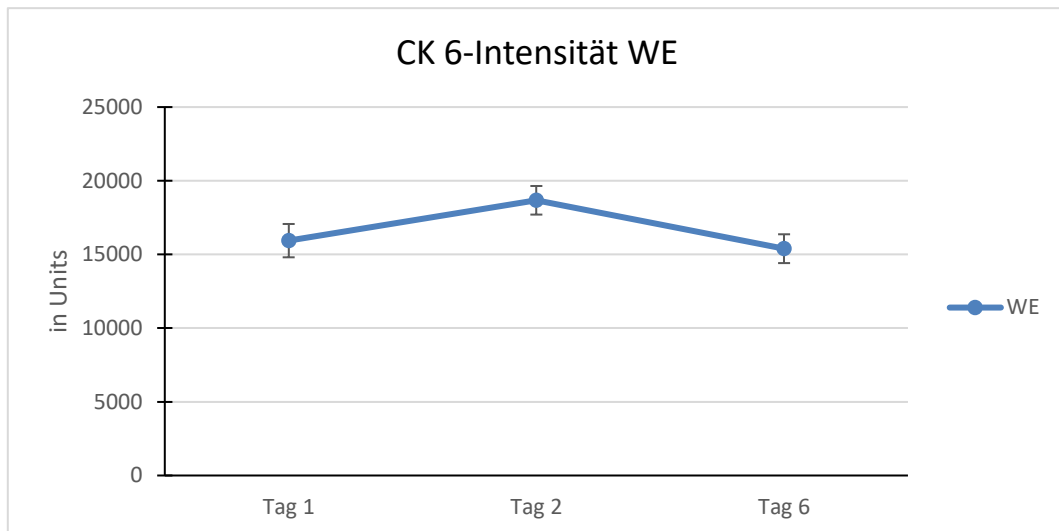
**Abbildung 25: CK 6-Intensitäten innerhalb der Kulturtage.** Es sind die Intensitäten von Zytokeratin CK 6 nach Kulturtagen und Kulturmedium dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen GT 3 und allen anderen Bedingungen (\*) am Tag 6 und zwischen GT 2 und GT 3 (◆◆) am Kulturtag 2.

### 3.2.2 Vergleich der Intensität zwischen den Kulturtagen (Interday)

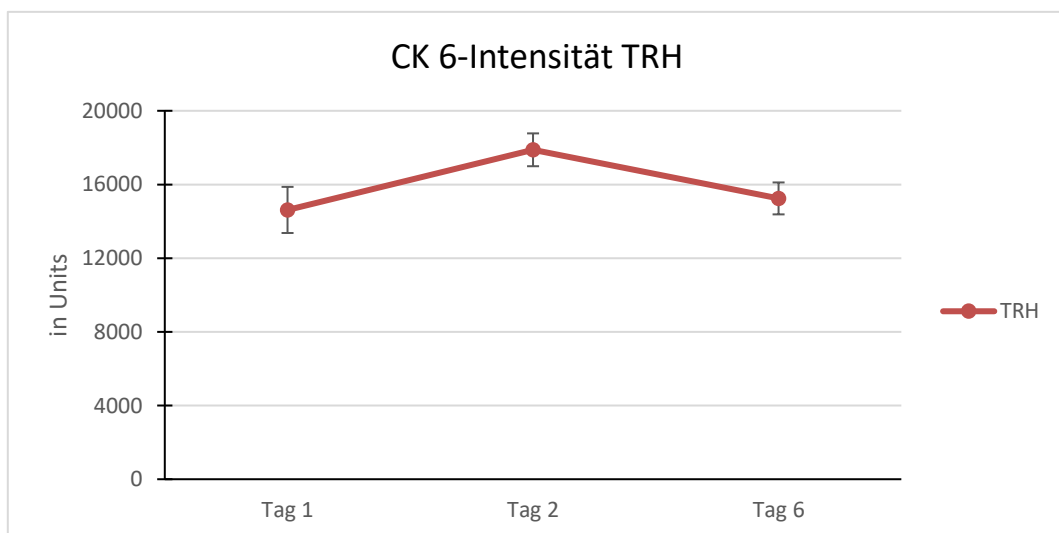
Aus der grafischen Darstellung der einzelnen Kulturbedingungen über den Kulturverlauf (siehe Abbildungen 26 bis 32) lässt sich für alle Kulturmedien ein vergleichbarer Kurvenverlauf feststellen: jeweils am zweiten Kulturtag kommt es zu einem Anstieg der Signalintensität, der danach zum sechsten Kulturtag hin wieder fallend ist. Statistisch signifikant ist dieser Anstieg nur für die Kulturbedingung GT 1, während sich der Abfall von Kulturtag 2 zu Kulturtag 6 neben der Kombination GT 1 auch für die Kombination GT 3 auf statistisch signifikanten Niveau bewegt.



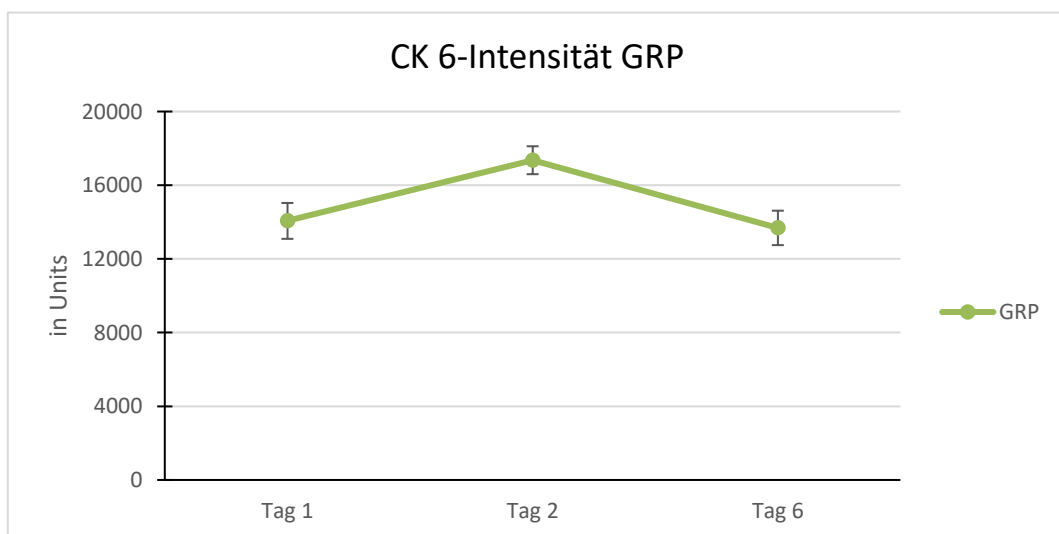
**Abbildung 26: Verlauf der Intensitäten von CK 6.** Signifikante Unterschiede der Übersicht halber nicht dargestellt (siehe Abbildungen 27 - 32).



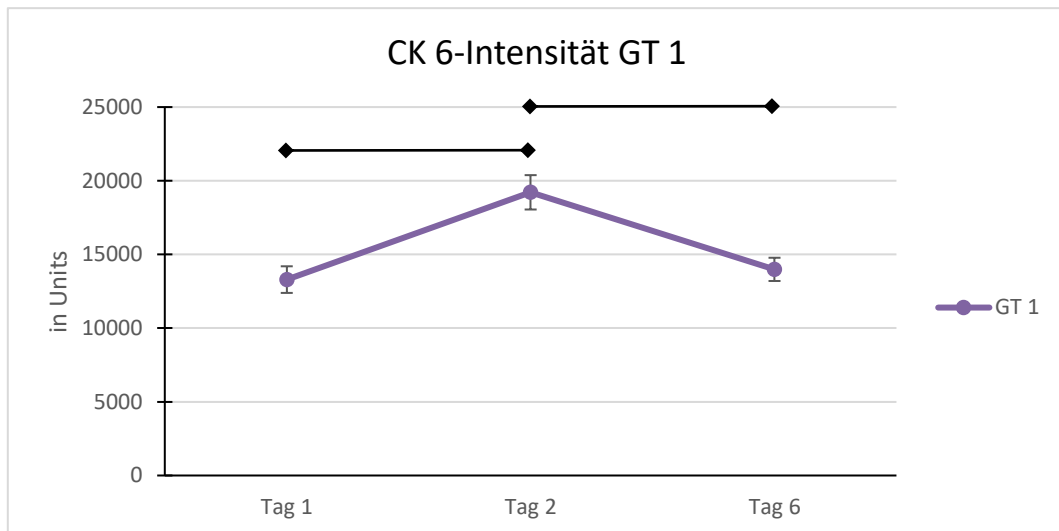
**Abbildung 27: CK 6-Intensität WE.** Darstellung der Intensität von Zytokeratin CK 6 im Kulturverlauf. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



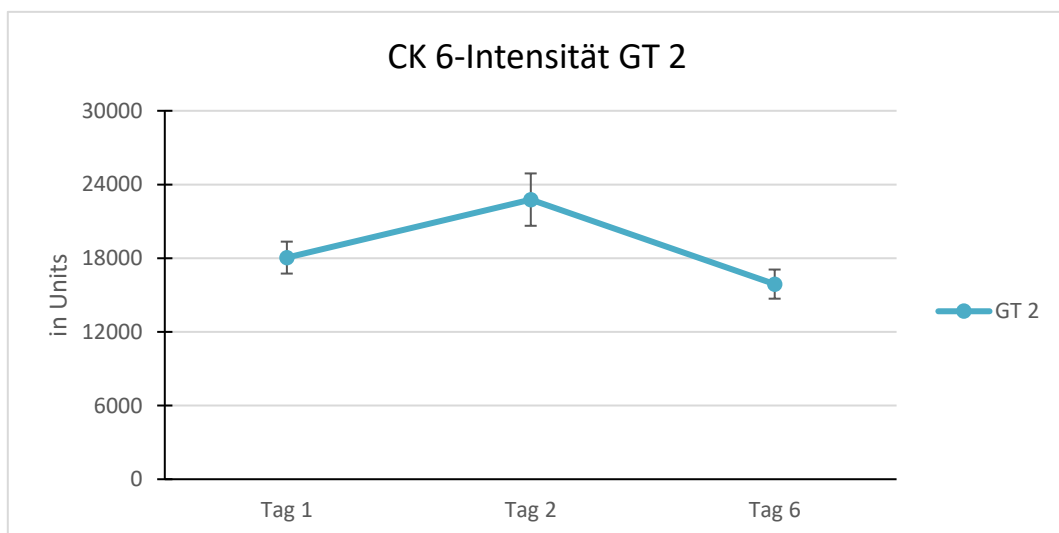
**Abbildung 28: CK 6-Intensität TRH.** Darstellung der Intensität von Zytokeratin CK 6 im Kulturverlauf. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



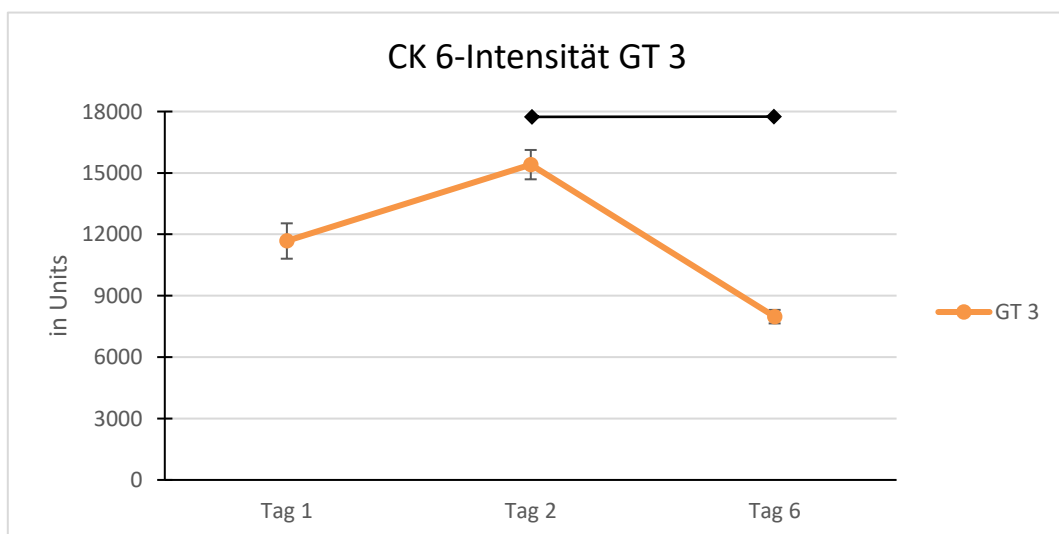
**Abbildung 29: CK 6-Intensität GRP.** Darstellung der Intensität von Zytokeratin CK 6 im Kulturverlauf. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



**Abbildung 30: CK 6-Intensität GT 1.** Darstellung der Intensität von Zytokeratin CK 6 im Kulturverlauf. Signifikante Unterschiede (♦♦) zwischen Tag 2 und Tag 1 bzw. Tag 6.



**Abbildung 31: CK 6-Intensität GT 2.** Darstellung der Intensität von Zytokeratin CK 6 im Kulturverlauf. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



**Abbildung 32: CK 6-Intensität GT 3.** Darstellung der Intensität von Zytokeratin CK6 im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (♦♦) zwischen Tag 2 und Tag 6.

### 3.2.3 TRH und GRP haben keinen Einfluss auf CK 6

Die Darstellung der Ergebnisse für die Signalintensitäten von Zytokeratin CK 6 lässt den übergeordneten Schluss zu, dass bis auf zwei Ausnahmen (siehe unten) die Anwendung von TRH oder GRP oder eine Kombination der beiden Substanzen keinen Einfluss auf die Expression dieses Wundheilungsmarkers hat. Die meisten ermittelten Werte befinden sich auf vergleichbarem Niveau. An Hand des ähnlichen Kurvenverlaufs aller Kulturbedingungen über die Kulturdauer (Interday-Vergleich) ließe sich eine transiente Signalverstärkung am zweiten Kulturtag postulieren, die sich jedoch nur für die Kombination von TRH und GRP in äquimolarer Dosis (je  $10^{-6}$  M) statistisch belegen lässt. Wie schon hinsichtlich der Wundzungenfläche (siehe Kapitel 3.1) festgestellt, zeigt lediglich die Kombination von TRH und GRP mit einer geringeren TRH-Dosis (GT 1;  $10^{-7}$  M TRH) einen vermeintlich negativen Effekt auf die Expression von Zytokeratin CK 6 im späteren Kulturverlauf (Kulturtag 6) gegenüber den Vergleichsmedien, so dass hier eine wundheilungsinhibierende Wirkung vermutet werden kann.

### 3.3 Einfluss der Kulturmedien auf Involucrin

In die statistische Auswertung konnten insgesamt 1013 Messwerte für die Ermittlung der durchschnittlichen Signalintensität von Involucrin eingeschlossen werden. Der minimale Einzelwert lag bei 1227,00 Units; als einzelner Maximalwert konnte 35487,00 Units ermittelt werden. In Tabelle 9 sind die berechneten Mittelwerte und Standardfehler der einzelnen Kulturbedingungen an den entsprechenden Kulturtagen dargestellt.

|           | Tag 0      |                     | Tag 1      |                     |
|-----------|------------|---------------------|------------|---------------------|
| Bedingung | Mittelwert | Standard-<br>fehler | Mittelwert | Standard-<br>fehler |
| WE        | 5692,29    | 459,77              | 9381,29    | 636,25              |
| TRH       | n/a        | n/a                 | 9288,31    | 870,71              |
| GRP       | n/a        | n/a                 | 8493,31    | 630,04              |
| GT1       | n/a        | n/a                 | 8332,53    | 540,31              |
| GT2       | n/a        | n/a                 | 7117,15    | 1310,07             |
| GT3       | n/a        | n/a                 | 7509,08    | 444,66              |

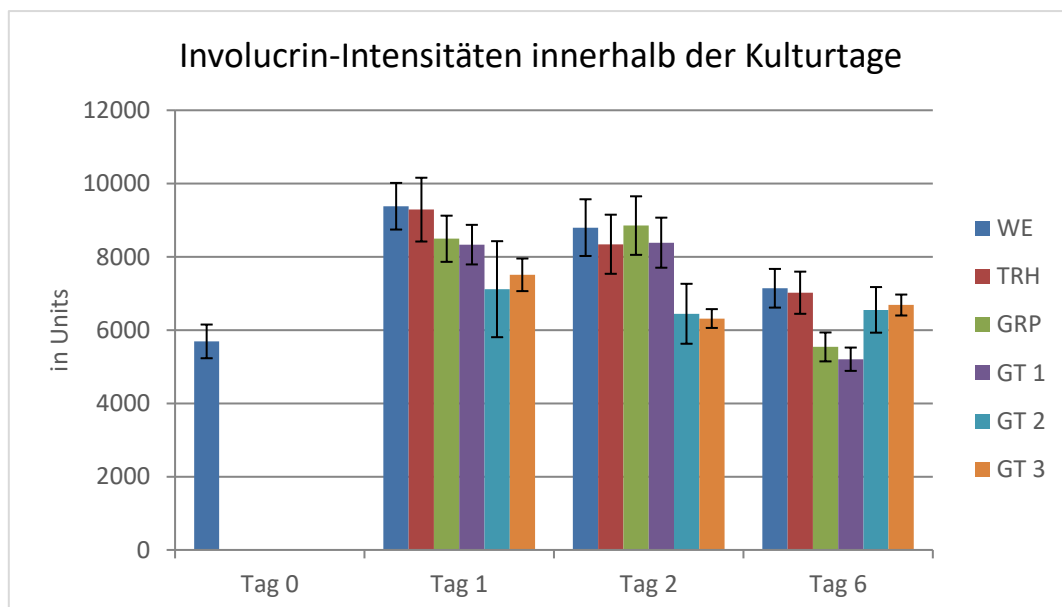
  

|           | Tag 2      |                     | Tag 6      |                     |
|-----------|------------|---------------------|------------|---------------------|
| Bedingung | Mittelwert | Standard-<br>fehler | Mittelwert | Standard-<br>fehler |
| WE        | 8797,18    | 774,03              | 7142,12    | 527,76              |
| TRH       | 8343,43    | 806,70              | 7020,16    | 575,44              |
| GRP       | 8852,74    | 799,14              | 5541,23    | 394,78              |
| GT1       | 8385,98    | 683,27              | 5205,48    | 317,96              |
| GT2       | 6445,78    | 817,89              | 6552,70    | 622,52              |
| GT3       | 6316,22    | 256,53              | 6684,88    | 285,77              |

**Tabelle 9:** Mittelwerte und Standardfehler der Signalintensität von Involucrin nach Kulturtag und Kulturbedingung.

### 3.3.1 Vergleich der Intensität innerhalb eines Kulturtages (Intraday)

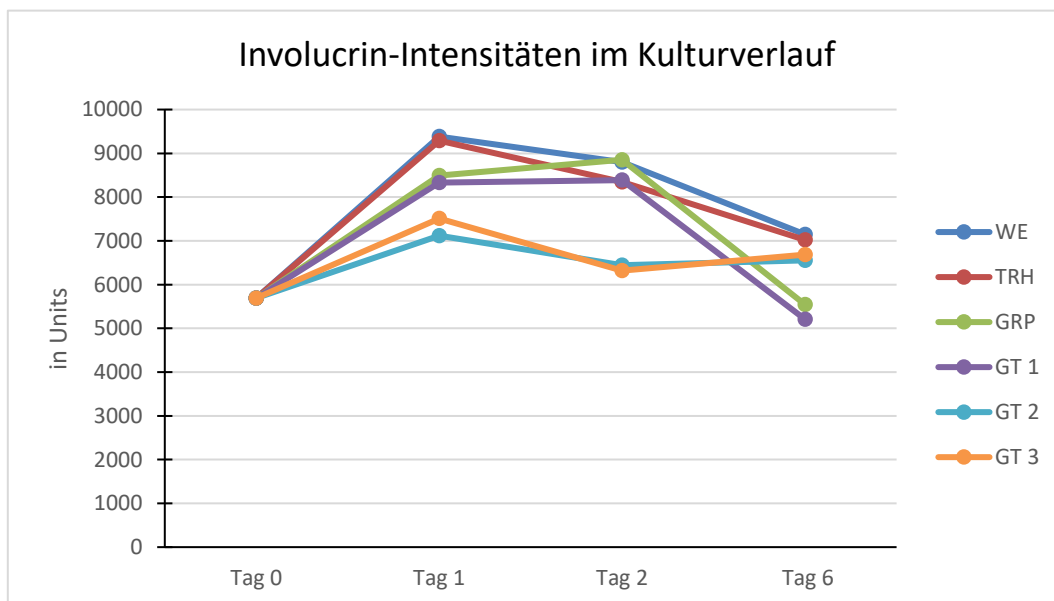
Die Mittelwerte für die Signalintensitäten von Involucrin für die unterschiedlichen Kulturbedingungen sind in Tabelle 9 und Abbildung 33 dargestellt. Am Tag 0 ist die Signalintensität ohne Zugabe eines Hormons oder einer Hormonkombination als Basiswertkontrolle dargestellt. Für die Einzelanwendung bzw. die Kombination von TRH und GRP sind dementsprechend keine Werte verfügbar („n/a“). Während des ersten Kulturtages zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturbedingungen. Mit einem durchschnittlichen Mittelwert von 9381,29 Units weisen die Proben mit dem Standardkulturmedium WE den Maximalwert auf. Der Minimalwert von 7117,15 Units ist für die Kulturmediumkombination GT 2 zu ermitteln. Für den zweiten Kulturtag zeigen die unterschiedlichen Kulturbedingungen ein vergleichbares Verteilungsprofil. Auch hier zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturmedien. Die mit GRP behandelten Hautstanzen erreichten die durchschnittlich höchste Signalintensität (8852,74 Units). Die niedrigste Signalintensität liegt bei der Kombination GT 3 mit einem Mittelwert von 6316,22 Units vor. Ein annähernd übereinstimmendes Verteilungsmuster findet sich ebenfalls am sechsten Kulturtag. Die einzelnen Kulturbedingungen zeigen im Intraday-Vergleich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Als Höchstwert für den sechsten Kulturtag ist eine Signalintensität von 7142,12 Units für das Kulturmedium WE festzustellen, der Minimalwert liegt bei 5205,48 Units für die Wirkstoffkombination GT 1.



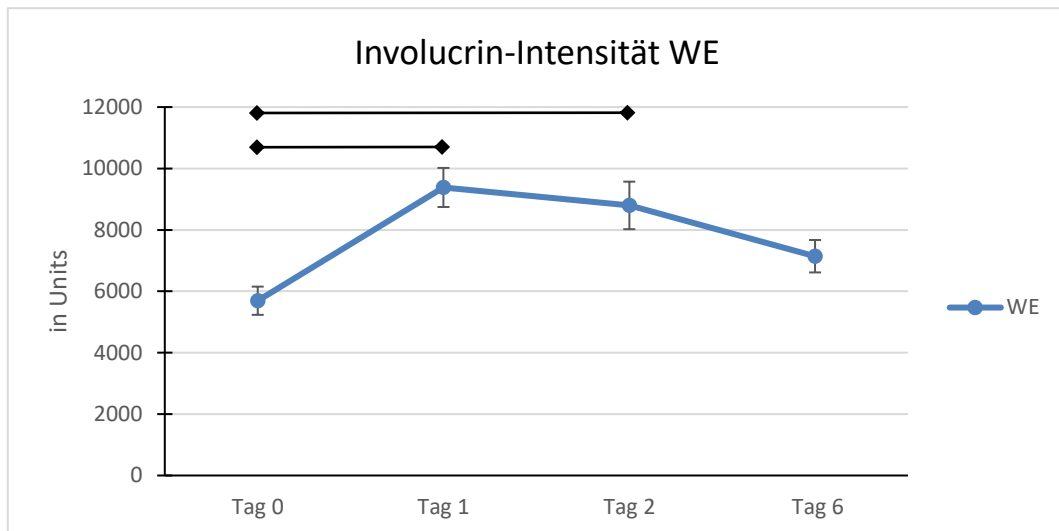
**Abbildung 33: Involucrin-Intensitäten innerhalb der Kulturtage.** Es ist die Intensitäten von Involucrin nach Kulturtagen und Kulturmedium dargestellt. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

### 3.3.2 Vergleich der Intensität zwischen den Kulturtagen (Interday)

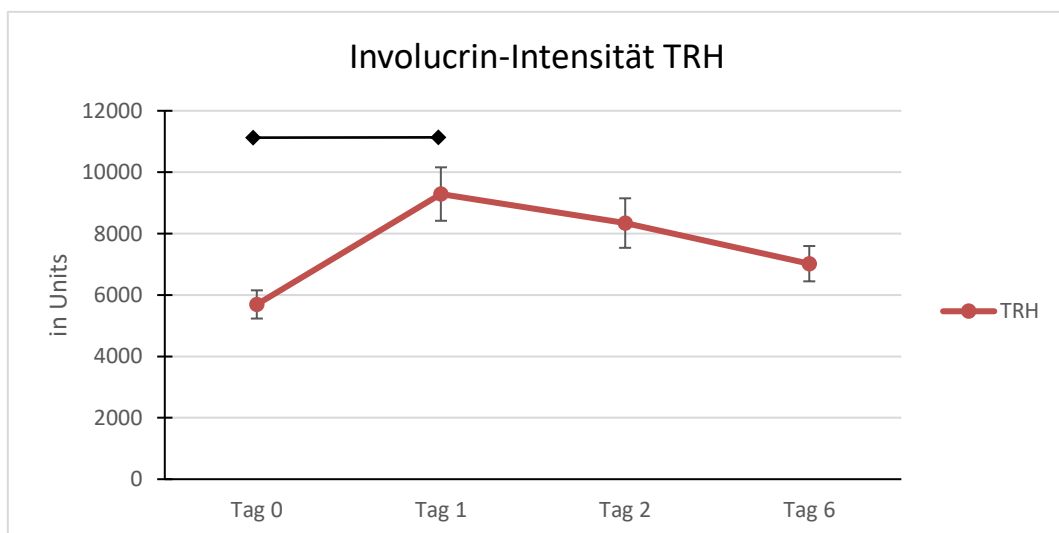
Die Ergebnisse für den Verlauf der Mittelwerte der Signalintensitäten für die einzelnen Kulturbedingungen über die Kulturdauer von sechs Tagen ist in den **Abbildung 34** bis 40 dargestellt. Für alle Bedingungen wurde der gleiche Basiswert am Tag 0 ohne die Zugabe eines Wirkstoffs gewählt. Allen Kulturmedien ist gemeinsam, dass es von Tag 0 zu Tag 1 zu einem Anstieg der mittleren Signalintensitäten kommt, die eine Steigerung der Synthese von Involucrin annehmen lässt. Statistisch signifikant ist dieser Anstieg für die mit dem Standardkulturmedium WE (siehe Abbildung 35) und mit dem Wirkstoff TRH (siehe Abbildung 36) behandelten Hautstanzen. Zum zweiten Kulturtag hin verbleiben die mittleren Signalintensitäten weitestgehend stabil (GRP, GT 1) bzw. fallen leicht ab (WE, TRH, GT 2, GT 3). Für die Kulturmedien WE und GRP bestehen statistisch signifikante Unterschiede zum Kulturtag 0. An Tag 6 ist bei den Kulturbedingungen WE, TRH, GRP und GT 1 die ermittelte Signalstärke für Involucrin geringer als am zweiten Versuchstag. Die Signalstärke bleibt bei GT 2 und GT 3 auf einem vergleichbaren Niveau. Es lassen sich hierbei keine statistisch nachweisbaren Effekte feststellen.



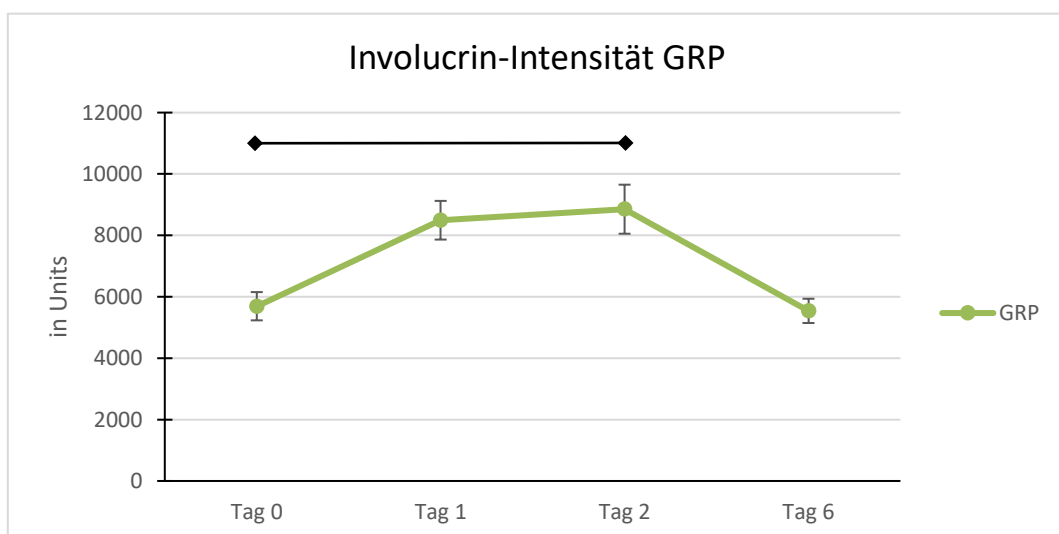
**Abbildung 34: Verlauf der Intensitäten von Involucrin.** Signifikante Unterschiede der Übersicht halber nicht dargestellt (siehe Abbildungen 35 – 40).



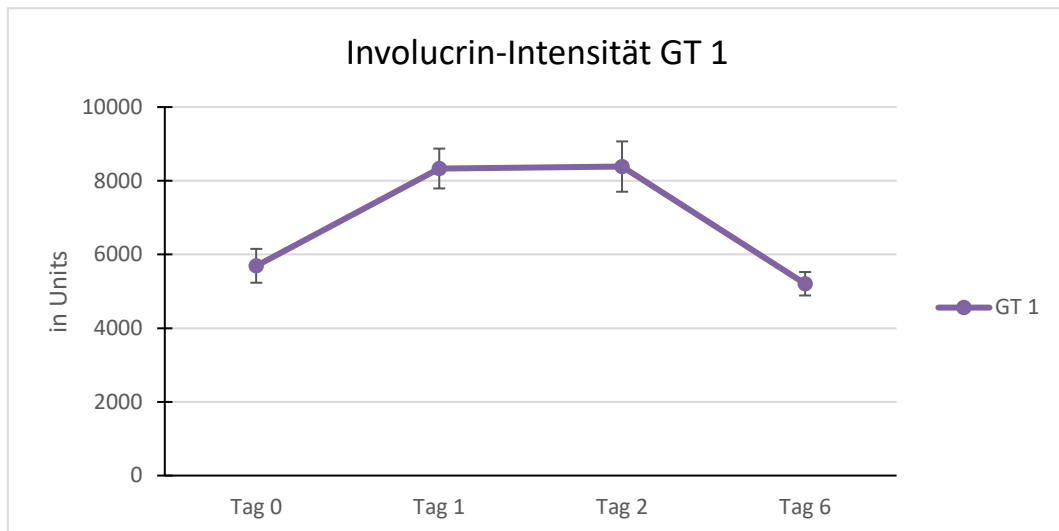
**Abbildung 35: Involucrin-Intensität WE.** Darstellung der Intensität von Involucrin im Kulturverlauf. Signifikante Unterschiede (◆◆) zwischen Tag 0 und Tag 1 bzw. Tag 2.



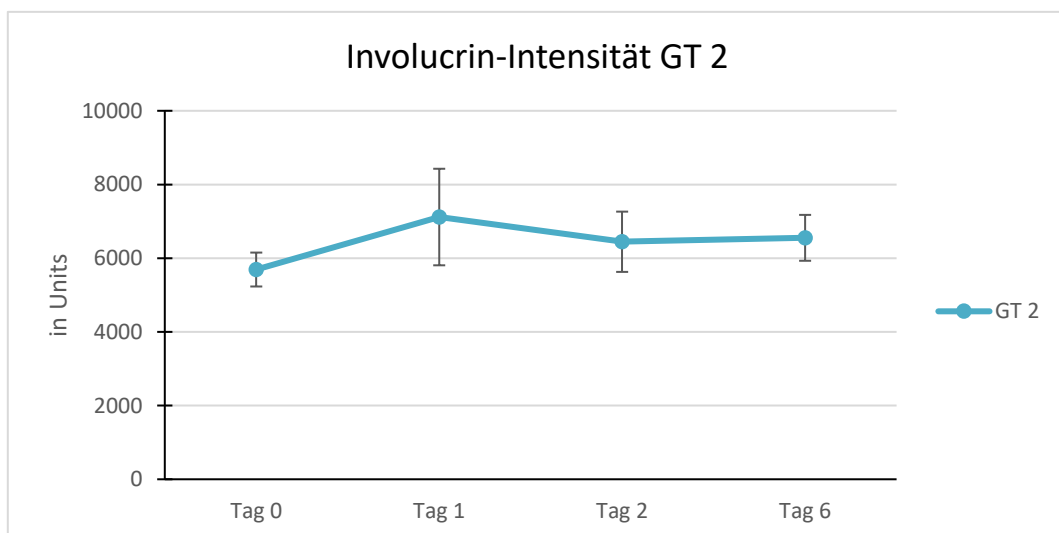
**Abbildung 36: Involucrin-Intensität TRH.** Darstellung der Intensität von Involucrin im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (◆◆) zwischen Tag 0 und Tag 1.



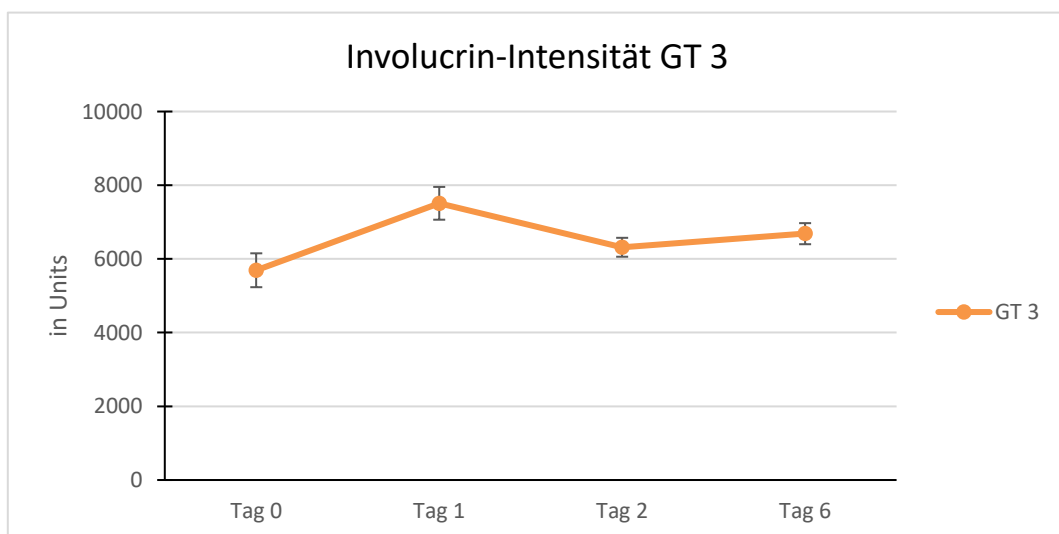
**Abbildung 37: Involucrin-Intensität GRP.** Darstellung der Intensität von Involucrin im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (◆◆) zwischen Tag 0 und Tag 2.



**Abbildung 38: Involucrin-Intensität GT 1.** Darstellung der Intensität von Involucrin im Kulturverlauf. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



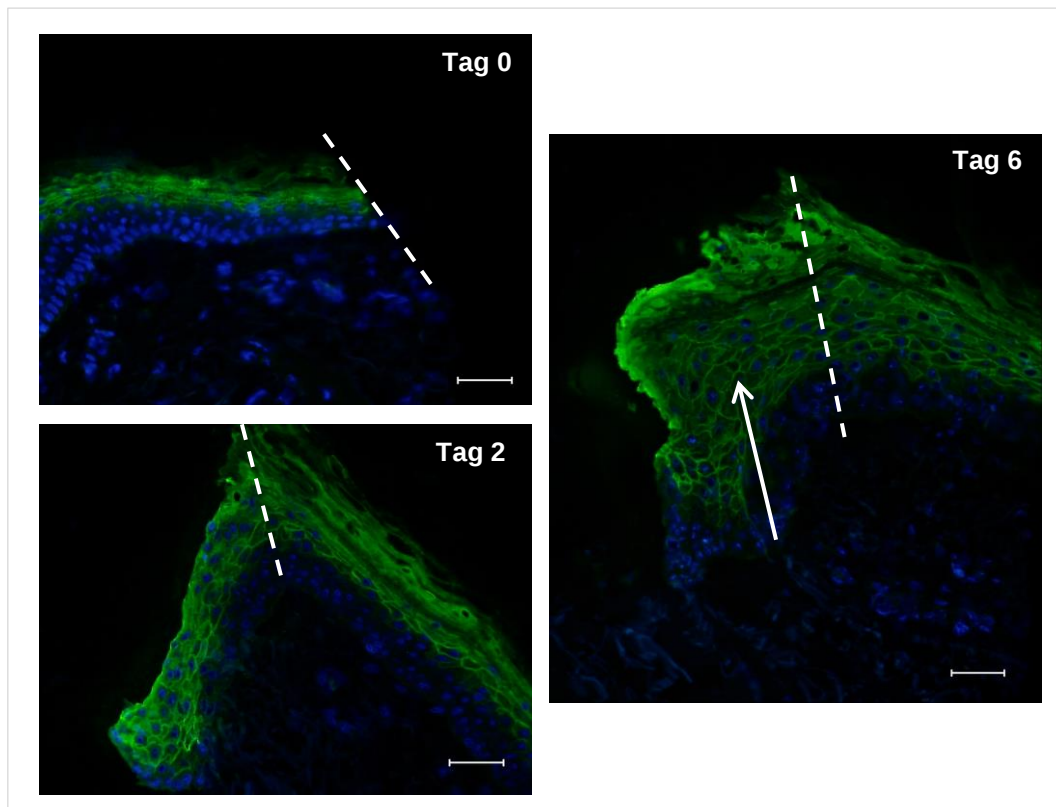
**Abbildung 39: Involucrin-Intensität GT 2.** Darstellung der Intensität von Involucrin im Kulturverlauf. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



**Abbildung 40: Involucrin-Intensität GT 3.** Darstellung der Intensität von Involucrin im Kulturverlauf. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

### **3.3.3 Immunhistomorphologische Veränderungen des Verteilungsmusters von Involucrin über die Kulturdauer**

Hinsichtlich der Signalintensitäten von Involucrin lässt sich zusammenfassend feststellen, dass sowohl TRH als auch GRP bzw. eine Kombination dieser Wirkstoffe keinen wesentlichen Einfluss auf die Intensität des Fluoreszenzsignals innerhalb eines Kulturtages haben und somit ein stimulierender oder inhibierender Effekt unwahrscheinlich ist. In der Betrachtung über die Länge der Kulturdauer ergaben sich Hinweise, dass es zu einer transienten Steigerung der Involucrin-Signalintensität in den ersten Tagen des Experiments kommt, die sich für das Standardkulturmedium WE und TRH und GRP als Einzelsubstanzen auch statistisch belegen lässt, für die kombinatorische Anwendung jedoch nicht. Vielmehr war eine Veränderung des zellulären Verteilungsmusters von Involucrin für alle Kulturbedingungen festzustellen, wie sie in Abbildung 41 dargestellt ist. Am Tag des Ansetzens der Kultur (Tag 0) zeigte sich das Signal fast ausschließlich in den oberen, verhornten Schichten der Epidermis. In den ersten Tagen der Wundheilung kommt es dann zu einer vermehrten Aktivierung von Involucrin sowie einer zunehmenden Konzentration des Proteins in den Zellmembranen. Dieser zelluläre Umlagerungsprozess als Ausdruck der Differenzierung der Keratinozyten lässt sich besonders deutlich am sechsten Kulturtag nachvollziehen. Zu diesem Zeitpunkt sind die einzelnen Zellumrisse in den höheren Schichten der sich neubildenden Epidermis eindeutig zu erkennen. Die Abwesenheit der Zellkerne (fehlende Anfärbung durch DAPI) lässt sich als weiterer Hinweis auf die Differenzierung (beginnende Verhornung) der Keratinozyten an diesem Ort auffassen. Während sich diese Prozesse nicht in der quantitativen Messung der Involucrin-Signalintensitäten für alle Kulturbedingungen widerspiegeln, so waren sie doch qualitativ in allen Versuchsreihen vergleichbar nachzuvollziehen.



**Abbildung 41: Veränderung des zellulären Verteilungsmusters von Involucrin.** Involucrin ist Grün dargestellt. Die blaue Färbung mit DAPI zeigt die Zellkerne an. Wundrand mit gestrichelter Linie dargestellt, Skalenlänge 50  $\mu\text{m}$ . An Tag 0 ist Involucrin in den verhornten Schichten der Epidermis sichtbar. An Tag 2 zeigt sich eine ausgeprägte Signalintensität in der epithelialen Wundzunge und anliegenden Epidermis. Am sechsten Kulturtag werden die Zellumrisse deutlicher als Zeichen der zunehmenden Verlagerung von Involucrin in die Zellmembran als Ausdruck der Keratinozytendifferenzierung (Pfeil).

### 3.4 Einfluss der Kulturmedien auf die Fläche des CD31-positiven Areals

Für die statistische Auswertung konnten 1091 Messwerte für die Ermittlung der durchschnittlichen CD31-positiven Fläche erhoben werden. Die Einzelwerte der Flächen-Areale der CD31-positiven Bereiche nehmen dabei Werte zwischen 0,00  $\text{pix}^2$  und 37711,00  $\text{pix}^2$  an. In Tabelle 10 sind die berechneten Mittelwerte und Standardfehler der einzelnen Kulturbedingungen an den entsprechenden Kulturtagen als Übersicht dargestellt.

|           | Tag 0      |                     | Tag 1      |                     |
|-----------|------------|---------------------|------------|---------------------|
| Bedingung | Mittelwert | Standard-<br>fehler | Mittelwert | Standard-<br>fehler |
| WE        | 3027,04    | 318,62              | 5005,73    | 807,00              |
| TRH       | n/a        | n/a                 | 3340,92    | 547,01              |
| GRP       | n/a        | n/a                 | 3633,61    | 462,57              |
| GT1       | n/a        | n/a                 | 2947,25    | 357,18              |
| GT2       | n/a        | n/a                 | 3807,00    | 462,43              |
| GT3       | n/a        | n/a                 | 5589,10    | 959,08              |

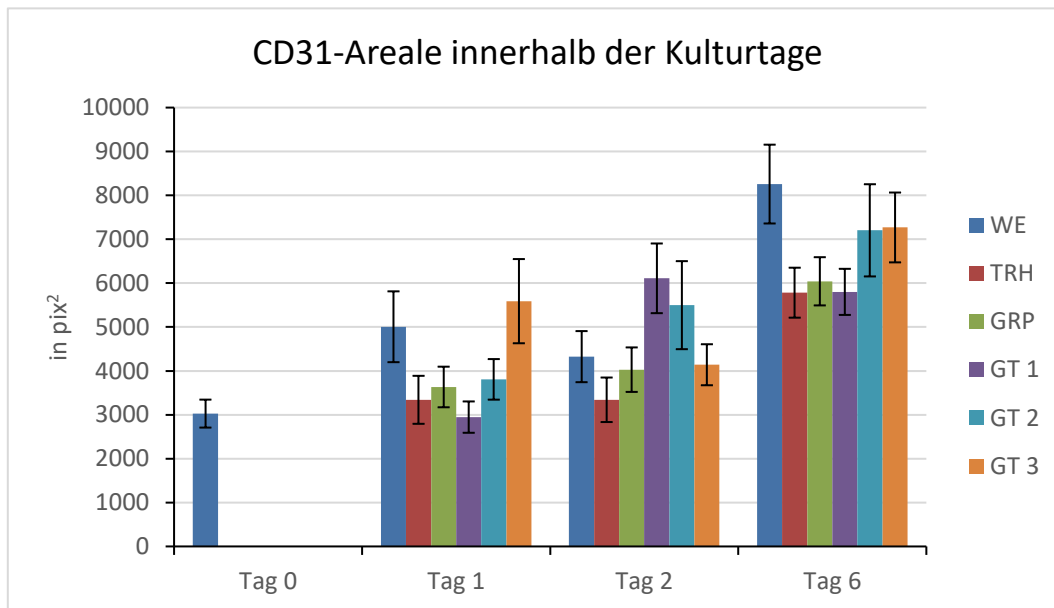
  

|           | Tag 2      |                     | Tag 6      |                     |
|-----------|------------|---------------------|------------|---------------------|
| Bedingung | Mittelwert | Standard-<br>fehler | Mittelwert | Standard-<br>fehler |
| WE        | 4325,00    | 582,23              | 8257,12    | 897,98              |
| TRH       | 3341,99    | 506,97              | 5782,34    | 569,19              |
| GRP       | 4027,89    | 506,98              | 6041,84    | 549,24              |
| GT1       | 6109,65    | 793,91              | 5800,71    | 525,12              |
| GT2       | 5497,82    | 1002,92             | 7203,18    | 1050,51             |
| GT3       | 4140,27    | 467,26              | 7268,75    | 795,94              |

**Tabelle 10:** Mittelwerte und Standardfehler des CD31-positiven Areal nach Kulturtag und Kulturbedingung

### 3.4.1 Vergleich innerhalb eines Kulturtages (Intraday)

Als Ausgangswert erfolgte am Tag 0 des Experiments eine Asservierung von Hautstanzen ohne die Zugabe eines Wirkstoffs (nur Standardkulturmedium WE, andere Werte nicht verfügbar = „n/a“). Hier ließ sich ein durchschnittliches CD31-positives Areal von 3027,04  $\text{pix}^2$  ermitteln. Die durchschnittlichen CD31-positiven Flächen innerhalb der verschiedenen Kulturmedien an den jeweiligen Kulturtagen sind in Abbildung 42 dargestellt. Es fällt auf, dass die Werte für die einzelnen Kulturbedingungen teils stark schwanken. Für den ersten Kulturtag ist festzustellen, dass keine signifikanten Unterschiede innerhalb des Kulturtages bestehen. Die Wirkstoffkombination GT 3 weist den höchsten durchschnittlichen Mittelwert auf (5589,10  $\text{pix}^2$ ). Als niedrigster Wert konnte eine CD31-positive Fläche von 2947,25  $\text{pix}^2$  für die Wirkstoffkombination GT 1 festgestellt werden. Auch am zweiten Kulturtag finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturmedien. Hier liegt der niedrigste Wert für die CD31-positive Fläche für das Kulturmedium TRH vor und beträgt 3341,99  $\text{pix}^2$ . Der Maximalwert der durchschnittlichen CD31-positiven Fläche beträgt am zweiten Kulturtag 6109,65  $\text{pix}^2$  für die Kulturbedingung GT 1. Der statistische Vergleich der Mittelwerte für den sechsten Kulturtag zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den CD31-positiven Arealen unter den einzelnen Kulturbedingungen. Das Kulturmedium WE weist die größte durchschnittliche CD31-positive Fläche auf (8257,12  $\text{pix}^2$ ). Unter der Kulturbedingung TRH ist am sechsten Kulturtag der Tagesminimalwert von 5782,34  $\text{pix}^2$  zu ermitteln.

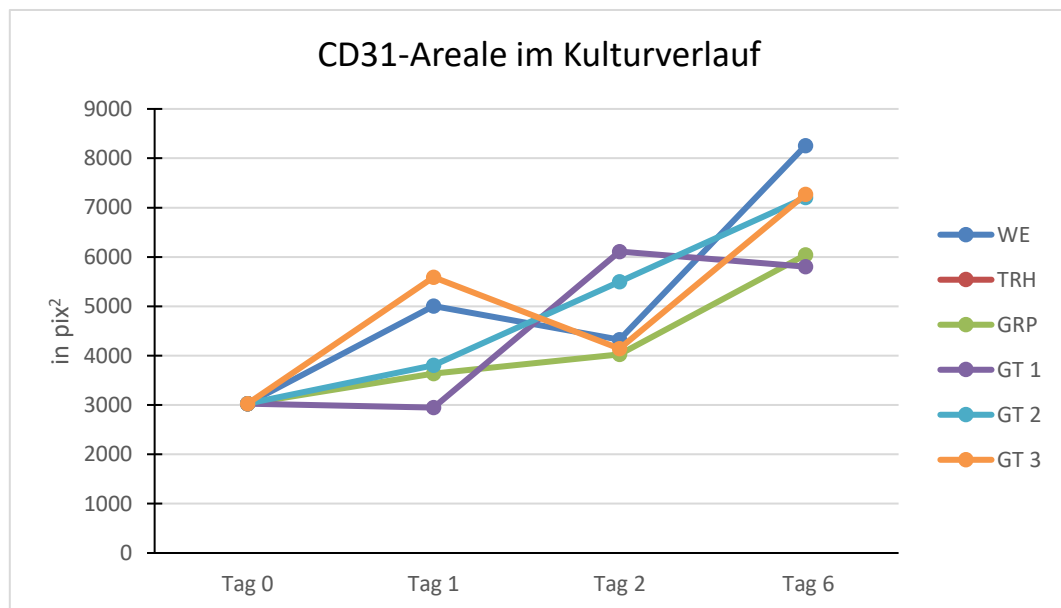


**Abbildung 42: CD31-positive Areale.** Es sind die Flächen der CD31-positiven Areale nach Kulturtagen und Kulturmedium dargestellt. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

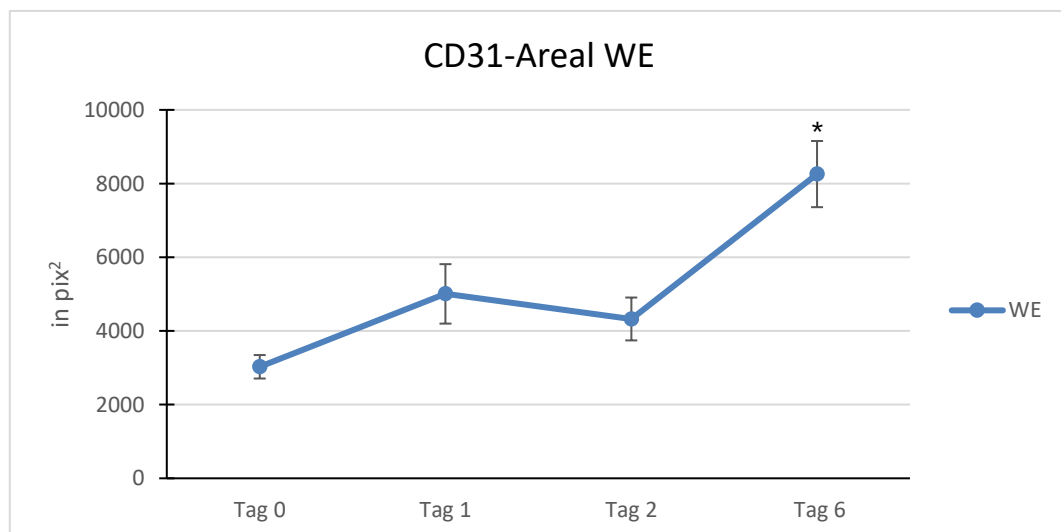
### 3.4.2 Vergleich zwischen den Kulturtagen (Interday)

Der Verlauf der CD31-positiven Fläche für die einzelnen Kulturbedingungen über die Kulturdauer von sechs Tagen ist in den Abbildungen 43 bis 49 dargestellt. Für das Standardkulturmedium WE zeigt sich mit der Ausnahme eines leichten, nicht-signifikanten Abfalls von Tag 1 zu Tag 2 eine stetige Zunahme der CD31-positiven Areale. Die Zunahme zum sechsten Kulturtag ist ausgehend von den anderen Kulturtagen 0, 1, und 2 jeweils statistisch signifikant im Kulturmedium WE (siehe Abbildung 44). Die Fläche der CD31-positiven Areale unter den Kulturbedingungen TRH und GRP ist im Verlauf jeweils zunehmend. Insbesondere zum sechsten Kulturtag hin zeigen sich jeweils Steigerungen, die sich jedoch außerhalb einer statistischen Signifikanz bewegen. Eine stetige Steigerung der CD31-positiven Fläche lässt sich auch für die Wirkstoffkombination GT 2 nachweisen. Hier liegt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Ausgangswert am Tag 0 und den sechsten Kulturtag vor (siehe Abbildung 48). In der Wirkstoffkombination GT 3 ist ein vergleichbarer statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kulturtagen 0 und 6 nachzuweisen. Für diese Kombination zeigt sich ein zwischenzeitlicher Abfall am zweiten Kulturtag vergleichbar dem Verlauf des Standardkulturmediums WE (siehe Abbildung 49). Im Gegensatz zu den anderen Kulturmedien erfolgt der Anstieg der CD31-positiven Fläche in der Kultur mit der Wirkstoffkombination GT 1 bereits vom ersten zum zweiten Kulturtag, um danach

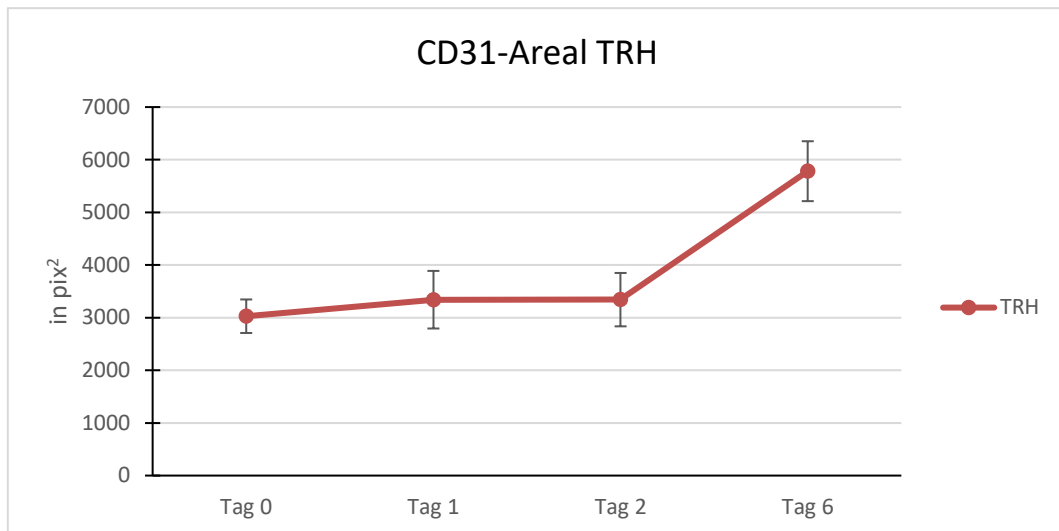
weitestgehend stabil zu bleiben. Dieser Anstieg spiegelt sich als statistisch signifikante Differenz zwischen den Kulturtagen 0 und 2 sowie 1 und 2 wieder (siehe Abbildung 47).



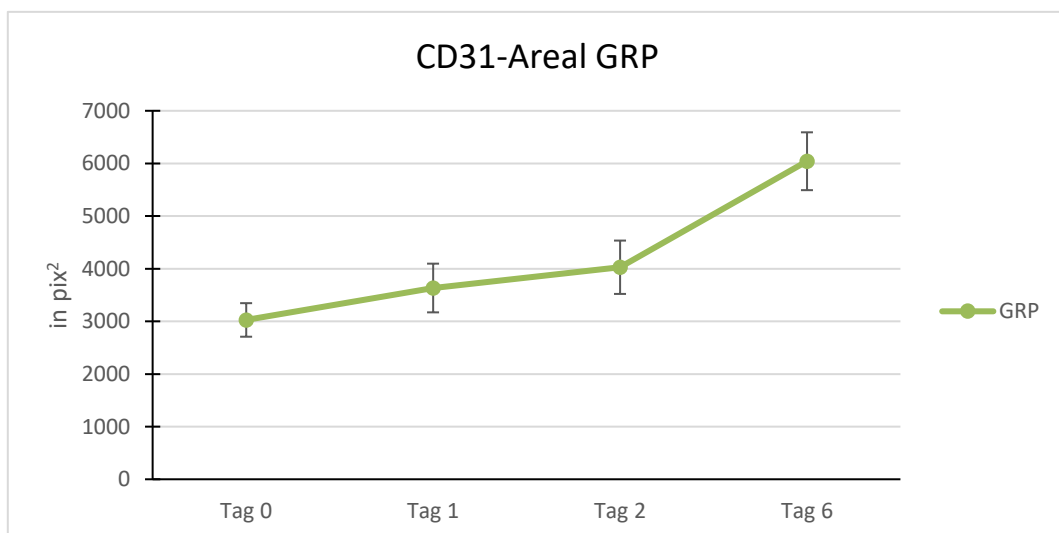
**Abbildung 43: Verlauf der CD31-positiven Areale über die Kulturdauer.** Signifikante Unterschiede der Übersicht halber nicht dargestellt (siehe Abbildungen 44 – 49).



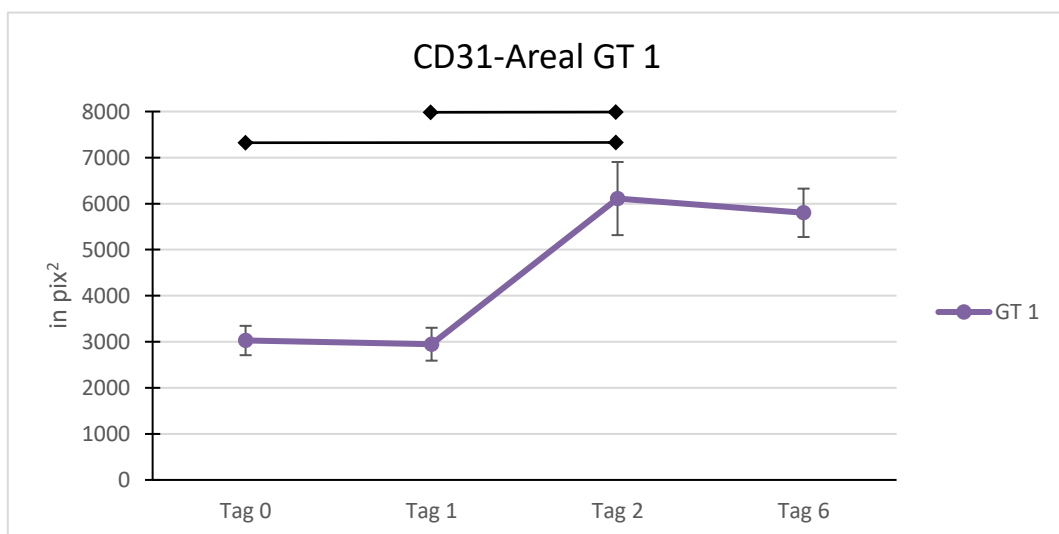
**Abbildung 44: CD31-positive Areale WE.** Darstellung der Flächen der CD31-positiven Areale im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (\*) zwischen Tag 6 und allen anderen Tagen.



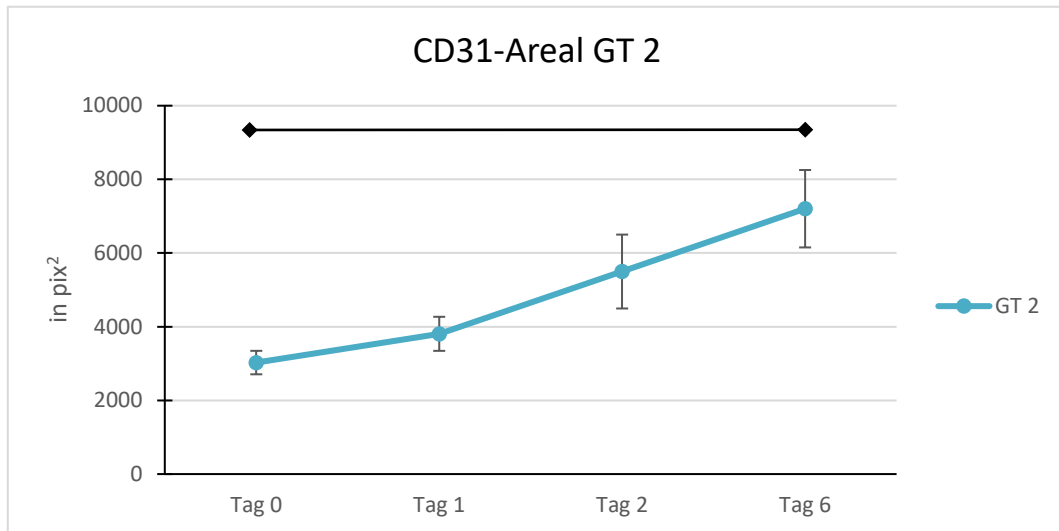
**Abbildung 45: CD31-positive Areale TRH.** Darstellung der Flächen der CD31-positiven Areale im Kulturverlauf. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



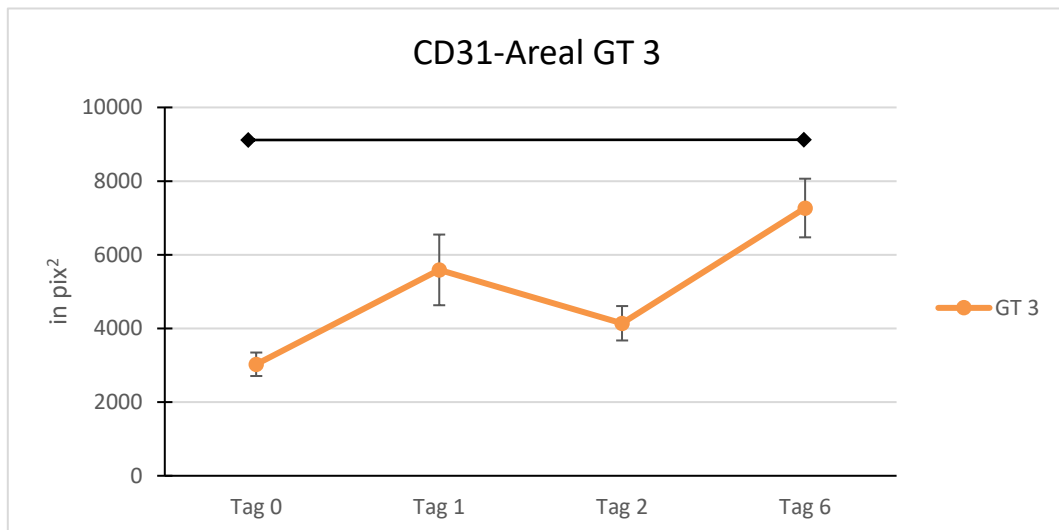
**Abbildung 46: CD31-positive Areale GRP.** Darstellung der Flächen der CD31-positiven Areale im Kulturverlauf. Keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



**Abbildung 47: CD31-positive Areale GT 1.** Darstellung der Flächen der CD31-positiven Areale im Kulturverlauf. Signifikante Unterschiede (◆◆) zwischen Tag 2 und Tag 0 bzw. 1.



**Abbildung 48: CD31-positive Areale GT 2.** Darstellung der Flächen der CD31-positiven Areale im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (◆◆) zwischen Tag 0 und Tag 6.



**Abbildung 49: CD31-positive Areale GT 3.** Darstellung der Flächen der CD31-positiven Areale im Kulturverlauf. Signifikanter Unterschied (◆◆) zwischen Tag 0 und Tag 6.

### 3.4.3 In vitro Zunahme der CD31-positiven Fläche bei gefäßgeschädigter Haut möglich

Für die Untersuchung der durchgeführten Experimente hinsichtlich des Endothelmarkers CD31 lässt sich der Schluss ziehen, dass die Anwendung von TRH und/oder GRP zu keiner signifikanten Zu- oder Abnahme des Endothelzellenareals im Vergleich zur Kontrolle führt. Unabhängig von der angewendeten Kulturbedingung ist eine Zunahme der Fläche des CD31-positiven Areals über die Kulturdauer nachweisbar. Hiermit lässt sich zeigen, dass eine Zunahme des Endothels für gefäßgeschädigte Haut in vitro prinzipiell möglich ist.

### 3.5 Einfluss der Kulturmedien auf die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl proliferativer und apoptotischer Zellen am Wundrand

Für die statistische Auswertung konnten insgesamt 2394 Messwerte für die Ermittlung der mittleren Zellzahlen am Wundrand erhoben werden. Die absolute Anzahl der gezählten Zellen in der Wundzunge in den einzelnen Messungen lag zwischen 0 und 15 (Ki67) bzw. 0 und 64 (TUNEL). Die Gesamtzellzahl (Ki67- + TUNEL- + DAPI-positive Zellen) bewegte sich zwischen 2 und 137 für die einzelnen Messwerte. In Tabelle 11 sind die durchschnittlichen absoluten und relativen Zellzahlen und die zugehörigen Standardfehler für die unterschiedlichen Kulturbedingungen an den einzelnen Kulturtagen als Übersicht dargestellt.

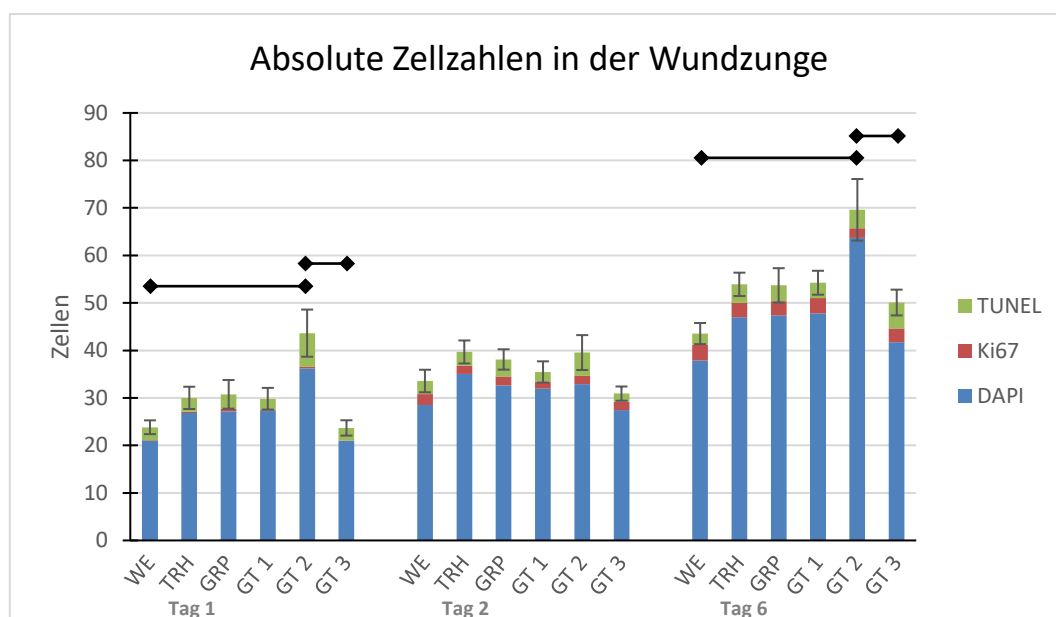
|              | TUNEL | Ki67 | DAPI  | Gesamtzellen | Standardfehler Gesamtzellen | Anteil TUNEL in % | Standardfehler Anteil TUNEL | Anteil Ki67 in % | Standardfehler Anteil Ki67 |
|--------------|-------|------|-------|--------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|------------------|----------------------------|
| <b>Tag 1</b> |       |      |       |              |                             |                   |                             |                  |                            |
| <b>WE</b>    | 2,75  | 0,11 | 20,96 | 23,83        | 10,56                       | 12,02             | 2,03                        | 0,32             | 0,19                       |
| <b>TRH</b>   | 2,93  | 0,23 | 26,86 | 30,02        | 17,67                       | 8,70              | 1,59                        | 1,28             | 0,89                       |
| <b>GRP</b>   | 3,04  | 0,51 | 27,20 | 30,76        | 20,26                       | 10,81             | 1,66                        | 1,14             | 0,42                       |
| <b>GT1</b>   | 2,40  | 0,23 | 27,21 | 29,83        | 16,63                       | 7,40              | 1,55                        | 0,67             | 0,23                       |
| <b>GT2</b>   | 7,08  | 0,36 | 36,20 | 43,64        | 24,84                       | 16,44             | 4,27                        | 0,79             | 0,32                       |
| <b>GT3</b>   | 2,63  | 0,06 | 21,00 | 23,69        | 9,55                        | 9,72              | 1,71                        | 0,15             | 0,15                       |
| <b>Tag 2</b> |       |      |       |              |                             |                   |                             |                  |                            |
| <b>WE</b>    | 2,74  | 2,30 | 28,53 | 33,56        | 17,91                       | 8,86              | 1,34                        | 6,64             | 1,03                       |
| <b>TRH</b>   | 3,57  | 1,72 | 35,06 | 39,68        | 17,13                       | 7,60              | 1,20                        | 4,22             | 0,76                       |
| <b>GRP</b>   | 2,04  | 1,90 | 32,62 | 38,10        | 16,76                       | 10,49             | 1,21                        | 4,83             | 0,68                       |
| <b>GT1</b>   | 4,89  | 1,47 | 31,96 | 35,47        | 16,28                       | 5,33              | 1,06                        | 3,96             | 0,56                       |
| <b>GT2</b>   | 1,74  | 1,78 | 32,89 | 39,56        | 15,58                       | 12,45             | 2,87                        | 4,41             | 0,93                       |
| <b>GT3</b>   | 2,39  | 1,74 | 27,44 | 30,91        | 8,75                        | 4,73              | 0,93                        | 4,96             | 1,13                       |
| <b>Tag 6</b> |       |      |       |              |                             |                   |                             |                  |                            |
| <b>WE</b>    | 2,39  | 3,29 | 37,88 | 43,55        | 15,56                       | 5,11              | 1,01                        | 7,51             | 0,89                       |
| <b>TRH</b>   | 3,03  | 3,03 | 46,98 | 53,92        | 18,89                       | 6,89              | 0,96                        | 6,13             | 0,81                       |
| <b>GRP</b>   | 3,35  | 2,93 | 47,42 | 53,70        | 23,74                       | 5,39              | 1,26                        | 6,01             | 1,00                       |
| <b>GT1</b>   | 3,25  | 3,22 | 47,78 | 54,25        | 17,98                       | 5,36              | 0,86                        | 6,79             | 0,83                       |
| <b>GT2</b>   | 3,90  | 2,00 | 63,70 | 69,60        | 29,02                       | 5,21              | 1,41                        | 2,53             | 0,62                       |
| <b>GT3</b>   | 5,46  | 2,89 | 41,74 | 50,09        | 16,05                       | 10,31             | 1,25                        | 6,85             | 1,25                       |

**Tabelle 11: Mittelwerte der Anzahl der TUNEL-, Ki67- und DAPI-positiven Zellen und Gesamtzellen in der Wundzunge.** Außerdem ist der relative Anteil TUNEL- und Ki67-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl dargestellt. Summenabweichungen der Gesamtzellzahl sind rundungsbedingt.

#### 3.5.1 Intraday-Vergleich der absoluten Zellzahlen

Die absoluten mittleren Gesamtzellzahlen - bestehend aus der Summe der mittleren DAPI-, Ki67- und TUNEL-positiven Zellen in der Wundzunge - pro Kulturbedingung und Kulturtag sind in Abbildung 50 dargestellt. Am ersten Kulturtag ist die größte

durchschnittliche Gesamtzellzahl von 43,64 Zellen für die Substanzkombination GT 2 vorhanden. Der durchschnittliche Minimalwert beträgt 23,69 Zellen für die Wirkstoffkombination GT 3. Die Unterschiede zwischen der Wirkstoffkombination GT 2 und dem Standardkulturmedium WE einerseits und GT 2 und GT 3 andererseits sind statistisch signifikant für diesen Tag des Experiments. Für den zweiten Kulturtag lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Wirkstoffkombinationen feststellen. Die Werte für alle Wirkstoffkombinationen liegen auf vergleichbarem Niveau. Die maximale durchschnittliche Zellzahl beträgt 39,68 Zellen (TRH), als Minimalwert wurden 30,91 Zellen für das Kulturmedium GT 3 ermittelt. Am sechsten Kulturtag liegen wie am Kulturtag 1 statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Wirkstoffkombination GT 2 und dem Standardkulturmedium WE einerseits und der Wirkstoffkombination GT 3 andererseits vor. Hier weist ebenfalls die Kulturbedingung GT 2 mit einem Wert von 69,90 Zellen die höchste durchschnittliche Zellzahl auf. Mit einem Wert von 43,55 Zellen liegt der Minimalwert für die Gesamtzellzahl für das Standardkulturmedium WE vor.

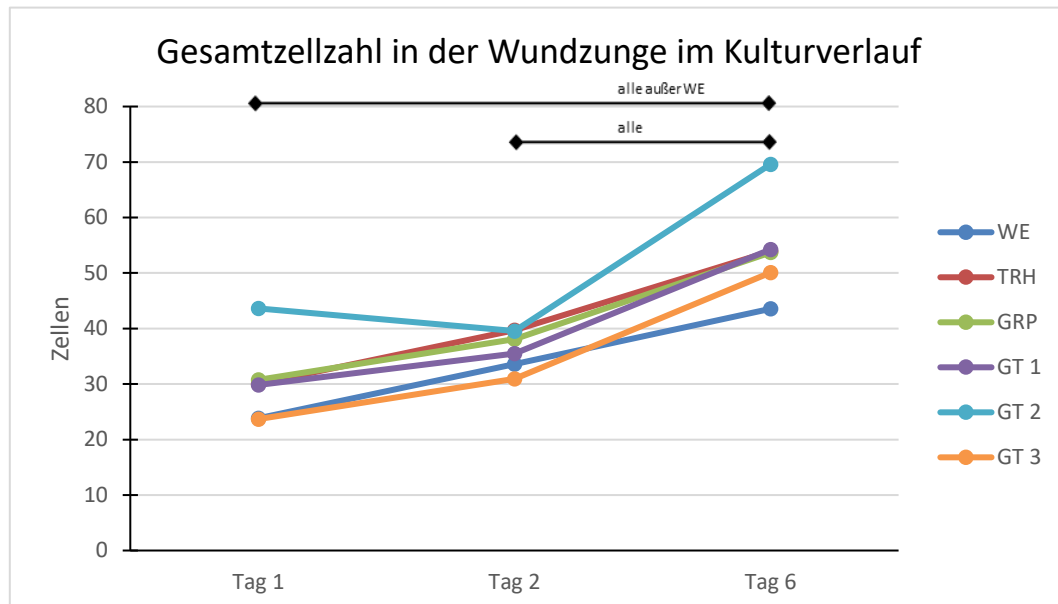


**Abbildung 50: Absolute Zellzahlen am Wundrand.** Es ist die absolute Anzahl DAPI-, Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge pro Kulturbedingung und Kulturtag dargestellt. Die Fehlerindikatoren beziehen sich auf die Gesamtzellzahl. Mit Pfeilmarkierung (◆◆) sind die signifikanten Unterschiede in der Gesamtzellzahl zwischen den einzelnen Kulturbedingungen an einem Kulturtag markiert.

### 3.5.2 Interday-Vergleich der absoluten Zellzahlen

Die Gesamtzellzahl ist für alle Kulturbedingungen über den Verlauf des Experiments über sechs Tage steigend, wie aus Abbildung 51 ersichtlich ist. Mit der Ausnahme des Standardkulturmediums WE zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen

dem ersten und sechsten Kulturtag für alle Kulturbedingungen. Der Anstieg der Gesamtzellzahl vom zweiten zum sechsten Kulturtag ist für alle Kulturbedingungen statistisch signifikant.

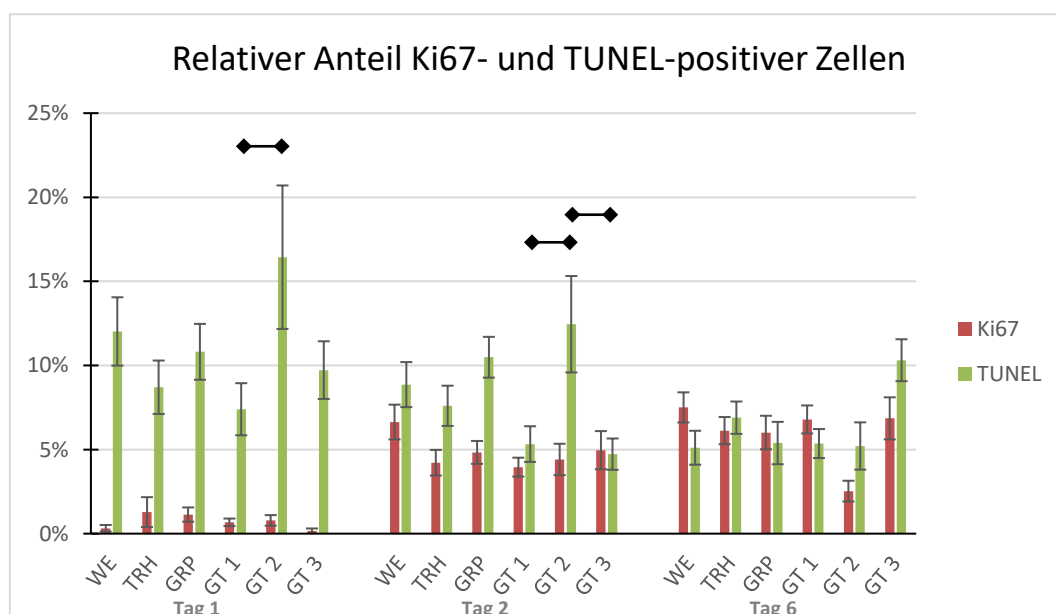


**Abbildung 51: Gesamtzellzahl am Wundrand im Kulturverlauf.** Es ist die absolute Gesamtzellzahl als Verlauf zwischen den einzelnen Kulturtagen für alle Kulturbedingungen dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurde auf die Darstellung der Fehlerindikatoren verzichtet (siehe Abbildung 50). Es bestehen statistisch signifikante Unterschiede (◆◆) für alle Kulturbedingungen mit der Ausnahme von WE zwischen dem ersten und sechsten Kulturtag sowie für alle Kulturbedingungen zwischen dem zweiten und sechsten Kulturtag.

### 3.5.3 Intraday-Vergleich des relativen Anteils Ki67- und TUNEL-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl

Aus dem Verhältnis von Ki67- und TUNEL-positiver Zellen zur Gesamtzellzahl lässt sich der relative Anteil dieser Zellen in der Wundzunge berechnen. Die prozentualen Werte sind in Tabelle 11 aufgeführt und in Abbildung 52 grafisch dargestellt. Am Tag 0 des Experiments bilden sich naturgemäß noch keine Wundzungen aus, so dass sich für diesen Tag keine Werte ermitteln lassen. An den darauffolgenden Tagen des Experimentes lassen sich unter allen Bedingungen sowohl Ki67- als auch TUNEL-positiven Zellen feststellen. Für den ersten Kulturtag ist ersichtlich, dass der Anteil der TUNEL-positiven Zellen den Anteil der Ki67-positiven Zellen deutlich übersteigt. Er bewegt sich zwischen 7,4 % für die Wirkstoffkombination GT 1 und 16,4 % für die Wirkstoffkombination GT 2. Der Unterschied zwischen diesen beiden Kombinationen ist statistisch signifikant. Der Anteil Ki67-positiver Zellen ist deutlich geringer und liegt zwischen 0,15 % für GT 3 und 1,3 % für TRH. Hier bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Am zweiten Kulturtag nähern sich die Anteile Ki67- und TUNEL-positiver Zellen einander an. Dabei steigt der prozentuale Anteil der Ki67-

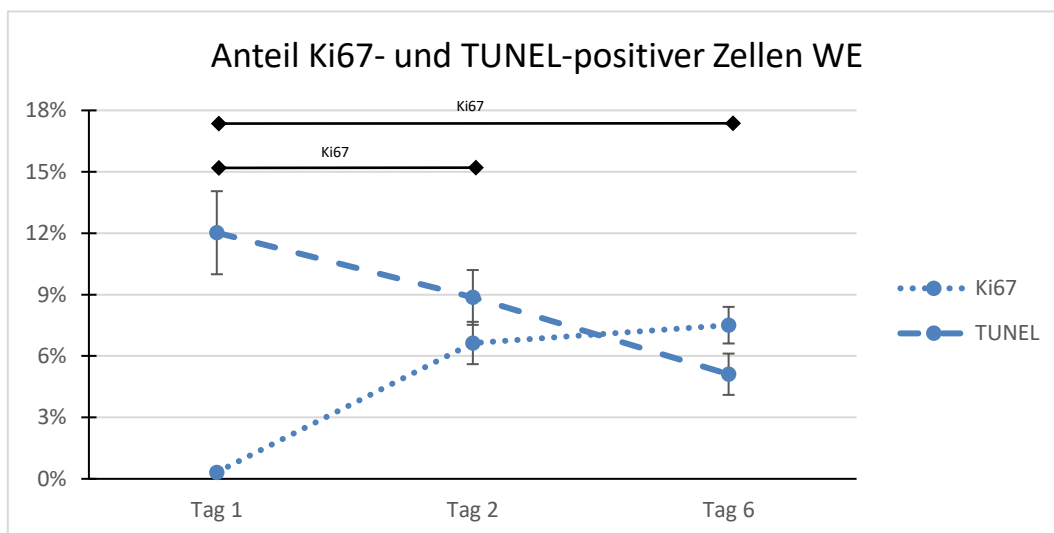
positiven Zellen auf Werte zwischen 4,0 % (GT 1) und 6,6 % für das Standardkulturmedium WE an, ohne dass dabei statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturbedingungen vorliegen. Für die TUNEL-positiven Zellen liegen die Werte zwischen 4,7 % für die Kulturbedingung GT 3 und 12,5 % für GT 2. Neben dem schon am ersten Kulturtag vorliegenden statistisch signifikanten Unterschied zwischen GT 1 und GT 2 hinsichtlich des Anteils TUNEL-positiver Zellen, besteht dieser am zweiten Kulturtag zusätzlich zwischen GT 2 und GT 3. Am sechsten Kulturtag liegt der Anteil Ki67-positiver Zellen zwischen 2,5 % (GT 2) und 7,5 % (WE). Es kann ein minimaler Prozentsatz für TUNEL-positive Zellen von 5,1 % für das Standardkulturmedium WE festgestellt werden, der Maximalwert liegt bei 10,3 % für die Wirkstoffkombination GT 3. Sowohl zwischen den einzelnen Anteilen Ki67-positiver Zellen als auch zwischen den Anteilen TUNEL-positiver Zellen bestehen am sechsten Kulturtag keine statistisch signifikanten Unterschiede. Zudem ist festzustellen, dass am sechsten Kulturtag in der Hälfte der untersuchten Kulturbedingungen der Anteil Ki67-positiver Zellen den Anteil TUNEL-positiver Zellen übersteigt. An den ersten beiden Kulturtagen ist mit der Ausnahme der Kulturbedingung GT 3 am zweiten Tag stets der Anteil der TUNEL-positiven Zellen größer als der der Ki67-positiven Zellen.



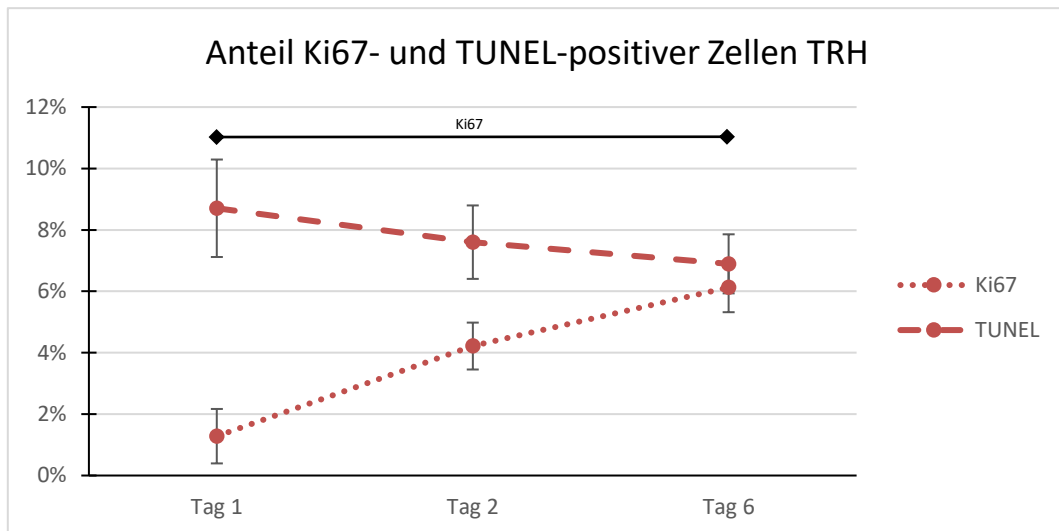
**Abbildung 52: Relativer Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen.** Es ist der relative Anteil der Ki67- und TUNEL-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl in der Wundzunge nach Kulturbedingungen und Kulturtagen dargestellt. Signifikante Unterschiede innerhalb eines Kulturtages sind mit Pfeilmarkierung (◆◆) verdeutlicht.

### 3.5.4 Interday-Vergleich des relativen Anteils Ki67- und TUNEL-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl

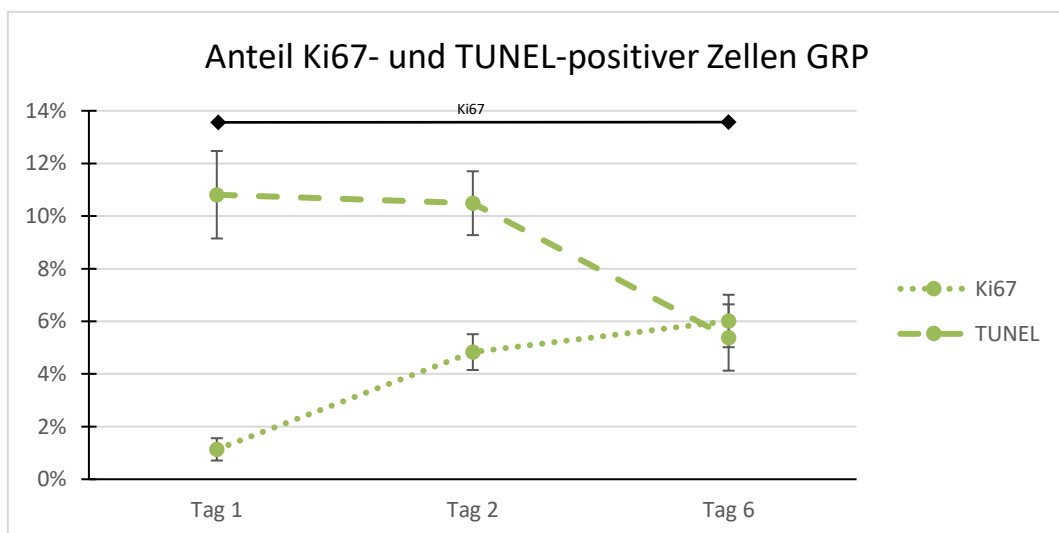
Betrachtet man die erhaltenen Ergebnisse über den Kulturverlauf von sechs Tagen, so ergeben sich folgende, in den Abbildungen 53 bis 58 dargestellten Tendenzen. Der Anteil der Ki67-positiven Zellen steigt in fast allen Kulturbedingungen an (Ausnahme Wirkstoffkombination GT 2 vom zweiten zum sechsten Kulturtag), während der Anteil der TUNEL-positiven Zellen fällt (Ausnahme Wirkstoffkombination GT 3 vom zweiten zum sechsten Kulturtag). Zunächst liegt der Anteil der Ki67-positiven Zellen an den ersten beiden Kulturtagen unterhalb des Niveaus der TUNEL-positiven Zellen, zum sechsten Kulturtag übersteigt er den Anteil der TUNEL-positiven Zellen in der Hälfte der untersuchten Kulturbedingungen (WE, GRP, GT 1). Der Anstieg des Anteils der Ki67-positiven Zellen vom ersten zum sechsten Kulturtag ist in allen Kulturbedingungen mit der Ausnahme von GT 2 statistisch signifikant. Für das Standardkulturmedium WE und die Substanzkombination GT 3 trifft dies auch für den Unterschied zwischen Tag 1 und Tag 2 zu. Zwischen dem zweiten und sechsten Kulturtag lässt sich für keine der untersuchten Bedingungen ein relevanter Unterschied feststellen. Die Auswertung des Anteils der TUNEL-positiven Zellen über den Kulturverlauf ergibt als einzigen statistisch signifikant wertbaren Effekt den Abfall vom ersten zum sechsten Kulturtag für die Wirkstoffkombination GT 2.



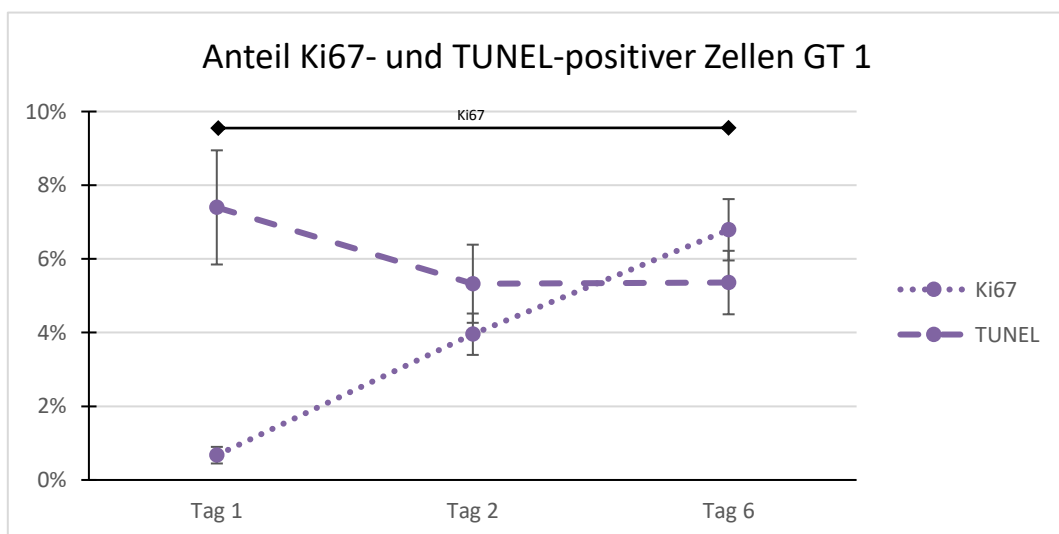
**Abbildung 53: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge für WE.** Signifikante Unterschiede (◆◆) für Ki67 zwischen Tag 1 und Tag 2 bzw. Tag 6.



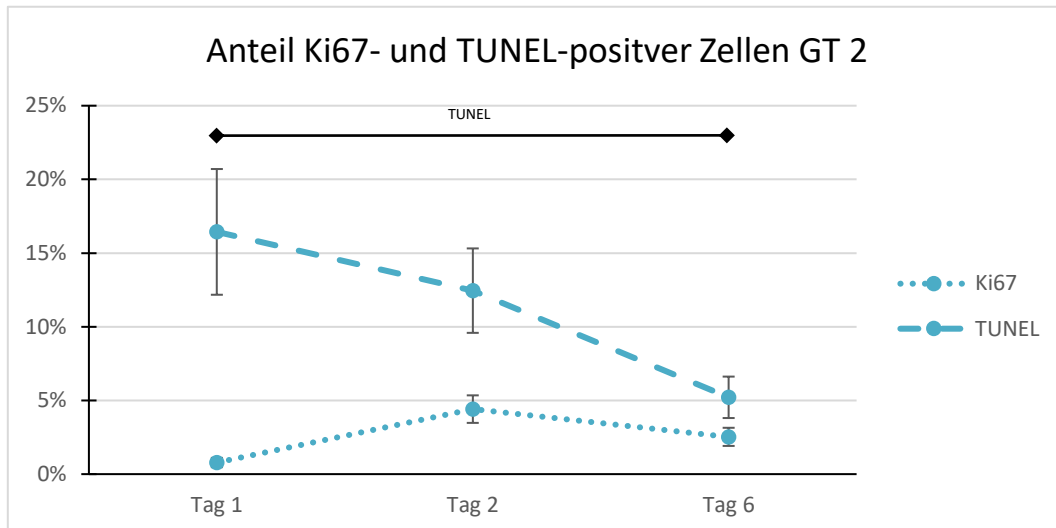
**Abbildung 54: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge für TRH.**  
Signifikanter Unterschied (◆◆) für Ki67 zwischen Tag 1 und Tag 6.



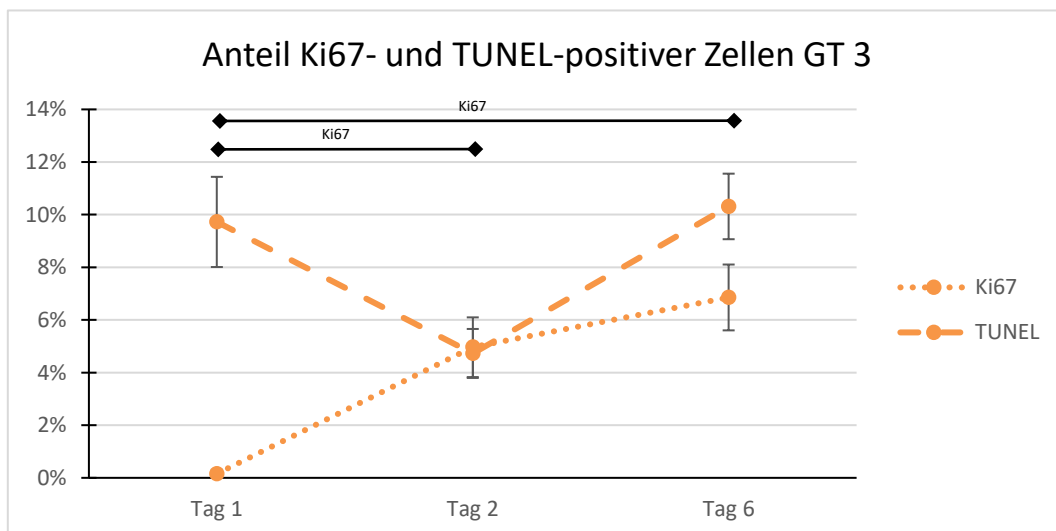
**Abbildung 55: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge für GRP.**  
Signifikanter Unterschied (◆◆) für Ki67 zwischen Tag 1 und Tag 6.



**Abbildung 56: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge für GT 1.**  
Signifikanter Unterschied (◆◆) für Ki67 zwischen Tag 1 und Tag 6.



**Abbildung 57: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundung für GT 2.**  
Signifikanter Unterschied (◆◆) für TUNEL zwischen Tag 1 und Tag 6.



**Abbildung 58: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundung für GT 3.**  
Signifikante Unterschiede (◆◆) für Ki67 zwischen Tag 1 und Tag 2 bzw. Tag 6.

### 3.5.5 Zunahme der proliferativen Aktivität gefäßgeschädigter Vollhaut nach Verletzung in vitro nachweisbar

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Fähigkeit gefäßgeschädigter Haut zur epithelialen Regeneration in vitro nachweisbar ist. Dies konnte durch den Vergleich der Wundungengröße und der Zellzahl in der Wundung nachgewiesen werden. Die Zunahme der Gesamtzellzahl über die Kulturdauer in allen Kulturbedingungen unterstreicht die Tatsache, dass die Anwendung des Vollhaut-Organkulturmodells für gefäßgeschädigte Haut möglich ist. Der Nachweis, dass darüber hinaus spezielle stimulierende oder inhibierende Effekte durch die Anwendung von TRH und/oder GRP bestehen, kann nicht erbracht werden, da sich im überwiegenden Teil keine statistisch

signifikanten Unterschiede zu den Kontrollbedingungen ergaben. Die Zunahme der Gesamtzellzahl könnte auf eine Steigerung der proliferativen Aktivität der basalen Keratinozyten zurückzuführen sein. Die Evidenz hierfür liefert die Steigerung des relativen Anteils Ki67-positiver Zellen im Wundrand, die unter allen Kulturbedingungen auftritt. Hinsichtlich der apoptotischen Zellzahl – verdeutlicht durch den relativen Anteil TUNEL-positiver Zellen – ist wenig verwunderlich, dass diese initial nach Verletzung hoch ist. Ihr Anteil ist dann für die meisten Kulturbedingungen im Verlauf fallend, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Anwendung von TRH und/oder GRP keinen expliziten pro-apoptotischen Einfluss auf die untersuchte, gefäßgeschädigte Haut hat.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Anwendbarkeit des Vollhaut-Organkultur-Modells bei Patienten mit geschädigter Wundheilung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die Anwendbarkeit eines in-vitro-Modells der humanen Wundheilung an der Haut von Patienten mit vaskulär bedingten Wundheilungsstörungen untersucht. Dazu wurden Biopsiestanzen aus dem intakten Hautanteil von Amputaten amputationspflichtiger Extremitäten in Kultur geben und unter Zusatz verschiedener Wirkstoffe über sechs Tage kultiviert. Es folgten morphologische und quantitative Auswertungen und Analysen der Wundheilung mit immunhistochemischen Techniken. Die ermittelten Ergebnisse lassen die zusammenfassende Schlussfolgerung zu, dass das Vollhaut-Organkulturmodell bei gefäßgeschädigter Haut anwendbar ist. Hierauf deutet vordringlich die Ausbildung von den typischen epithelialen Wundzungen ausgehend vom Verletzungsrand hin, die in allen Experimenten beobachtet werden konnte. Es bilden sich sowohl bei Hautstanzen, die mit den Testsubstanzen TRH und GRP oder einer Kombination davon behandelt wurden, als auch in der Kontrolle mit dem reinen Kulturmedium WE ab dem ersten Tag Wundzungen aus, wie sie in vergleichbaren Untersuchungen mit diesem Experimentdesign beobachtet werden konnten. Die mikroskopische Morphologie der Wundzungen entspricht dabei den Schilderungen und Abbildungen vorangegangener Experimente mit der Haut von gesunden Probanden (siehe Schäfer 2010; Meier et al. 2013).

Die Fläche der Wundzungen nimmt über die Kulturdauer von sechs Tagen unabhängig von der angewandten Kulturbedingung stetig zu, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Vitalität der Zellkultur bei Patienten mit eingeschränkter Wundheilung gegeben ist. Diese Schlussfolgerung wird weiterhin gestützt durch die Ergebnisse zur Anzahl der Zellen am Wundrand. Über die Dauer der Kultivierung gefäßgeschädigter Haut kommt es zu einer Zunahme der Zellen unter allen Kulturbedingungen. Dabei lässt der allgemein zu beobachtende Anstieg des Anteils der proliferativen Zellen (Ki67-positive Zellen) darauf schließen, dass es sich dabei um eine tatsächliche Keratinozytenvermehrung durch Zellteilungen handelt anstatt um eine reine Migration vorhandener Keratinozyten aus dem wundnahen Bereich. Diese Aspekte sind ebenfalls in den Arbeiten von Meier et al. mit Organkulturen an gesunder Haut beschrieben worden.

Darüber hinaus scheint hinsichtlich der apoptotischen Vorgänge in der Vollhaut-Organkultur eine der in-vivo-Verhältnissen vergleichbare Situation vorzuliegen. Wie zu erwarten, ist der Anteil apoptotischer Zellen (TUNEL-positive Zellen) an den ersten Tagen der Kultivierung zunächst hoch, um dann abzunehmen. Das sich die

Veränderungen bei gefäßgeschädigter Haut dabei weitestgehend im nicht signifikanten Bereich bewegen, entspricht den Beobachtungen von Meier et al. und Schäfer zu Organkulturen mit gesunder Haut (Meier et al. 2013, Schäfer 2010). Die Anwendbarkeit des Vollhaut-Organkultur-Modells für gefäßgeschädigte Haut ist also auch unter diesem Gesichtspunkt gegeben.

Weiterhin wurden in den Versuchen an gesunder Haut die Wundheilungsmarker Involucrin und Zytokeratin CK 6 untersucht. Während es für CK 6 zu einem Anstieg der Signalintensität am ersten Tag nach der Verletzung kommt, der dann stabil über die Kulturdauer bleibt, ist für Involucrin bei gesunder Haut kein Einfluss von TRH nachweisbar (Meier et al. 2013). Die Arbeit von Schäfer zu GRP bestätigen diese Ergebnisse für CK 6, Involucrin wurde in der Studie nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit mit gefäßgeschädigter Haut decken sich mit diesen Erkenntnissen: Am Tag 0 ist für CK 6 keine Immunreaktivität feststellbar. Dann zeigt sich die ab dem ersten Kulturtag vorhandene Signalintensität weitestgehend stabil über die Kulturdauer von sechs Tagen unabhängig davon, ob es sich um einen Versuch mit Zugabe eines Wirkstoffes oder Wirkstoffkombination handelt oder nicht. Gleicherweise zeigt sich, dass die Effekte auf die Veränderungen des morphologischen Expressionsmusters von Involucrin (diffuse Signalverteilung an Tag 0 gegenüber prägnanterer Verteilung in der Zellwand an Tag 6) auch im Hautorgan-Modell mit gefäßgeschädigter Haut vorhanden sind.

Der Nachweis der Expression von CD31 als Marker für Endothelien im Vollhaut-Organkulturmodell mit gesunder Haut wurde von Schäfer 2010 erbracht. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, CD31 im Modell mit gefäßgeschädigter Haut nachzuweisen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass für alle Kulturbedingungen die Fläche des CD31-positiven Areals am sechsten Kulturtag auf mindestens das 1,9-fache des Ausgangswertes von Tag 0 des Experiments gestiegen ist. Man kann daraus postulieren, dass es bei gefäßgeschädigter Haut in Vollhaut-Organkultur zu einer Zunahme der Endothelzellen kommt. In wieweit es sich dabei um vollwertige, neu gebildete Gefäße handelt (Ausdruck stattgehabter Angiogenese), gilt es weiter zu untersuchen. Bisher gilt die (im Modell nicht vorhandene) Perfusion mit Blut als notwendiger Faktor für eine Angiogenese in Wunden (Demidova-Rice et al. 2012).

Es kann kritisch angemerkt werden, dass die Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit den Vorexperimenten (an gesunder Haut) nur teilweise gegeben ist, da es sich um die Haut von unterschiedlichen Personen mit unterschiedlichen Komorbiditäten handelte. Interindividuelle Unterschiede können so zum Tragen gekommen sein. Um auf eine vollwertige Vergleichbarkeit schließen zu

können wären direkte Vergleichsexperimente von gesunder und gefäßgeschädigter Haut derselben Person notwendig, was in rerum natura nahezu ausgeschlossen ist.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Verwendung gefäßgeschädigter Haut im Vollhaut-Organkulturmodell prinzipiell möglich ist und die Kultivierung von gefäßgeschädigter Haut keine zusätzlichen Maßnahmen oder Adaptionen des bestehenden Vollhaut-Organkulturmodells erfordern. Alle verglichenen Marker können im Modell an gesunder wie gefäßgeschädigter Haut gleichermaßen untersucht werden.

#### **4.2 Einfluss der Einzelanwendung von TRH und GRP bei Patienten mit geschädigter Wundheilung**

Über die Effekte der Anwendung von TRH und GRP auf die humane Wundheilung beim gesunden Menschen berichten Meier et al. für TRH und Schäfer für GRP. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Substanzen erstmalig an der Haut von vaskulär erkrankten Personen untersucht (Meier et al. 2013, Schäfer 2010).

TRH wird nach den Experimenten von Meier et al. eine stimulierende Wirkung auf die Wundheilung bei gesunden Menschen zugeschrieben. Dieser Effekt wird einerseits mit einer Steigerung der Reepithelisation begründet, welche durch eine Zunahme der Wundzungenlänge und des Anteils der proliferativen Zellen (markiert durch Ki67) gekennzeichnet ist. Dies scheint für gefäßgeschädigte Haut nicht zu zutreffen. Auch wenn es zu einer Zunahme der Wundzungen im Verlauf der Kulturdauer kommt, so liegt diese auf dem Niveau der unbehandelten Vergleichshautproben. Weiterhin führt die Behandlung von gefäßgeschädigter Haut mit TRH nicht zu einer (zusätzlichen) Steigerung der Gesamtzellzahl oder des Anteils der proliferativen, Ki67-positiven Zellen im Vergleich zum Standardkulturmedium. Dass der Anteil der apoptotischen, TUNEL-positiven Zellen unbeeinflusst von einer Anwendung von TRH ist, lässt sich als Ergebnis dieser Arbeit gleichermaßen für gefäßgeschädigte Haut schlussfolgern, wie es bereits für gesunde Haut postuliert worden ist (Meier et al. 2013).

Die Expression von CK 6 als Marker für eine Stressreaktion der Keratinozyten ist in gesunder Haut ab dem ersten Tag nach Verletzung nachweisbar und lässt sich durch die Gabe von TRH stimulieren (Meier et al. 2013). Die Ergebnisse dieser Studie geben keine Hinweise darauf, dass eine vergleichbare Beobachtung bei gefäßgeschädigter Haut möglich ist: Zwar ist CK 6 ebenso ab dem ersten Kulturtag nachweisbar, jedoch führt die Anwendung von TRH nicht zu einer Steigerung der Signalintensität von CK 6 im Vergleich zur Kontrolle. Der Vergleich der Signalintensitäten über die Kulturdauer zeigt interessanterweise einen gleichartigen Verlauf für gesunde wie für gefäßgeschädigte Haut. Wie in den Versuchen von Meier et al. zu gesunder Haut kommt es bei gefäßgeschädigter Haut zu einem starken Anstieg der Signalintensität unmittelbar

nach Verletzung an Kulturtag 1 (ausgehend von Nichtnachweisbarkeit zuvor), gefolgt von einem weiteren Anstieg zum zweiten Kulturtag. Zum sechsten Kulturtag hin fällt die Signalstärke wieder ab (siehe Abbildung 26). Dies zeigt, dass die Reaktion der beiden Hauttypen vergleichbar ist, jedoch die Reaktion der vorgeschädigten Haut in deutlich geringerem Ausmaß vorhanden ist. Um diesen Effekt weiter zu untersuchen wären Experimente mit einer längeren Kulturdauer (zum Beispiel 14 Tage) oder häufigerer Zugabe der applizierten Substanzen denkbar.

Die Untersuchungen mit Involucrin als Indikator der terminalen Differenzierung der Keratinozyten bei gefäßgeschädigter Haut, führen zu den gleichen Beobachtungen, die bereits durch Meier et al. für gesunde Haut beschrieben wurden: Es lassen sich keine stimulierenden oder inhibierenden Effekte auf die Expression von Involucrin durch die Anwendung von TRH im Vergleich zur Kontrolle mit dem Standardkulturmedium feststellen (siehe Meier et al. 2013). Der signifikante Anstieg der Signalintensität von Tag 0 zum ersten Kulturtag unter TRH wie er aus Abbildung 36 hervorgeht, ist ebenso für die Kontrolle mit dem Standardkulturmedium WE nachweisbar (siehe Abbildung 35). Für Involucrin lässt sich vielmehr eine qualitative Veränderung des zellulären Expressionsmusters in der Epidermis der Wundzunge feststellen, wie in Kapitel 3.3.3 dargestellt wird. Dabei ist die beschriebene Umverteilung von Involucrin von Zytoplasma in die Zellmembran mit zunehmender Kulturdauer nicht der Behandlung mit TRH zu zuordnen, da sie unter allen Kulturbedingungen gleichermaßen nachzuweisen ist. Ähnliche Veränderungen der Expression von Involucrin durch die Behandlung von humanen Hautproben mit Östrogenen wurden in früheren Experimenten beschrieben (Meier et al. 2013).

In der Literatur finden sich bisher keine Studien zum Einfluss von TRH auf die Expression des Endothelmarkers CD31 in der Wundheilung. Meier et al. haben diesen Parameter in ihren Experimenten zum Einfluss von TRH an gesunder Haut nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser ersten Arbeit zum Einfluss von TRH auf die Expression von CD31 in der Wundheilung an gefäßgeschädigter Haut geben keine Hinweise auf einen zusätzlichen, stimulierenden oder inhibierenden Effekt des Neuropeptids im Vergleich zur Kontrolle mit dem Standardkulturmedium.

GRP führt bei gefäßgeschädigter Haut zu keiner Steigerung der Reepithelialisierung durch eine vermehrte Ausbildung epidermaler Wundheilungszungen, wie die Experimente dieser Arbeit zeigen. An allen drei untersuchten Kulturtagen war die Größe der Wundzungen vergleichbar mit der Kontrolle. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Experimenten von Schäfer, in denen die Anwendung von GRP eine signifikante Zunahme der Wundzungen am dritten Tag der Kulturdauer von gesunder Haut bewirkte (Schäfer 2010). Ob dies gleichermaßen für den

zweiten Kulturtag zutrifft ist nicht feststellbar, da dieser von Schäfer nicht untersucht wurde. Für den sechsten Tag waren an gesunder Haut keine stimulierenden Effekte nachweisbar gewesen. In dieser Studie steigt zwar der Anteil der proliferativen, Ki67-positiven Zellen bis zum sechsten Tag in der Kultur mit GRP in signifikantem Maße an, jedoch ist der gleiche Effekt für das Standardkulturmedium WE nachweisbar, so dass sich hieraus keine zusätzlichen Effekte durch die Anwendung von GRP an gefäßgeschädigter Haut ableiten lassen.

Der Anteil apoptotischer, TUNEL-positiver Zellen am Wundrand zeigt keine signifikanten Veränderungen durch die Behandlung von gefäßgeschädigter Haut mit GRP. Zu dem gleichen Ergebnis hinsichtlich Proliferation und Apoptose im Vollhaut-Organkulturmodell kommt Schäfer mit den Experimenten an gesunder Haut (Schäfer 2010).

Gefäßgeschädigte Haut zeigt in der Kultur durch die Zugabe von GRP keine spezifische Signalerhöhung des CK 6-Proteins als Ausdruck einer Stressreaktion der Keratinozyten wie aus Abbildung 29 hervorgeht. Hier liegt ein Unterschied zu den Vergleichsexperimenten mit gesunder Haut vor: Schäfer ermittelte einen signifikanten, transienten Anstieg am dritten Tag, der am sechsten Tag nicht mehr nachweisbar war. Somit führen TRH (siehe oben) als auch GRP in Versuchen mit gesunder Haut zu einem frühen Anstieg der Signalintensität von CK 6, der in gefäßgeschädigter Haut nicht vorhanden ist. Die weitere Aufklärung der Funktion von CK 6 im Rahmen von Wundheilungsstörungen sollte in den Fokus zukünftiger Studien rücken.

Die terminale Keratinozytendifferenzierung - beobachtbar durch die Signalintensität von Involucrin - wird durch die Anwendung von GRP an gefäßgeschädigter Haut nicht signifikant beeinflusst. Der im Interday-Vergleich signifikante Anstieg vom Tag 0 zu Tag 2 ist ebenfalls in der Standardkulturmedium-Kontrolle WE nachweisbar. Wie bereits zuvor ausgeführt, liegt auch für GRP eine Veränderung des intraepidermalen Verteilungsmusters von Involucrin vor. Ein Vergleich dieses Befundes zu den Verhältnissen an gesunder Haut ist nicht möglich, da Schäfer 2010 diesen Marker nicht untersuchte und die Literatur zu dieser Frage bisher keine Erkenntnisse liefert.

Für gesunde Haut wurde durch Schäfer 2010 der Einfluss der Neuropeptide Bombesin, GRP und Neuromedin B auf die Expression des Endothelmarkers CD31 untersucht. Es wurde eine signifikante Zunahme der CD31-positiven Zellen am dritten Kulturtag festgestellt, die sich am sechsten Kulturtag relativierte (Schäfer 2010). Die Untersuchung an gefäßgeschädigter Haut kann diesen Effekt durch eine Behandlung mit GRP nicht verifizieren. Zwar kommt es wie für die anderen Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen zu einem Anstieg der CD31-positiven Areale zum sechsten

Kulturtag (siehe Abbildung 43), jedoch bewegt sich dieser für GRP nicht im Signifikanzbereich. Lohnenswert sind daher zukünftige Versuche mit unterschiedlichen Wirkstoffdosierungen, um zu erforschen, ob dieser Effekt eventuell dosisabhängig sind und an gefäßgeschädigter Haut erst bei höheren Dosierungen auftritt.

#### **4.3 Einfluss der kombinatorischen Anwendung von TRH und GRP bei Patienten mit geschädigter Wundheilung**

Auf Basis der vorbeschriebenen separaten, positiven Effekte von TRH und GRP bei gesunder Haut (Schäfer 2010; Meier et al. 2013), war es Ziel dieser Arbeit aufzuklären, welche Effekte eine kombinierte Anwendung beider Wirkstoffe auf die Wundheilung beim Menschen mit gefäßgeschädigter Haut hat. Dazu wurden drei verschiedene Kombinationen von TRH und GRP in unterschiedlichen Wirkstoff-Konzentrationen getestet (GT 1 bis GT 3; siehe Tabelle 6).

Wie schon für die Einzelanwendung von TRH und GRP beschrieben führen alle drei Kombinationen mit Ausnahme der Wirkstoffkombination GT 2 am sechsten Kulturtag nicht zu einer Zunahme der Wundzungenfläche. Die Behandlung mit der Kombination GT 2, in der die Konzentration von GRP gegenüber TRH verringert ist, brachte eine größere Wundzungenfläche als die Behandlung mit dem Standardkulturmedium hervor. Die beiden anderen Kombinationen zeigten keinen Unterschied verglichen mit den Kulturbedingungen WE, TRH und GRP. Die größere Wundzungenfläche ging einher mit einer Erhöhung der absoluten Zellzahlen am Wundrand für die Kombination GT 2 (siehe Abbildung 50). Sowohl am ersten als auch am sechsten Kulturtag ist die Zellzahl signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle, während für die beiden anderen Wirkstoffkombinationen GT 1 und GT 3 keine signifikanten Unterschiede zu den Kulturbedingungen WE, TRH und GRP bestehen. Die Erhöhung der Zellzahl ist dabei nicht auf eine zusätzliche, vermehrte Proliferation der Keratinozyten unter GT 2 zurückzuführen: Der relative Anteil Ki67-positiver Zellen unterscheidet sich nicht signifikant vom Standardkulturmedium WE oder der Einzelanwendung von TRH und GRP. Die Alternativhypothese, laut der die größere Wundzungenfläche auf einem vermehrten Zelluntergang in den Vergleichsbedingungen WE, TRH und GRP basiert, wird durch die Beobachtungsergebnisse der apoptotischen, TUNEL-positiven Zellen nicht unterstützt. Der Anteil apoptotischer Zellen zeigt sich lediglich in der Kulturbedingung GT 2 verglichen zu den beiden anderen Wirkstoffkombinationen GT 1 und GT 3 (an den Tagen 1 und/oder 2) erhöht – nicht jedoch im Vergleich zu den Einzelsubstanzen. Hinsichtlich der Reepithelialisierung scheint somit nur die Kombination von TRH mit einer geringeren Konzentration von GRP synergistisch-stimulatorisch zu wirken.

Die kombinatorische Anwendung von TRH und GRP hat an den ersten beiden Kulturtagen keinen Einfluss auf die Signalintensität von CK 6. Die Wirkstoffkombination GT 3, mit einer niedrigeren Konzentration von TRH ( $10^{-7}$  M), führt am sechsten Kulturtag zu einem signifikant geringer ausgeprägtem Immunfluoreszenzsignal als in allen anderen Kulturbedingungen. Eine potentielle Erklärung wäre, dass eine Schwellenkonzentration von  $10^{-6}$  M TRH notwendig ist (wie in den Kulturbedingungen TRH, GT 1 und GT 2), ohne die es nicht zu einer entsprechenden Ausprägung von CK 6 kommen kann. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass WE und GRP die gleichen Signalintensitäten erreichen ohne dass eine Zugabe von TRH erfolgte (siehe Abbildung 25). Diese alternativen Sichtweisen sollten in weiteren Experimenten klarifiziert werden.

Sowohl Schäfer als auch Meier et al. beschreiben für die Einzeltestung von GRP bzw. TRH einen frühen, transienten Anstieg der Signalintensität von CK 6 bei gesunder Haut, der sich für gefäßgeschädigte Haut nicht reproduzieren lässt (vergleiche Kapitel 4.2; Schäfer 2010 und Meier et al. 2013). In der kombinatorischen Anwendung beider Substanzen in äquimolarer Dosis von  $10^{-6}$  M (Kulturbedingung GT 1) scheint dieser Effekt nachweisbar zu sein (siehe Abbildung 30). Da jedoch ein tendenzieller, transienter Anstieg über den Verlauf der Kulturdauer unter allen Kulturbedingungen gleichermaßen zu beobachten ist, sind weitere Versuche notwendig, um einen tatsächlichen, positiven Effekt belegen zu können.

Die Immunfluoreszenzsignale von Involucrin – als Kennzeichen für die terminale Keratinozytendifferenzierung – geben keine signifikanten Hinweise auf stimulatorische oder inhibierende Effekte der kombinatorischen Anwendung von TRH und GRP. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Einzeltestung von TRH und GRP in dieser Arbeit an gefäßgeschädigter Haut und den Resultaten von Schäfer und Meier et al. an gesunder Haut, bei denen TRH und GRP keine immunhistochemisch quantifizierbaren Folgen auf die Ausprägung der Signalintensität von Involucrin hervorruft (Schäfer 2010; Meier et al. 2013). Aufschlussreich für die Zukunft könnten weitere Untersuchungen hinsichtlich den beschriebenen morphologischen Veränderungen sein.

Die kombinatorische Anwendung von TRH und GRP führen nicht zu einer signifikant gesteigerten CD31-positiven Fläche verglichen zum Standardkulturmedium und der Einzelanwendung von TRH oder GRP an den einzelnen Tagen des Experiments, so dass nicht von einem synergistischen Effekt beider Substanzen ausgegangen werden kann.

In der Längsschnitt-Untersuchung ermöglicht das Vollhaut-Organkulturmodell per se eine signifikante Zunahme der CD31-positiven Fläche über den gesamten Kulturverlauf für alle kombinatorische Anwendungen von TRH und GRP (GT 1 bis GT 3) an gefäßgeschädigter Haut. In der äquimolaren Konzentration von TRH und GRP von

$10^{-6}$  M (GT 1) ist der signifikante Anstieg bereits am zweiten Kulturtag zu beobachten. Die Kombinationen mit jeweils entweder verminderter GRP- oder TRH-Konzentration von  $10^{-7}$  M zeigt diesen Anstieg erst zum sechsten Kulturtag. Es lässt sich schlussfolgern, dass die äquimolare Dosis beider Wirkstoffe zu einem früheren Anstieg der CD31-positiven Fläche führt, zumal diese dann zum sechsten Tag hin stabil bleibt. Weitere Forschungsansätze könnten quantifizieren, ob sich die CD31-positive Fläche und damit das Areal der Endothelzellen mit längerer Kulturdauer weiter steigern lässt oder ob bereits ein Maximum erreicht wird.

#### **4.4 Ausblick und zukünftige Forschungsansätze**

Für die weitere Forschung auf dem Gebiet der humanen Wundheilungsforschung mit dem verwendeten Vollhaut-Organkulturmodell ergeben sich als Resultat dieser Arbeit vielfältige Ansätze.

Mit dem Nachweis der Anwendbarkeit des Modells für gefäßgeschädigte Haut eröffnet sich die Möglichkeit eine große Anzahl von Wirkstoffen einfach und praxisnah auf ihr wundheilungsförderndes Potential (für vaskulär-assoziierte Wundheilungsstörungen) hin zu untersuchen. Aus dem Bereich der Amphibien wurden kürzlich neue Peptide beschrieben, die die Wundheilung fördern sollen. Ein Peptid – AH90 – aus der Haut des Frosches *Odorrana grahami*, beschleunigte im Mausmodell signifikant die Wundheilung (Liu et al. 2014b). Die gleiche Forschungsgruppe hat aus derselben Spezies ein weiteres Peptid – CW49 – identifizieren können, dessen topische Anwendung die Angiogenese und Wundheilung bei gesunden wie diabetischen Mäusen stimulieren soll (Liu et al. 2014a). Aus der Haut einer Salamander-Art wurde das Peptid Tylotoxin isoliert, dem die gleichen Eigenschaften zugeschrieben werden (Mu et al. 2014). Auch aus dem Gebiet der Phytomedizin wird wiederholt über wundaktive Substanzen berichtet, deren Überprüfung am Menschen lohnenswert erscheint. So wird zum Beispiel für Verbrennungswunden einer topischen Behandlung mit einem Extrakt aus Malve, Damaszener-Rosenblüten und Schwarzem Nachtschatten im Rattenmodell positive Eigenschaften zugeschrieben (Fahimi et al. 2015). Die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf den Menschen kann mit dem Vollhaut-Organkulturmodell an der Haut von gefäßgeschädigten Patienten überprüft werden.

Darüber hinaus wird den Host Defense Peptides (HDP, auch AMP = Antimicrobial Peptides), die im Fokus der antimikrobiellen Forschung stehen, zusätzliche wundheilungsstimulierende Eigenschaften durch regulierende Beeinflussung der Chemotaxis und Organisation der Extrazellulärmatrix zugeschrieben (Mansour et al. 2014; Haslam et al. 2014). Für das synthetische HDP IDR-1018 zeigen sich im Maus-

und Schweinmodell eine schnellere Wundheilung, die an humaner Vollhaut überprüft werden kann (Steinstraesser et al. 2012).

Auch wenn die kombinatorische Anwendung von TRH und GRP keine additiven stimulierenden Effekte in der Wundheilung zeigt, so werden die Erkenntnisse über die Einzelanwendungen aus den Voruntersuchungen mit dieser Arbeit zum Teil bestätigt. Der Einfluss der hypothalamisch-hypophysären-thyroidealen Regelkreishormone auf der Wundheilung bleibt somit ein insgesamt forschungssträchtiges Thema. Eine aktuelle, publizierte Studie bestärkt die These der wundheilungsstimulierenden Wirkung von TRH. Durch die topische Wundbehandlung mit TRH und seinem Analogon Taltirelin ließ sich eine Verkürzung der Wundheilungsdauer im Rattenmodell erreichen. Beide Substanzen stimulierten außerdem die Fibroblastenmigration im Scratch-Assay (Nie et al. 2014). Speziell die Testung von Taltirelin (dem eine längere Halbwertszeit und Effektdauer als TRH attestiert wird) an humaner Haut sollte in weiteren Forschungsvorhaben berücksichtigt werden.

Im Bezug zu den in dieser Arbeit beschriebenen histomorphologischen Veränderungen des Signalintensitätsmusters von Involucrin ist erwähnenswert, dass in Vollhaut-Organokulturexperimenten eine Anwendung von TSH eine statistisch signifikante Steigerung der Signalintensität induzieren kann (Bodó et al. 2010). Es ist denkbar, dass die Effekte von TRH zusätzlich indirekt über das ihm nachgeschaltete TSH reguliert werden. Weitere Untersuchungen, die die erhobenen Erkenntnisse um Resultate hinsichtlich der Wirkung von TSH auf Wundheilungsparameter wie die Wundzungenfläche oder die Expression von CK 6 erweitern, sind empfehlenswert.

Weiterhin berichtet eine israelische Forschungsgruppe über eine signifikant schnellere Wundheilung bei Meerschweinchen durch die topische Anwendung des Schilddrüsenhormons  $T_3$ , die ebenfalls im humanen Modell untersucht werden kann (Kassem et al. 2012; Safer 2013). Dies erscheint vielversprechend, da Knock-Out-Mäuse ohne Thyroxin-Rezeptor eine verzögerte Wundheilung aufweisen (Contreras-Jurado et al. 2014).

Aus der Sicht der Gefäßmedizin sind weitere Untersuchungen zur Angiogenese und Neovaskularisation im Wundbereich mit Sicherheit ein vielversprechender Ansatz. Die Weiterentwicklung des Organmodells könnte zum Beispiel auf die Differenzierung arterieller vs. venöser endothelialer Gefäße abzielen, wofür spezifische Marker (Ephrin B2 vs. Ephrin B4) zur Verfügung stehen (Simons et al. 2015). Wenn die aktuellen Entwicklungen von Perfusionsmodellen aus dem Bereich des Tissue Engineering (*microfluidic models*) von der Eindimensionalität zu 3D-Modellen weiter positiv verlaufen, so sind für die Zukunft Erweiterungen des Vollhaut-Organokulturmodells um Perfusionssimulationen denkbar (Wong et al. 2012; Bogorad et al. 2015).

In Richtung der Angiogeneseforschung ist für zukünftige Betrachtungen das Schilddrüsenhormon Thyroxin ( $T_4$ ) ein interessanter Wirkstoff. Es scheint ein angioproliferatives Potential mit der Induktion zur Ausbildung tubulärer Endothelstrukturen in humanen Nabelschnurendothelzellen über einen Integrin-vermittelten Signalweg zu entfalten, wie rezente Studien zeigen konnten (Liu et al. 2014c). Hier bieten sich weitergehende Experimente an.

Der Wissenszuwachs auf dem Forschungsgebiet der Angiogenese und Neovaskularisation ist stetig und von großem Ausmaße, da ihre Prozesse für viele Krankheiten eine zentrale Rolle (z.B. kardiovaskuläre Forschung, Tumorforschung) einnehmen und entsprechend von vielen medizinischen Gebieten intensiv beforscht werden. Für die Zukunft ist zu erwarten, dass sich somit weiterhin stetig neue Impulse für die Wundheilungsforschung ergeben werden.

## 5 Zusammenfassung

Chronische Wundheilungsstörungen betreffen einen großen Anteil der Bevölkerung und sind mit hohen sozioökonomischen Kosten verbunden. Die Patienten leiden neben direkten krankheitsassoziierten Symptomen wie Schmerzen unter nicht zu unterschätzenden psychologischen Belastungen durch langfristige, chronische - teils rezidivierende Verläufe. Durch den demographischen Wandel bedingt und trotz des medizinischen Fortschritts kann für die nächsten Jahre eine weitere Zunahme des betroffenen Patientenklintels erwartet werden.

Durch Experimente an Amphibien und am Menschen sind die Hormone TRH und GRP in den Fokus der Wundheilungsforschung gerückt. Beiden Substanzen wird in einem Vollhaut-Organokulturmodell an gesunder humaner Haut eine stimulierende Wirkung auf die Wundheilung zugesprochen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich dieses Vollhaut-Organokulturmodell prinzipiell an der Haut von gefäßgeschädigten Patienten mit amputationspflichtigen Wunden anwenden lässt. Die Hautproben blieben über sechs Tage vital und bildeten charakteristische Wundzungen aus. Mit dem Nachweis der Anwendbarkeit können zukünftig potentiell wundheilungsfördernde Wirkstoffe einfach und ressourcensparend an klinisch relevanten, humanen Hautproben untersucht werden.

Die vorbeschriebenen Erkenntnisse hinsichtlich der wundheilungsfördernden Wirkungen von TRH und GRP an gesunder Haut können in dieser erstmalig an gefäßgeschädigter Haut durchgeführten Arbeit nur in Teilen bestätigt werden. Die Größe der Wundzungenfläche lässt sich durch TRH und GRP an gefäßgeschädigter Haut im Gegensatz zu gesunder Haut nicht positiv beeinflussen. Positive Effekte durch die Anwendung von TRH bzw. GRP auf die Expression von CK 6 lassen sich im überwiegenden Maße an gefäßgeschädigter Haut nicht nachweisen. Übereinstimmend mit den Vorexperimenten wurden keine Unterschiede hinsichtlich Proliferation und Apoptose sowie bei der Expression von Involucrin im Rahmen dieser Arbeit an gefäßgeschädigter Haut festgestellt.

Erstmalig wurde zudem die kombinatorische Anwendung von TRH und GRP in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. In Zusammenschau der Ergebnisse ergaben sich keine Hinweise für additive Effekte beider Substanzen auf die Wundheilung.

Wegweisend für zukünftige Arbeiten ist die nachweisliche Zunahme der CD31-positiven Gefäßareale im Vollhaut-Organokulturmodell mit gefäßgeschädigter Haut trotz vermeintlicher vaskulärer Pathologie. Hieraus ergeben sich interessante Ansatzpunkte für die weitere Endothel- und Angiogeneseforschung für die im Zentrum der Gefäßmedizin stehende Patientengruppe mit chronischen Wunden.

## Summary

Chronic wound healing disorders affect a large proportion of the population and are linked to high socio-economic costs. Patients not only suffer from direct illness-related symptoms such as pain but also from psychologic burden due to longterm chronic process. Based on demographic change and despite progress in medical therapy and treatment a further increase in the number of patients with chronic wounds can be expected.

Studies on amphibies and humans put a spot light on the role of thyroid releasing hormone and gastrin releasing peptide in wound healing. Both substances are attributed to improve wound healing in a human full thickness skin organ culture model of healthy individuals. This study proves the feasibility of the organ culture model for the skin of patients with vascular impaired non healing wounds. Punch skin biopsies remained vital for six days and developed distinctive wound tongues at the edge of the biopsies. Therefore this organ model can also be used to study a variety of potentially wound healing promoting agents for people with wound healing disorders.

Prior findings on the wound healing promoting effects of thyroid releasing hormone and gastrin releasing peptide on healthy human skin can only partially be varified for the skin of wound healing impaired patients. While the area of the wound tongues of punch biopsies and the expression of CK 6 cannot be increased by the application either thyroid releasing hormone or gastrin releasing peptide, the results concerning the markers of proliferation and apoptosis as well as the expression of involucrine for the skin of wound healing impaired patients are consistent with prior findings in healthy individuals.

For the first time the combined application of both hormones was studied in a human skin organ culture model. No additive effects were observed leading to the conclusion that the combination of both hormones does not seem to be beneficial for wound healing purposes.

Future research could focus on the observed increase of the CD31-positive areas in the skin of wound healing impaired patients. The proofed feasibility of the skin organ model can be used gain a deeper understanding of the role of topical agents regarding vascular endothelial regeneration and angiogenesis.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

|                    |                                                   |
|--------------------|---------------------------------------------------|
| AIDS               | Acquired Immune Deficiency Syndrome               |
| AMP                | Antimicrobial Peptide                             |
| AT-MSC             | Adipose Tissue - Mesenchymal Stem Cells           |
| bFGF               | basic Fibroblast Growth Factor                    |
| BM-MSC             | Bone Marrow - Mesenchymal Stem Cells              |
| CD31               | Cluster of Differentiation 31, siehe auch PECAM-1 |
| DAPI               | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                       |
| dUTP               | 2'-Deoxyuridin, 5'-Triphosphat                    |
| EGF                | Epidermal Growth Factor                           |
| FGF                | Fibroblast Growth Factor                          |
| FITC               | Fluorescein Isothiocyanate                        |
| GRP                | Gastrin Releasing Peptide                         |
| HCL                | Salzsäure                                         |
| HDP                | Host Defense Peptide                              |
| IL-6               | Interleukin 6                                     |
| IP-10              | Interferon-Inducible Protein-10                   |
| K6 / CK 6          | Keratin 6 / Zytokeratin 6                         |
| kDa                | Kilodalton                                        |
| KGF 1/2            | Keratinocyte Growth Factor 1/2                    |
| MMP                | Matrixmetalloprotease                             |
| n/a                | nicht verfügbar                                   |
| NaCl               | Natriumchlorid                                    |
| NaHCO <sub>3</sub> | Natriumhydrogencarbonat                           |
| NaOH               | Natriumhydroxid                                   |
| NMB                | Neuromedin B                                      |
| NO                 | Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)                  |
| ORS                | Outer Root Sheat                                  |
| pAVK               | periphere arterielle Verschlusskrankheit          |
| PBS                | Phophate Buffered Saline                          |
| PDGF               | Platelet Derived Growth Factor                    |
| PECAM-1            | Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule       |
| PF4                | Platelet Factor 4                                 |
| PPII               | Pyroglutamyl Peptidase II                         |
| PRF/PRP            | Platelet-Rich-Fibrin/Plasma                       |
| RCT                | Randomized Controlled Trial                       |

|                |                                            |
|----------------|--------------------------------------------|
| T <sub>3</sub> | Triiodothyronin                            |
| T <sub>4</sub> | Thyroxin                                   |
| TBS            | Tris Buffered Saline                       |
| TdT            | Terminale Deoxynucleotidyl Transferase     |
| TGF $\alpha$   | Transforming Growth Factor $\alpha$        |
| TGF $\beta$    | Transforming Growth Factor $\beta$         |
| TNF $\alpha$   | Tumor Necrosis Factor $\alpha$             |
| tPA            | Tissue Plasminogen Activator               |
| TRH            | Thyrotropin Releasing Hormone              |
| TSH            | Thyroid Stimulating Hormone                |
| TUNEL          | TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling |
| uPA            | Urokinase Plasminogen Activator            |
| VEGF           | Vascular Endothelial Growth Factor         |

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Aufbau der Haut                                          | 2  |
| Abbildung 2: Aufbau der Epidermis                                     | 4  |
| Abbildung 3: Inflammationsphase der Wundheilung                       | 7  |
| Abbildung 4: Proliferations-/Migrationsphase der Wundheilung.         | 9  |
| Abbildung 5: Ätiologie der Ulcera crura                               | 15 |
| Abbildung 6: Herstellung eines Hautäquivalenzmodell                   | 19 |
| Abbildung 7: Keratinopathien und assoziierte Keratine                 | 24 |
| Abbildung 8: Einbau von Involucrin im Rahmen des Verhornungsprozesses | 25 |
| Abbildung 9: Synthese von TRH                                         | 27 |
| Abbildung 10: Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis                  | 28 |
| Abbildung 11: Vollhautpräparat zur Wundstanzengewinnung               | 36 |
| Abbildung 12: 2-mm-Wundstanzen in Williams E Kulturmedium             | 36 |
| Abbildung 13: Gefrorener Hautstanzenblock                             | 37 |
| Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung für CK 6                        | 40 |
| Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung für CD31                        | 41 |
| Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung für Ki67 und TUNEL              | 41 |
| Abbildung 17: Wundzungengröße innerhalb der Kulturtage                | 44 |
| Abbildung 18: Wundzungengröße im Kulturverlauf                        | 45 |
| Abbildung 19: Wundzungengröße WE                                      | 45 |
| Abbildung 20: Wundzungengröße TRH                                     | 45 |
| Abbildung 21: Wundzungengröße GRP                                     | 46 |
| Abbildung 22: Wundzungengröße GT 1                                    | 46 |
| Abbildung 23: Wundzungengröße GT 2                                    | 46 |
| Abbildung 24: Wundzungengröße GT 3                                    | 47 |
| Abbildung 25: CK 6-Intensitäten innerhalb der Kulturtage              | 49 |
| Abbildung 26: CK 6-Intensitäten im Kulturverlauf                      | 49 |
| Abbildung 27: CK 6-Intensität WE                                      | 50 |
| Abbildung 28: CK 6-Intensität TRH                                     | 50 |
| Abbildung 29: CK 6-Intensität GRP                                     | 50 |
| Abbildung 30: CK 6-Intensität GT 1                                    | 51 |
| Abbildung 31: CK 6-Intensität GT 2                                    | 51 |
| Abbildung 32: CK 6-Intensität GT 3                                    | 51 |
| Abbildung 33: Involucrin-Intensitäten innerhalb der Kulturtage        | 53 |
| Abbildung 34: Involucrin-Intensitäten im Kulturverlauf                | 54 |
| Abbildung 35: Involucrin-Intensität WE                                | 55 |

|                                                                                                                  |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Abbildung 36: Involucrin-Intensität TRH                                                                          | 55     |
| Abbildung 37: Involucrin-Intensität GRP                                                                          | 55     |
| Abbildung 38: Involucrin-Intensität GT 1                                                                         | 56     |
| Abbildung 39: Involucrin-Intensität GT 2                                                                         | 56     |
| Abbildung 40: Involucrin-Intensität GT 3                                                                         | 56     |
| Abbildung 41: Veränderung des zellulären Verteilungsmusters von Involucrin                                       | 58     |
| Abbildung 42: CD31-positive Areale innerhalb der Kulturtage                                                      | 60     |
| Abbildung 43: CD31-positive Areale im Kulturverlauf                                                              | 61     |
| Abbildung 44: CD31-positive Areale WE                                                                            | 61     |
| Abbildung 45: CD31-positive Areale TRH                                                                           | 62     |
| Abbildung 46: CD31-positive Areale GRP                                                                           | 62     |
| Abbildung 47: CD31-positive Areale GT 1                                                                          | 62     |
| Abbildung 48: CD31-positive Areale GT 2                                                                          | 63     |
| Abbildung 49: CD31-positive Areale GT 3                                                                          | 63     |
| Abbildung 50: Absolute Zellzahlen am Wundrand                                                                    | 65     |
| Abbildung 51: Gesamtzellzahl am Wundrand im Kulturverlauf                                                        | 66     |
| Abbildung 52: Relativer Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen                                                  | 67     |
| Abbildung 53: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge für WE                                    | 68     |
| Abbildung 54: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge für TRH                                   | 69     |
| Abbildung 55: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge für GRP                                   | 69     |
| Abbildung 56: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge für GT 1                                  | 69     |
| Abbildung 57: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge für GT 2                                  | 70     |
| Abbildung 58: Anteil Ki67- und TUNEL-positiver Zellen in der Wundzunge für GT 3                                  | 70     |
| <br>Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien                                         | <br>33 |
| Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten primären und sekundären Antikörper                                     | 34     |
| Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien                                                  | 34     |
| Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Laborgeräte                                                            | 35     |
| Tabelle 5: Übersicht über die verwendete Software und EDV                                                        | 35     |
| Tabelle 6: Übersicht über die Kulturbedingungen                                                                  | 36     |
| Tabelle 7: Mittelwerte und Standardfehler der Wundzungen Größen                                                  | 43     |
| Tabelle 8: Mittelwerte und Standardfehler der Signalintensität von CK 6                                          | 48     |
| Tabelle 9: Mittelwerte und Standardfehler der Signalintensität von Involucrin                                    | 52     |
| Tabelle 10: Mittelwerte und Standardfehler des CD31-positiven Areals                                             | 59     |
| Tabelle 11: Mittelwerte der Anzahl der TUNEL-, Ki67- und DAPI-positiven Zellen und Gesamtzellen in der Wundzunge | 64     |

## 8 Literaturverzeichnis

Alavi A, Sibbald RG, Mayer D, Goodman L, Botros M, Armstrong DG, Woo K, Boeni T, Ayello EA, Kirsner RS (2014). Diabetic foot ulcers: Part I. Pathophysiology and prevention. *J Am Acad Dermatol* 70 (1):1.e1–1.e18.

Albelda SM (1991). Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31). *J Cell Biol* 114 (5):1059–1068.

Amato B, Compagna R, Amato M, Butrico L, Fugetto F, Chibireva MD, Barbetta A, Cannistrà M, Franciscis Sd, Serra R (2015). The role of adult tissue-derived stem cells in chronic leg ulcers: a systematic review focused on tissue regeneration medicine. *Int Wound J* (in press).

Anders J, Heinemann A, Leffmann C, Leutenegger M, Pröfener F, Renteln-Kruse W von (2010). Decubitus ulcers: pathophysiology and primary prevention. *Dtsch Arztebl Int* 107 (21):371–381.

Baroni A, Perfetto B, Canozo N, Braca A, Farina E, Melito A, Maria S de, Cartenì M (2008). Bombesin: a possible role in wound repair. *Peptides* 29 (7):1157–1166.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16 (5):585–601.

Bedürftig H, Eder S (2015). Lokalthherapie bei der Behandlung chronischer Wunden. *Gefäßchirurgie* 20 (5):395–406.

Benedek M, Kaernbach C (2011). Physiological correlates and emotional specificity of human piloerection. *Biol Psychol* 86 (3):320–329.

Bennett GW, Balls M, Clothier RH, Marsden CA, Robinson G, Wemyss-Holden GD (1981). Location and release of TRH and 5-HT from amphibian skin. *Cell Biol Int Rep* 5 (2):151–158.

Bodó E, Kany B, Gáspár E, Knüver J, Kromminga A, Ramot Y, Bíró T, Tiede S, van Beek N, Poeggeler B, Meyer KC, Wenzel BE, Paus R (2010). Thyroid-stimulating hormone, a novel, locally produced modulator of human epidermal functions, is regulated by thyrotropin-releasing hormone and thyroid hormones. *Endocrinology* 151 (4):1633–1642.

Bogorad MI, DeStefano J, Karlsson J, Wong AD, Gerecht S, Searson PC (2015). Review: in vitro microvessel models. *Lab Chip* 15 (22):4242–4255.

Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Schally AV (1969). The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun* 37 (4):705–710.

Bootun R (2013). Effects of immunosuppressive therapy on wound healing. *Int Wound J* 10 (1):98–104.

Bowden PE, Haley JL, Kansky A, Rothnagel JA, Jones DO, Turner RJ (1995). Mutation of a type II keratin gene (K6a) in pachyonychia congenita. *Nat Genet* 10 (3):363–365.

Bragulla HH, Homberger DG (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat* 214 (4):516–559.

Broeckx SY, Borena BM, van Hecke L, Chiers K, Maes S, Guest DJ, Meyer E, Duchateau L, Martens A, Spaas JH (2015). Comparison of autologous versus allogeneic epithelial-like stem cell treatment in an in vivo equine skin wound model. *Cytotherapy* 17 (10):1434–1446.

Brölmann FE, Eskes AM, Sumpio BE, Mayer DO, Moore Z, Agren MS, Hermans M, Cutting K, Legemate DA, Vermeulen H, Ubbink DT (2013). Fundamentals of randomized clinical trials in wound care: reporting standards. *Wound Repair Regen* 21 (5):641–647.

Broughton G, Janis JE, Attinger CE (2006). The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117 (7 Suppl):12S–34S.

- Burckhardt M, Gregor S, Kleijer J (2012). S3-Leitlinie: Lokalthherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz. [Online im Internet] URL: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/091-001l\\_S3\\_Lokalthherapie\\_chronischer\\_Wunden\\_2012-06.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/091-001l_S3_Lokalthherapie_chronischer_Wunden_2012-06.pdf) [Stand 07.10.2015].
- Burgus R, Dunn RF, Desiderio D, Guillemin R (1969). Structure moleculaire du facteur hypothalamique hypophysiotrope TRF d' origine ovine: evidence par spectrometrie de masse de la sequence PGA-His-Pro-NH<sub>2</sub>. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 269 (19):1870–1873.
- Busse D, Kudella P, Grüning N, Gisselmann G, Ständer S, Luger T, Jacobsen F, Steinsträßer L, Paus R, Gkogkolou P, Böhm M, Hatt H, Benecke H (2014). A synthetic sandalwood odorant induces wound-healing processes in human keratinocytes via the olfactory receptor OR2AT4. J Invest Dermatol 134 (11):2823–2832.
- Candi E, Schmidt R, Melino G (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol 6 (4):328–340.
- Carlson MW, Alt-Holland A, Egles C, Garlick JA (2008). Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin. Curr Protoc Cell Biol 41 (19.9):19.9.1-19.9.17.
- Chen H (2005). Boyden Chamber Assay. Methods in Molecular Biology - Cell Migration 294 (1):15–22.
- Chiamolera MI, Wondisford FE (2009). Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. Endocrinology 150 (3):1091–1096.
- Clay H, Coughlin SR (2015). Mechanical vessel injury in zebrafish embryos. J Vis Exp (96):e52460.
- Comerota A, Lurie F (2015). Pathogenesis of venous ulcer. Semin Vasc Surg 28 (1):6–14.
- Contreras-Jurado C, García-Serrano L, Martínez-Fernández M, Ruiz-Llorente L, Paramio JM, Aranda A (2014). Impaired hair growth and wound healing in mice lacking thyroid hormone receptors. PLoS ONE 9 (9):e108137.
- Debus ES (2013). Gefäßmedizin. Gefäßchirurgie 18 (5):334–346.
- DeLisser HM, Christofilidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM (1997). Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. Am J Pathol 151 (3):671–677.
- Demidova-Rice TN, Durham JT, Herman IM (2012). Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing. Adv Wound Care (New Rochelle) 1 (1):17–22.
- Diehm C, Schuster A, Allenberg JR, Darius H, Haberl R, Lange S, Pittrow D, Stritzky B von, Tepohl G, Trampisch H (2004). High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. Atherosclerosis 172 (1):95–105.
- Dissemond J (2014). Chronische Wunden und Bakterien. Klinische Bedeutung, Nachweis und Therapie. Hautarzt 65 (1):10–14.
- Dumville JC, Hinchliffe RJ, Cullum N, Game F, Stubbs N, Sweeting M, Peinemann F (2013). Negative pressure wound therapy for treating foot wounds in people with diabetes mellitus. Cochrane Database Syst Rev 10 (Article):CD010318.
- Dumville JC, Land L, Evans D, Peinemann F (2015a). Negative pressure wound therapy for treating leg ulcers. Cochrane Database Syst Rev 7 (Article):CD011354.
- Dumville JC, Webster J, Evans D, Land L (2015b). Negative pressure wound therapy for treating pressure ulcers. Cochrane Database Syst Rev 5 (Article):CD011334.
- Dunn L, Prosser HC, Tan JT, Vanags LZ, Ng MK, Bursill CA (2013). Murine model of wound healing. J Vis Exp (75):e50265.

- Duntas LH, Emerson CH (2009). On the fortieth anniversary of thyrotropin-releasing hormone: the hormone that launched a new era. *Thyroid* 19 (12):1299–1301.
- Eberhardt RT, Raffetto JD (2014). Chronic venous insufficiency. *Circulation* 130 (4):333–346.
- Eckstein H, Knipfer E, Trenner M, Kühnl A, Söllner H (2014). Epidemiologie und Behandlung der PAVK und der akuten Extremitätenischämie in deutschen Krankenhäusern von 2005 bis 2012. *Gefäßchirurgie* 19 (2):117–126.
- Eckstein H, Kühnl A (2015). Kritische Extremitätenischämie. *Gefäßchirurgie* 20 (3):182.
- Eraso LH, Fukaya E, Mohler ER, Xie D, Sha D, Berger JS (2014). Peripheral arterial disease, prevalence and cumulative risk factor profile analysis. *Eur J Prev Cardiol* 21 (6):704–711.
- Eskes AM, Brölmann FE, Sumpio BE, Mayer D, Moore Z, Agren MS, Hermans M, Cutting K, Legemate DA, Ubbink DT, Vermeulen H (2012). Fundamentals of randomized clinical trials in wound care: design and conduct. *Wound Repair Regen* 20 (4):449–455.
- Espinola-Klein C (2011). Periphere arterielle Verschlusskrankheit. *Internist (Berl)* 52 (5):549–560.
- Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Lackner K, Savvidis S, Messow CM, Munzel T, Blankenberg S (2008). Different calculations of ankle-brachial index and their impact on cardiovascular risk prediction. *Circulation* 118 (9):961–967.
- Fahimi S, Abdollahi M, Mortazavi SA, Hajimehdipoor H, Abdolghaffari AH, Rezvanfar MA (2015). Wound Healing Activity of a Traditionally Used Poly Herbal Product in a Burn Wound Model in Rats. *Iran Red Crescent Med J* 17 (9):e19960.
- Falanga V (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366 (9498):1736–1743.
- Fang RC, Mustoe TA (2008). Animal models of wound healing: utility in transgenic mice. *J Biomater Sci Polym Ed* 19 (8):989–1005.
- Fekete C, Lechan RM (2014). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev* 35 (2):159–194.
- Ferrag Y, Black DR, Theunis J, Mordon S (2012). Superficial wounding model for epidermal barrier repair studies: comparison of Erbium:YAG laser and the suction blister method. *Lasers Surg Med* 44 (7):525–532.
- Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, Sampson UK, Williams LJ, Mensah GA, Criqui MH (2013). Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010. *Lancet* 382 (9901):1329–1340.
- Frykberg RG, Banks J (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4 (9):560–582.
- Gavrieli Y (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 (3):493–501.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133 (4):1710–1715.
- Godwin J (2014). The promise of perfect adult tissue repair and regeneration in mammals: Learning from regenerative amphibians and fish. *Bioessays* 36 (9):861–871.
- Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, Ito T, Jensen RT (2008). Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15 (1):58–64.

- Graham ID, Harrison MB, Nelson EA, Lorimer K, Fisher A (2003). Prevalence of lower-limb ulceration: a systematic review of prevalence studies. *Adv Skin Wound Care* 16 (6):305–316.
- Graves N, Theng H (2014). The prevalence and incidence of chronic wounds: A literature review. *Wound Practice & Research* 22 (1):4-12, 14-19.
- Grice EA, Segre JA (2012). Interaction of Microbiome and the Innate Immune Response in Chronic Wounds. *Adv Exp Med Biol* 946 (Current Topics in Innate Immunity II):55–68.
- Grissmer S, Hoth M, Wischmeyer E (2012). Kapitel 5 "Blutkreislauf" und Kapitel 6 "Blut" in: Duale Reihe Physiologie. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R (Hg.). 2., aktualisierte Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Guo M, Qu X, Qin X (2015). Bombesin-like peptides and their receptors: recent findings in pharmacology and physiology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 22 (1):3–8.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453 (7193):314–321.
- Haslam IS, Roubos EW, Mangoni ML, Yoshizato K, Vaudry H, Kloepper JE, Pattwell DM, Maderson PF, Paus R (2014). From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology. *Biol Rev Camb Philos Soc* 89 (3):618–655.
- Henry G, Garner WL (2003). Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin North Am* 83 (3):483–507.
- Herrmann K, Trinkkeller U (2015). Dermatologie und medizinische Kosmetik. 3. Aufl., Springer, Berlin.
- Heyer K, Augustin M (2014). Barmer GEK Heil- und Hilfsmittelreport 2014. [Online im Internet] URL: <http://presse.barmer-gek.de/barmer/web/Portale/Presseportal/Subportal/Presseinformationen/Archiv/2014/140916-Heil-und-Hilfsmittelreport/PDF-Heil-und-Hilfsmittelreport-2014,property=Data.pdf> [Stand 08.10.2015].
- Ischia J, Patel O, Shulkes A, Baldwin GS (2009). Gastrin-releasing peptide: different forms, different functions. *Biofactors* 35 (1):69–75.
- Jackson IM, Reichlin S (1977). Thyrotropin-releasing hormone: abundance in the skin of the frog, *Rana pipiens*. *Science* 198 (4315):414–415.
- Jakobsen JN, Sørensen JB (2013). Clinical impact of ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 79 (1):1–7.
- Jens Hoebel, Cornelia Lange, Stephan Müters (2014). Diabetes mellitus. Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2012. [Online im Internet] URL: [http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadadsF/Geda2012/Diabetes\\_mellitus.pdf](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadadsF/Geda2012/Diabetes_mellitus.pdf) [Stand 07.10.2015].
- Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV (2008). International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 60 (1):1–42.
- Jha PK, Foppen E, Challet E, Kalsbeek A (2015). Effects of central gastrin-releasing peptide on glucose metabolism. *Brain Res* (1625):135–141.
- Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Charli J (2015a). Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress. *J Endocrinol* 224 (3):R139-59.
- Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Uribe R, Charli J (2015b). 60 Years of neuroendocrinology: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *J Endocrinol* 226 (2):T85-T100.
- Jull AB, Cullum N, Dumville JC, Westby MJ, Deshpande S, Walker N (2015). Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 3 (Article):CD005083.

- Kallingal GJ, Mintz EM (2014). Site-specific effects of gastrin-releasing peptide in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 39 (4):630–639.
- Karantza V (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 30 (2):127–138.
- Kassem R, Liberty Z, Babaev M, Trau H, Cohen O (2012). Harnessing the skin-thyroid connection for wound healing: a prospective controlled trial in guinea pigs. *Clin Exp Dermatol* 37 (8):850–856.
- Kavalukas SL, Barbul A (2011). Nutrition and wound healing: an update. *Plast Reconstr Surg* 127 (Suppl 1):38S–43S.
- Kawasumi A, Sagawa N, Hayashi S, Yokoyama H, Tamura K (2013). Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol* 367 (2013):33–49.
- Khanna, Ajay K. & Tiwary, Satyendra K. (Hg.) (2016). *Ulcers of the Lower Extremity*. 1. Aufl., Springer India, New Delhi.
- Kim DJ, Mustoe T, Clark RA (2015). Cutaneous wound healing in aging small mammals: a systematic review. *Wound Repair Regen* 23 (3):318–339.
- Klein S, Schreml S, Dolderer J, Gehmert S, Niederbichler A, Landthaler M, Prantl L (2013). Evidenzbasierte topische Therapie chronischer Wunden nach dem T.I.M.E.-Prinzip. *J Dtsch Dermatol Ges* 11 (9):819–830.
- Korber K, Teuner CM, Lampert T, Mielck A, Leidl R (2013). Direkte Krankheitskosten von Diabetes mellitus in Deutschland: erste Abschätzung der Unterschiede zwischen Bildungsgruppen. *Gesundheitswesen* 75 (12):812–818.
- Körber A, Klode J, Al-Benna S, Wax C, Schadendorf D, Steinstraesser L, Dissemmond J (2011). Genese des chronischen Ulcus cruris bei 31 619 Patienten im Rahmen einer Expertenbefragung in Deutschland. *J Dtsch Dermatol Ges* 9 (2):116–122.
- Kottner J, Hillmann K, Fimmel S, Seité S, Blume-Peytavi U (2013). Characterisation of epidermal regeneration in vivo: a 60-day follow-up study. *J Wound Care* 22 (8):395–400.
- Kranke P, Bennett MH, Martyn-St James M, Schnabel A, Debus SE, Weibel S (2015). Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 6 (Article):CD004123.
- Kraupp BG, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R (1995). In situ detection of fragmented dna (tunel assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death. *Hepatology* 21 (5):1465–1468.
- Kreibig SD (2010). Autonomic nervous system activity in emotion: a review. *Biol Psychol* 84 (3):394–421.
- Kröger K, Becker R, Weiland D, Lax H, Priebe J, Maier I (2014). Regional differences in the incidence of inpatients with pressure ulcers in Germany. *J Public Health* 22 (3):227–233.
- Kröger K, Stang A, Kondratieva J, Moebus S, Beck E, Schmermund A, Möhlenkamp S, Dragano N, Siegrist J, Jöckel K, Erbel R, Group, Heinz Nixdorf Recall Study (2006). Prevalence of Peripheral Arterial Disease – Results of the Heinz Nixdorf Recall Study. *Eur J Epidemiol* 21 (4):279–285.
- Li M, Zhao Y, Hao H, Han W, Fu X (2015). Mesenchymal stem cell-based therapy for nonhealing wounds: today and tomorrow. *Wound Repair Regen* 23 (4):465–482.
- Liang C, Park AY, Guan J (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2 (2):329–333.
- Lindblad WJ (2008). Considerations for selecting the correct animal model for dermal wound-healing studies. *J Biomater Sci Polym Ed* 19 (8):1087–1096.

- Liu H, Duan Z, Tang J, Lv Q, Rong M, Lai R (2014a). A short peptide from frog skin accelerates diabetic wound healing. *FEBS J* 281 (20):4633–4643.
- Liu H, Mu L, Tang J, Shen C, Gao C, Rong M, Zhang Z, Liu J, Wu X, Yu H, Lai R (2014b). A potential wound healing-promoting peptide from frog skin. *Int J Biochem Cell Biol* 49 (2014):32–41.
- Liu X, Zheng N, Shi Y, Yuan J, Li L (2014c). Thyroid hormone induced angiogenesis through the integrin  $\alpha\beta 3$ /protein kinase D/histone deacetylase 5 signaling pathway. *J Mol Endocrinol* 52 (3):245–254.
- Loschke F, Seltmann K, Bouameur J, Magin TM (2015). Regulation of keratin network organization. *Curr Opin Cell Biol* (32):56–64.
- Lu L, Mackay DF, Pell JP (2014). Meta-analysis of the association between cigarette smoking and peripheral arterial disease. *Heart* 100 (5):414–423.
- Lu Z, Hasse S, Bodo E, Rose C, Funk W, Paus R (2007). Towards the development of a simplified long-term organ culture method for human scalp skin and its appendages under serum-free conditions. *Exp Dermatol* 16 (1):37–44.
- Luporsi E, André F, Spyrtatos F, Martin P, Jacquemier J, Penault-Llorca F, Tubiana-Mathieu N, Sigal-Zafrani B, Arnould L, Gompel A, Egele C, Poulet B, Clough KB, Crouet H, Fourquet A, Lefranc J, Mathelin C, Rouyer N, Serin D, Spielmann M, Haugh M, Chenard M, Brain E, Cremoux P de, Bellocq J (2012). Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat* 132 (3):895–915.
- Majumdar ID, Weber HC (2011). Biology of mammalian bombesin-like peptides and their receptors. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18 (1):68–74.
- Mansi R, Fleischmann A, Mäcke HR, Reubi JC (2013). Targeting GRPR in urological cancers--from basic research to clinical application. *Nat Rev Urol* 10 (4):235–244.
- Mansour SC, Pena OM, Hancock RE (2014). Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol* 35 (9):443–450.
- Martin P (1997). Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 276 (5309):75–81.
- Martin P, Nunan R (2015). Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 173 (2):370–378.
- Martinez-Zapata MJ, Martí-Carvajal AJ, Solà I, Expósito JA, Bolívar I, Rodríguez L, Garcia J (2012). Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 10 (Article):CD006899.
- Mathes SH, Ruffner H, Graf-Hausner U (2014). The use of skin models in drug development. *Adv Drug Deliv Rev* (69-70):81–102.
- Medical Advisory Secretariat (2009). Management of Chronic Pressure Ulcers: An Evidence-Based Analysis. *Ont Health Technol Assess Ser* 9 (3):1–203.
- Meier NT, Haslam IS, Pattwell DM, Zhang G, Emelianov V, Paredes R, Debus S, Augustin M, Funk W, Amaya E, Kloepper JE, Hardman MJ, Paus R (2013). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) promotes wound re-epithelialisation in frog and human skin. *PLoS ONE* 8 (9):e73596.
- Moll I, Houdek P, Schmidt H, Moll R (1998). Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111 (2):251–258.
- Moll R, Divo M, Langbein L (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129 (6):705–733.

- Moore ZE, Cowman S (2015). Repositioning for treating pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 1 (Article):CD006898.
- Mu L, Tang J, Liu H, Shen C, Rong M, Zhang Z, Lai R (2014). A potential wound-healing-promoting peptide from salamander skin. *FASEB J* 28 (9):3919–3929.
- Muller MD, Reed AB, Leuenberger UA, Sinoway LI (2013). Physiology in Medicine: Peripheral arterial disease. *J Appl Physiol* 115 (9):1219–1226.
- Murphy GF, Flynn TC, Rice RH, Pinkus GS (1984). Involucrin expression in normal and neoplastic human skin: a marker for keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 82 (5):453–457.
- Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F (1998). Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother* 52 (6):252–258.
- Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E (1996). In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method. *J Histochem Cytochem* 44 (9):959–968.
- Nejati R, Kovacic D, Slominski A (2013). Neuro-immune-endocrine functions of the skin: an overview. *Expert Rev Dermatol* 8 (6):581–583.
- Newman AC, Nakatsu MN, Chou W, Gershon PD, Hughes CW (2011). The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol Biol Cell* 22 (20):3791–3800.
- Newman P, Berndt M, Gorski J, White G, Lyman S, Paddock C, Muller W (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247 (4947):1219–1222.
- Nie C, Yang D, Liu N, Dong D, Xu J, Zhang J (2014). Thyrotropin-releasing hormone and its analogs accelerate wound healing. *J Surg Res* 189 (2):359–365.
- Noor S, Zubair M, Ahmad J (2015). Diabetic foot ulcer--A review on pathophysiology, classification and microbial etiology. *Diabetes Metab Syndr* 9 (3):192–199.
- O'Meara S, Al-Kurdi D, Ologun Y, Ovington LG, Martyn-St James M, Richardson R (2014). Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 1 (Article):CD003557.
- Ordóñez NG (2012). Immunohistochemical endothelial markers: a review. *Adv Anat Pathol* 19 (5):281–295.
- Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA (1996). Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 132 (3):381–397.
- Park SA, Covert J, Teixeira L, Motta MJ, DeRemer SL, Abbott NL, Dubielzig R, Schurr M, Isseroff RR, McAnulty JF, Murphy CJ (2015). Importance of defining experimental conditions in a mouse excisional wound model. *Wound Repair Regen* 23 (2):251–261.
- Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, Patel SB, Khalid L, Isseroff RR, Tomic-Canic M (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3 (7):445–464.
- Pattwell DM, Klatte JE, Paredes R, Amaya E, Paus R (2010). Frog skin organ culture – a model system for wound healing. [Online in Internet] URL: [http://www.adf-online.de/wp-content/uploads/adf\\_abstracts\\_2010.pdf](http://www.adf-online.de/wp-content/uploads/adf_abstracts_2010.pdf) [Stand 20.10.2015].
- Payne WG, Naidu DK, Wheeler CK, Barkoe D, Mentis M, Salas RE, Smith DJ, Robson MC (2008). Wound Healing in Patients With Cancer. *Eplasty* (8):e9.

- Perollet C, Han ZC, Savona C, Caen JP, Bikfalvi A (1998). Platelet Factor 4 Modulates Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) Activity and Inhibits FGF-2 Dimerization. *Blood* 91 (9):3289–3299.
- Picard F, Hersant B, Bosc R, Meningaud J (2015). The growing evidence for the use of platelet-rich plasma on diabetic chronic wounds: A review and a proposal for a new standard care. *Wound Repair Regen* 23 (5):638–643.
- Privratsky JR, Newman DK, Newman PJ (2010). PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci* 87 (3-4):69–82.
- Purwins S, Herberger K, Debus ES, Rustenbach SJ, Pelzer P, Rabe E, Schäfer E, Stadler R, Augustin M (2010). Cost-of-illness of chronic leg ulcers in Germany. *Int Wound J* 7 (2):97–102.
- Rabe E, Pannier-Fischer E, Broman K, Schuld K, Stang A, Poncar C, Wittenhorst M, Bock E, Weber E, Jöckel KH (2003). Bonner Venenstudie der Deutschen Gesellschaft für Phlebologie: Epidemiologische Untersuchung zur Frage der Häufigkeit und Ausprägung von chronischen Venenkrankheiten in der städtischen und ländlichen Wohnbevölkerung. *Phlebologie* 32 (1):1–14.
- Raffetto JD (2013). Inflammation in chronic venous ulcers. *Phlebology* 28 (Suppl 1):61–67.
- Ramms L, Fabris G, Windoffer R, Schwarz N, Springer R, Zhou C, Lazar J, Stiefel S, Hersch N, Schnakenberg U, Magin TM, Leube RE, Merkel R, Hoffmann B (2013). Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (46):18513–18518.
- Ramos-Álvarez I, Moreno P, Mantey SA, Nakamura T, Nuche-Berenguer B, Moody TW, Coy DH, Jensen RT (2015). Insights into bombesin receptors and ligands: Highlighting recent advances. *Peptides* (in press).
- Razzell W, Wood W, Martin P (2011). Swatting flies: modelling wound healing and inflammation in *Drosophila*. *Dis Model Mech* 4 (5):569–574.
- Rodriguez L, Wu X, Guan J (2005). Wound-Healing Assay. In: Cell migration. Guan J (Hg.). Humana Press, Totowa, N.J. (Methods in molecular biology, 294):23–29.
- Roelfsema F, Veldhuis JD (2013). Thyrotropin secretion patterns in health and disease. *Endocr Rev* 34 (5):619–657.
- Rotty JD, Coulombe PA (2012). A wound-induced keratin inhibits Src activity during keratinocyte migration and tissue repair. *J Cell Biol* 197 (3):381–389.
- Safer JD (2013). Thyroid hormone and wound healing. *J Thyroid Res* 2013 (Article):124538.
- Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R (2013). Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ* 22 (6):399–411.
- Sämman A, Tajiyeva O, Müller N, Tschäuner T, Hoyer H, Wolf G, Müller UA (2008). Prevalence of the diabetic foot syndrome at the primary care level in Germany: a cross-sectional study. *Diabet Med* 25 (5):557–563.
- Sampson UK, Fowkes FG, McDermott MM, Criqui MH, Aboyans V, Norman PE, Forouzanfar MH, Naghavi M, Song Y, Harrell FE, Denenberg JO, Mensah GA, Ezzati M, Murray C (2014). Global and regional burden of death and disability from peripheral artery disease: 21 world regions, 1990 to 2010. *Glob Heart* 9 (1):145-158.e21.
- Schäfer T (2010). TITEL-Bachelorarbeit. Bachelorarbeit. Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Campus Lübeck).
- Scholzen T, Gerdes J (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182 (3):311–322.
- Seaton M, Hocking A, Gibran NS (2015). Porcine models of cutaneous wound healing. *ILAR J* 56 (1):127–138.

- Seifert AW, Monaghan JR, Voss SR, Maden M (2012). Skin regeneration in adult axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PLoS ONE* 7 (4):e32875.
- Silva R, D'Amico G, Hodivala-Dilke KM, Reynolds LE (2008). Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (10):1703–1713.
- Simons M, Alitalo K, Annex BH, Augustin HG, Beam C, Berk BC, Byzova T, Carmeliet P, Chilian W, Cooke JP, Davis GE, Eichmann A, Iruela-Arispe ML, Keshet E, Sinusas AJ, Ruhrberg C, Woo YJ, Dimmeler S (2015). State-of-the-Art Methods for Evaluation of Angiogenesis and Tissue Vascularization: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res* 116 (11):e99-132.
- Singer AJ, Clark RA (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341 (10):738–746.
- Sinno H, Prakash S (2013). Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. *Plast Surg Int* 2013 (Article):146764.
- Smith TJ, Wilson MA, Young AJ, Montain SJ (2015). A suction blister model reliably assesses skin barrier restoration and immune response. *J Immunol Methods* (417):124–130.
- Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M (2015). Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Biol* (in Press).
- Statistisches Bundesamt (2012). Bevölkerung in Deutschland. [Online im Internet] URL: [https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Bevoelkerungsstand/Tabellen/\\_lrbev03.html](https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Bevoelkerungsstand/Tabellen/_lrbev03.html) [Stand 08.10.2015].
- Steinert PM, Marekov LN (1997). Direct Evidence That Involucrin Is a Major Early Isopeptide Cross-linked Component of the Keratinocyte Cornified Cell Envelope. *J Biol Chem* 272 (3):2021–2030.
- Steinstraesser L, Hirsch T, Schulte M, Kueckelhaus M, Jacobsen F, Mersch EA, Stricker I, Afacan N, Jenssen H, Hancock RE, Kindrachuk J (2012). Innate defense regulator peptide 1018 in wound healing and wound infection. *PLoS ONE* 7 (8):e39373.
- Sterry W, Burgdorf W, Paus R (2010). Checkliste Dermatologie. 6. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Sterry W, Czaika VA (2011). Kurzlehrbuch Dermatologie. 1. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Storm-Versloot MN, Vos CG, Ubbink DT, Vermeulen H (2010). Topical silver for preventing wound infection. *Cochrane Database Syst Rev* 3 (Article):CD006478.
- Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P (2001). The Pig as a Model for human Wound Healing. *Wound Repair Regen* 9 (2):66–76.
- Tansey EA, Johnson CD (2015). Recent advances in thermoregulation. *Adv Physiol Educ* 39 (3):139–148.
- Toivola DM, Boor P, Alam C, Strnad P (2015). Keratins in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* (32):73–81.
- Tonnesen MG, Feng X, Clark RA (2000). Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* 5 (1):40–46.
- Toy LW, Macera L (2011). Evidence-based review of silver dressing use on chronic wounds. *J Am Acad Nurse Pract* 23 (4):183–192.
- Tsourd E, Barthel A, Rietzsch H, Reichel A, Bornstein SR (2013). Current Aspects in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Wounds in Diabetes Mellitus. *Biomed Res Int* 2013 (Article):385641.
- Velnar T, Bailey T, Smrkolj V (2009). The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J Int Med Res* 37 (5):1528–1542.

- Vits S, Dissemond J, Schadendorf D, Kriegler L, Körber A, Schedlowski M, Cesko E (2013). Expectation-induced placebo responses fail to accelerate wound healing in healthy volunteers: results from a prospective controlled experimental trial. *Int Wound J* (in Press).
- Vivas A, Fox JD, Baquerizo Nole KL, Maderal AD, Badiavas E, Cargill DI, Slade HB, Feldman SR, Kirsner RS (2015). Cryo-Induced Thermal Wounds: A Human Acute Wound Model. *J Drugs Dermatol* 14 (7):734–738.
- Warth A, Cortis J, Soltermann A, Meister M, Budczies J, Stenzinger A, Goeppert B, Thomas M, Herth FJ, Schirmacher P, Schnabel PA, Hoffmann H, Dienemann H, Muley T, Weichert W (2014). Tumour cell proliferation (Ki-67) in non-small cell lung cancer: a critical reappraisal of its prognostic role. *Br J Cancer* 111 (6):1222–1229.
- Weber C, Noels H (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 17 (11):1410–1422.
- Weber HC (2009). Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16 (1):66–71.
- Weis SM, Cheresch DA (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 17 (11):1359–1370.
- Werner S, Krieg T, Smola H (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 127 (5):998–1008.
- Wittens C, Davies AH, Bækgaard N, Broholm R, Cavezzi A, Chastanet S, Wolf M de, Eggen C, Giannoukas A, Gohel M, Kakkos S, Lawson J, Noppeney T, Onida S, Pittaluga P, Thomis S, Toonder I, Vuylsteke M, Kolh P, Borst GJ de, Chakfé N, Debus S, Hinchliffe R, Koncar I, Lindholt J, Ceniga MV de, Vermassen F, Verzini F, Maeseneer MG de, Blomgren L, Hartung O, Kalodiki E, Korten E, Lugli M, Naylor R, Nicolini P, Rosales A (2015). Editor's Choice - Management of Chronic Venous Disease: Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 49 (6):678–737.
- Wong KH, Chan JM, Kamm RD, Tien J (2012). Microfluidic models of vascular functions. *Annu Rev Biomed Eng* (14):205–230.
- Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC (2011). Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol* 2011 (Article):969618.
- Yaffe MB, Beegen H, Eckert RL (1992). Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as an intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope. *J Biol Chem* 267 (17):12233–12238.
- Yamaguchi Y, Hosokawa K, Nakatani Y, Sano S, Yoshikawa K, Itami S (2002). Gastrin-releasing peptide, a bombesin-like neuropeptide, promotes cutaneous wound healing. *Dermatol Surg* 28 (4):314–319.
- Young BR de, Frierson HF, Ly MN, Smith D, Swanson PE (1998). CD31 immunoreactivity in carcinomas and mesotheliomas. *Am J Clin Pathol* 110 (3):374–377.
- Zmijewski MA, Slominski AT (2011). Neuroendocrinology of the skin: An overview and selective analysis. *Dermatoendocrinol* 3 (1):3–10.

## **9 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. E. Sebastian Debus möchte ich für die Überlassung des Promotionsthemas und seine außerordentliche, persönliche Förderung und Unterstützung auf meinem bisherigen Berufsweg danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Markus Geißen für seine kompetente und kontinuierliche Betreuung während der gesamten Promotion sowie Astrid Becker für ihre technische Anleitung und Mithilfe im Labor. Ihre Mitwirkung und persönliche Freundschaft über viele Jahre haben bedeutend zu dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Falko Brinkmann, Herrn Dr. med. Dennis Mehrkens und meinem Bruder Clemens Kleinspehn, M.Sc. für die gewissenhafte Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes mit dem Hintergrundwissen ihrer jeweiligen naturwissenschaftlichen Fachgebiete. Ihre kritischen Hinweise und Anmerkungen waren mir eine große Hilfe.

Stefan Thiele als mein Partner, engster Vertrauter und bester Freund bereichert täglich mein Leben mit seiner Liebe. Ihm verdanke ich unendlich viele glückliche Momente und ich freue mich auf die gesamte gemeinsame Zeit, die wir noch zusammen verbringen werden.

Schlussendlich gilt mein größter Dank meinen Eltern Birgit und Jens Kleinspehn, die mich stets in allen Wünschen und Ideen uneingeschränkt unterstützt haben. Ihr unablässiges Vertrauen und stetige Zuversicht in allen Situationen des Lebens sind mir ein Vorbild.

## **10 Lebenslauf**

(entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen)

(Lebenslauf)

## **11 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, den 24.04.2016

Edgar Kleinspehn