

**Menschliche Hautmodelle als Testverfahren  
zur Entwicklung von Medikationen zur  
Wundheilung durch Extrakte von *Lucilia  
sericata*.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Dipl. Biol. Emmanouil Bournelis**  
aus Essen

Düsseldorf

September 2012

aus dem Institut für Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und  
Parasitologie

der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. William Martin  
Korreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn i. R.

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2012

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. Heinz Mehlhorn für die Überlassung des überaus interessanten Themas dieser Arbeit sowie die hervorragende wissenschaftliche Betreuung im Verlauf der Durchführung.

Mein Dank gilt auch Herrn Universitätsprofessor Dr. William Martin für die Übernahme des Referates nach der Pensionierung von Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn.

Der Firma Henkel AG & Co. KGaA möchte ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel danken. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. Kerstin Reisinger für die vielfältigen Anregungen, für ihren fördernden Einsatz und für die Möglichkeit, diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt aber auch meinen Laborkollegen aus dem Biological & Clinical Research der Fa. Henkel AG & Co. KGaA: Herrn Dr. Karsten Mewes, Herrn Dipl. Biol. Lars Vierkotten, Herrn Jürgen Kreutz, Frau Ursula Engels, Frau Anja Fischer und Frau Neli Blasius und allen weiteren Mitarbeitern für ein ausgezeichnetes Arbeitsklima aber auch für die unzähligen Hilfestellungen.

Ich möchte mich ganz besonderes bei Herrn Dipl. Biol. Falk Gestmann, Herrn Dr. Dominik Stuhlmann und Herrn Dr. Olaf Holtkötter für die freundschaftliche Unterstützung von und ihr stetes Bemühen um fachliche Beratungen und konstruktive Gespräche bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt haben.

Den größten Dank schulde ich jedoch meiner Frau Sabine, die so manche Laune und Phase, insbesondere gegen Ende dieser Dissertation, gleichmütig ertragen und mir sehr viel Kraft gegeben hat. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden.

für Sabine

---

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ALI	Air Liquid Interface
ca.	circa
DMEM	Eagle's Medium, nach Dubblecco's Modifikation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleic-Acid (s. DNS)
DNS	Desoxy-Ribonucleinsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
haupts.	hauptsächlich
HDEK	Humane dermale epitheliale Keratinozyten
HDF	humane dermale Fibroblasten
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
IU	International Units
min	Minuten
mM	mMol/L
mm	Millimeter
nM	nmol/L
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
od.	oder
Ref.	Referenz
rpm	Rotationen pro Minute
s.a.	siehe auch
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) Triton™ X-100
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
µm	Mikrometer
µM	µmol/L
zzgl.	zuzüglich

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Funktion und Aufbau der Haut	8
1.2	Kutane Wundheilung	10
1.3	Chronische Wunden	14
1.4	Der Einsatz von <i>Lucilia sericata</i> Larven in der Biochirurgie	16
1.5	Regulation epithelialer Adhäsion und Migration durch Integrine	19
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Materialien	26
3.1.1	Extrakte aus <i>Lucilia sericata</i>	26
3.1.2	Zellkulturmedien	26
3.1.3	Chemikalien, Kits, Verbrauchsmaterial	28
3.1.4	Geräte	31
3.2	Methoden	32
3.2.1	Charakteristika der verwendeten Zellen	32
3.2.2	Isolation von Keratinozyten aus Biopsien	32
3.2.3	Expansion von Keratinozyten	33
3.2.4	Kryokonservierung von Keratinozyten	33
3.2.5	Kultivierung von Keratinozyten	33
3.2.6	Isolation von Fibroblasten aus Biopsien	33
3.2.7	Expansion von Fibroblasten	34
3.2.8	Kryokonservierung von Fibroblasten	34
3.2.9	Kultivierung von Fibroblasten	34
3.2.10	Vitalitätsbestimmung von Zellen	35
3.2.11	Proliferations-Test	36
3.2.12	Bestimmung der Zelladhäsion	37
3.2.13	Bestimmung der Zellmigration	38
3.2.14	Quantitative Protein Analyse	40
3.2.15	Herstellungs- und Kultivierungsmethode des Phenion® Full-Thickness Skin Model (Vollhautmodell)	43
3.2.16	Das dreidimensionale <i>in vitro</i> Wundheilungsmodell	45
3.2.16.1	Verwundungsmethoden	46
3.2.16.2	Markierung der Wunde	50
3.2.16.3	Behandlung und experimentelle Setups	51
3.2.17	Herstellung von Paraffinschnitten	51
3.2.18	Hämatoxylin-Eosin Färbung	52

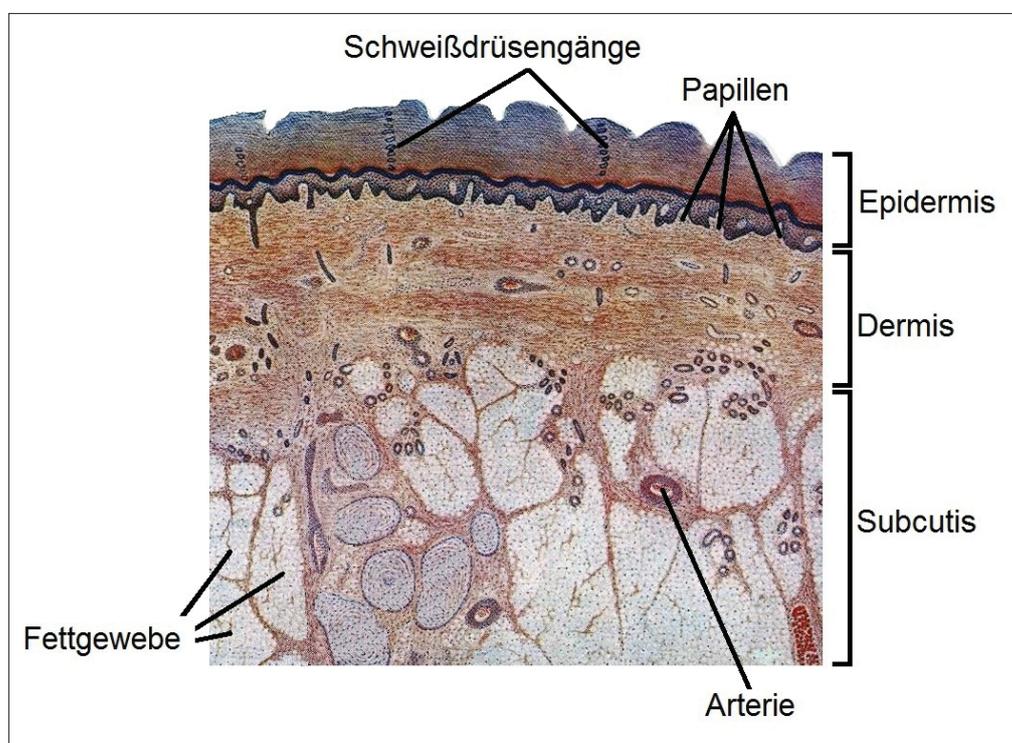
3.2.19	Immunhistochemie	52
3.2.19.1	Nachweis von Ki67 und Berechnung der Proliferation	53
3.2.19.2	Immunhistochemischer Nachweis von Fibronectin und Überprüfung der Fibronectinbeschichtung	54
3.2.20	Berechnung der Wundheilung von Kältewunden	55
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1	Versuche an Keratinozyten- und Fibroblasten Monolayerkulturen	57
4.1.1	Vitalität	57
4.1.1.1	Einfluss des Extraktes auf die Vitalität von Fibroblasten	58
4.1.1.2	Einfluss des Extraktes auf die Vitalität von Keratinozyten	60
4.1.2.	Proliferation	61
4.1.2.1	Einfluss des Extraktes auf die Proliferation von Fibroblasten	61
4.1.2.2	Einfluss des Extraktes auf die Proliferation von Keratinozyten	63
4.1.3	Adhäsion	65
4.1.3.1	Einfluss des Extraktes auf die Adhäsion von Fibroblasten	65
4.1.3.2	Einfluss des Extraktes auf die Adhäsion von Keratinozyten	67
4.1.4	Migration	70
4.1.4.1	Einfluss des Extraktes auf die Migration von Fibroblasten	70
4.1.4.2	Einfluss des Extraktes auf die Migration von Keratinozyten	72
4.1.5	Zusammenfassung der Vitalitäts-, Proliferations- Adhäsions- und Migrations-Versuche	75
4.1.6	Identifizierung beteiligter Integrine an der veränderten Adhäsion und Migration	75
4.2	Analyse der wundheilungsfördernden Wirkung von <i>Lucilia sericata</i> Extrakten an Vollhautmodellen	78
4.2.1	Inzision	78
4.2.2	Exzision	79
4.2.3	Hitzeeinwirkung	80
4.2.4	Kälteverwundung	81
4.2.5	Immunhistochemischer Nachweis von Ki67	85
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>Literaturliste</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>117</b>
<b>10</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>118</b>

# 1 Einleitung

## 1.1. Funktion und Aufbau der Haut

Die Haut ist die äußere Begrenzung des Körpers zu seiner Umwelt. Auf sie entfallen etwa 15% des gesamten Körpergewichts eines Erwachsenen, womit sie das größte Organ des Körpers darstellt. Sie übt mehrere lebenswichtige Funktionen aus wie dem Schutz vor physikalischen, chemischen und biologischen Noxen, der u.a. durch die Hornhaut vermittelt wird, die als Permeationbarriere fungiert [115,116]. Des Weiteren ist die Haut an der Regulation des Thermo- und des Wasserhaushaltes beteiligt u.a. durch die Produktion von Schweiß. Als Sinnesorgan dient die Haut zudem der Wahrnehmung von mechanischen, chemischen und thermischen Reizen [1].

Diese Funktionen werden von unterschiedlichen Bereichen der Haut wahrgenommen, die sich in **a)** die Epidermis, **b)** die Dermis, und **c)** die Unterhaut (Subkutis) aufteilt (**Abb. 1**).



**Abb. 1**  
**Anatomie der Haut** (verändert nach Sobotta/Hammersen, 1985 [2])

Die **Epidermis** ist ein Plattenepithel, das sich kontinuierlich selbst erneuert. Es beinhaltet verschiedene Zelltypen, darunter Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkel-Zellen. Der dominierende Zelltyp der Epidermis sind die Keratinozyten (90-95%). Sie sind in kontinuierlichen Schichten angeordnet (von innen nach außen): das einschichtige Stratum basale, das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum. Das Stratum basale besteht aus proliferativ aktiven epithelialen pluripotenten Zellen. Tochterzellen lösen sich nach der Mitose aus dem Stratum basale und wandern in Richtung Hautoberfläche. Während des Prozesses durchlaufen sie morphologische und biochemische Veränderungen, bis sie schließlich nach etwa 30 Tagen als kernlose keratinreiche Korneozyten im Stratum corneum ausdifferenziert sind und von dort abschilfern.

Die darunter liegende **Dermis** ist ein fibroelastisches Gewebe von hoher Reißfestigkeit und Elastizität und dient als Träger der die Haut versorgenden Gefäße und Nerven. Das Gewebe besteht aus lose ineinander vernetzten Kollagenfaserbündeln (größtenteils vom Typ I und III) sowie elastischen Fasern. In der oberen Dermis (Stratum papillare) sind die Kollagenfasern lockerer gewebt als in der tieferen Dermis (Stratum reticulare). Zwischen den Maschen des Fasernetzes sind Fibroblasten und Mastzellen eingelagert. Die Fibroblasten sind für die Synthese und den Abbau verschiedener Strukturproteine verantwortlich. Zu ihnen werden multifunktionale Glykoproteine, Proteoglykane und Faserproteine wie Elastin und diverse Kollagene gezählt. Den Raum zwischen zellulären und faserigen Elementen (Interstitium) füllt eine gallertige Flüssigkeit aus, die sogenannte Interzellulärsubstanz (ein Gemisch aus Glykosaminglycanen und Proteoglycanen). Faserige Elemente und Interzellulärsubstanz bilden gemeinsam die extrazelluläre Matrix (EZM). Sie unterstützt die Kommunikation zwischen Zellen und dient als Grundlage für Zellbewegungen wie die Migration. Als eigenständige Strukturen der Haut sind Haarfollikel, Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen in die Dermis eingebettet [3]. Die mechanische Verbindung zwischen Dermis und Epidermis vermittelt die komplex aufgebaute **dermoepidermale Junktionszone** (DEJ). Diese Grenzfläche besteht von außen nach innen aus vier Anteilen: (1) der Zellmembran der basalen Keratinozyten, die mit Hilfe von Hemidesmosomen in den darunterliegenden Schichten verankert sind. Dies sind die (2) Lamina lucida u.a. mit Ankerfilamenten, (3) die Lamina densa u.a. mit

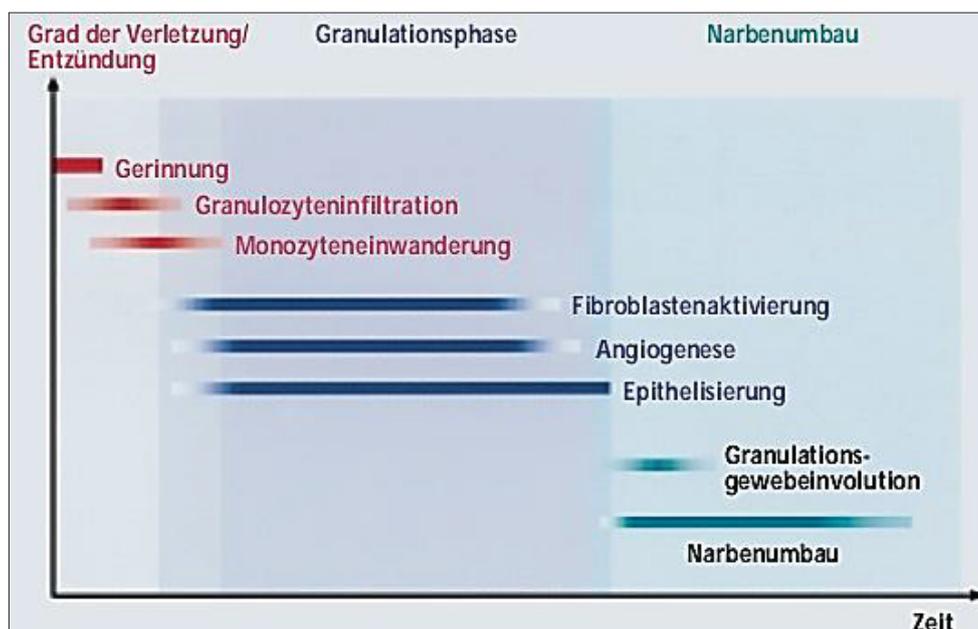
Kollagen Typ IV, Fibronectin und (4) der sublaminäre Raum mit den Ankerfibrillen (u.a. Kollagen Typ I, III, VII) [4-6].

Unterhalb der Dermis ist die **Subkutis** lokalisiert. Sie enthält eine beträchtliche Menge an Fettgewebe, ist gut vaskularisiert und trägt zu den mechanischen und wärmeregulierenden Eigenschaften der Haut bei. An die Subkutis grenzen Muskeln und Sehnen.

### 1.2 Kutane Wundheilung

Die Haut dient als Barriere zur Außenwelt. Ihre Unversehrtheit ist Voraussetzung für ihre Schutzfunktion. Jede Verletzung dieser Barriere muss deswegen schnell und effizient repariert werden. Die Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der die Zusammenarbeit vieler verschiedener Kompartimente und Zelltypen beinhaltet.

Im Wundheilungsprozess werden mehrere Phasen unterschieden, die sich zeitlich und räumlich überlappen (**Abb. 2**). Diese Phasen sind: 1. provisorischer Wundverschluss durch ein Fibrinkoagel, 2. Entzündungsphase (Inflammation), 3. Reepithelisation, 4. Granulationsphase, 5. Wundkontraktion und Narbenumbau (tissue remodelling).



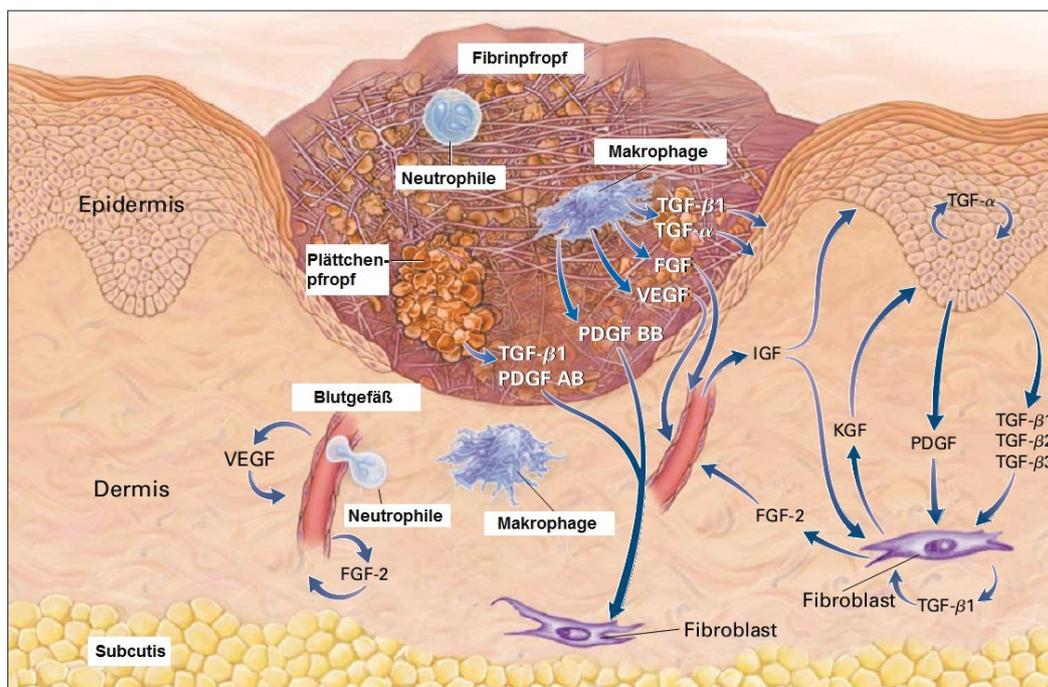
**Abb. 2**

**Phasen der Wundheilung.** Die einzelnen Phasen zeigen eine zeitliche und räumliche Überlappung im Wundareal (verändert nach Smola et al., 2001 [7]).

**Wundverschluss und Entzündungsphase:** Die meisten Wunden verursachen eine Zerstörung von Blutgefäßen und ermöglichen dadurch die Extravasation von Blutzellen und freiem Protein, die die Bildung eines Blutgerinnsels auslösen. Dieses dient als temporärer Schutz des darunterliegenden Gewebes und bildet eine vorläufige extrazelluläre Matrix, die die Zellwanderung unterstützt (**Abb. 3**). Das Blutgerinnsel besteht aus Thrombozyten eingebettet in einem Maschenwerk quervernetzter Fibrinfasern im Verbund mit Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin. Es dient zudem als Reservoir für Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Leukozyten und Fibroblasten zur Wunde leiten. Bei Wunden ohne Blutverlust übernehmen komplementäre Mechanismen (durch Proteinschädigung induzierte vasoaktive und chemotaktische Mediatoren aus dem umgebenden Gewebe) die Anlockung von Inflammationszellen in die Wunde. Einwandernde Neutrophile reinigen die Wunde von Fremdkörpern und Bakterien und werden dann selbst durch Makrophagen phagozytiert. Durch Bindung an spezifische Proteine der extrazellulären Matrix werden Makrophagen zur Phagozytose von Mikroorganismen und Fragmente der extrazellulären Matrix stimuliert. Monozyten und Makrophagen schütten zudem eine Fülle von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus, die für die Gewebeneubildung notwendig sind [8,9].

**Reepithelisation:** Die Migration der Keratinozyten beginnt bereits einige Stunden nach der Verwundung [90]. Sie umfasst sowohl basale als auch suprabasale Zellen [10]. Keratinozyten verändern dazu das Expressionsmuster von Keratinen (Herabsetzung von K1, 10, 2 und Neusynthese von K6 und K16) [102]. Voraussetzung zur Wanderung ist die Lösung der Hemidesmosomen, sowie die Lockerung der Verbindungen zwischen den Keratinozyten. Sie migrieren entlang der Grenze aus Blutgerinnsel und dermale Kollagen, das nun durch die Verwundung exponiert ist. Die Migration von Zellen ist dabei von einer kontrollierten Abfolge von Anheftung und Ablösung der Zellen an die umgebene Matrix charakterisiert. Hierzu bedarf es sowohl der *de novo* Synthese als auch der Positionsänderung vorhandener Integrine (s.a. **Tabelle 2** sowie **Abb. 8** und **Kapitel 1.5**). Um ihr Vordringen zu ermöglichen, exprimieren Epithelzellen zudem tPA (tissue-type plasminogen activator), uPA (urokinase-type plasminogen activator) zur Fibrinolyse [103], sowie MMP (Matrix-Metalloproteinasen) zur Lyse von Kollagenen des Typs I, III, IV und VII [91]. Einen Tag später folgt eine

Proliferationswelle in den hinteren Reihen der neoepidermalen Zunge. Der gesamte Prozess wird durch Wachstumsfaktoren gesteuert: Transforming Growth Factor (TGF)  $\alpha$  und  $\beta$  aus Keratinozyten, Makrophagen und Thrombozyten sowie Keratinocyte Growth Factor (KGF) aus Fibroblasten [11-13].

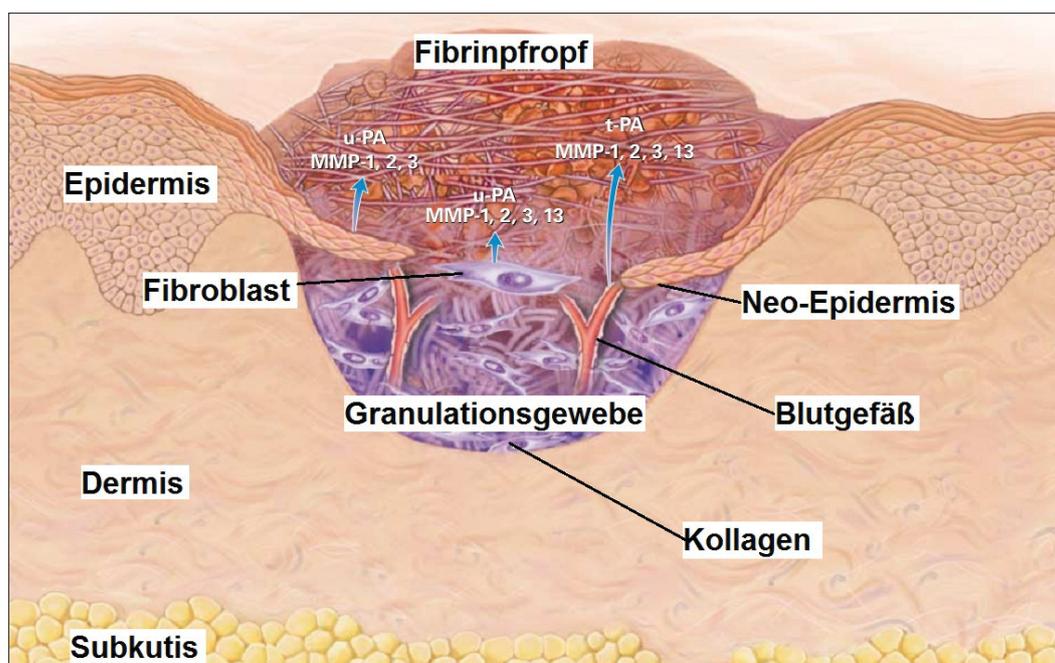


**Abb. 3**  
**Entzündungsphase** (verändert nach Singer and Clark, 1999 [9])

Am Ende der Reepithelisation kommt die Migration zum Erliegen. Gleichzeitig mit der Synthese der Basallamina und die Bildung der Hemidesmosomen beenden die Keratinozyten die Expression der während der Migration benötigten Integrine und Metalloproteinasen und das normale Differenzierungsprogramm der Epidermis läuft wieder an. Der letzte Schritt ist die Fixierung der Basallamina durch die Ankerfibrillen.

**Granulationsphase:** Die Dermisregeneration beginnt nach etwa 4 Tagen. Das neue Gewebe wird oft wegen seines Aussehens als Granulationsgewebe bezeichnet. Zahlreiche neue Kapillaren verleihen dem neuen Stroma sein körniges Aussehen. Makrophagen, Fibroblasten und Blutgefäße wandern gleichzeitig in die Wunde ein. Die Makrophagen sind eine ständige Quelle von Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation der Fibroblasten und die Angiogenese stimulieren. Die Fibroblasten produzieren die neue extrazelluläre

Matrix und die Blutgefäße transportieren Sauerstoff und Nährstoffe, die notwendig sind, um den, während der Wundheilung erhöhten Zellstoffwechsel, zu unterstützen. Für die Migration der Fibroblasten ist eine Reihe von Enzymen notwendig, um die provisorische Matrix abzubauen und Platz für die neue EZM zu schaffen (**Abb. 4**).



**Abb. 4**  
Reepithelisation und Granulationsgewebe (verändert nach Singer and Clark, 1999 [9])

**Wundkontraktion und Narbenumbau:** Die Wundkontraktion beinhaltet Wechselwirkungen von Zellen, extrazelluläre Matrix und Zytokinen. In der zweiten Woche der Wundheilung differenzieren sich die Fibroblasten zu Myofibroblasten, die durch das Vorhandensein großer Bündel von  $\alpha$ -Aktin Mikrofilamenten gekennzeichnet sind. Sie sind an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert und an Zell-Matrix-Verbindungen beteiligt [117]. Mit dem Erscheinen der Myofibroblasten, beginnt sich die Matrix zu verdichten und die Wunde zu kontrahieren. Letzteres scheint durch TGF- $\beta_1$  oder - $\beta_2$  und Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) vermittelt zu werden [119]. Des Weiteren ist die Adhäsion der Fibroblasten an die Kollagen-Matrix durch Integrin-Rezeptoren und Querverbindungen zwischen den einzelnen Bündeln von Kollagen notwendig. Nach dem Wundschluss sterben die meisten Zellen im ehemaligen Wundbereich wobei dann eine relativ zellarme Narbe entsteht.

Der Narbenumbau (tissue remodeling) fängt bereits während der Granulationsphase an und kann bis zu einem Jahr andauern. In dieser Phase treten ständige Umbau- und Umstrukturierungsprozesse auf, wodurch es zu einer Zunahme der Reißfestigkeit der Wunde kommt [9,120,121].

### 1.3 Chronische Wunden

Die meisten akuten Wunden heilen ereignislos. Dauert die Wundheilung jedoch sehr lange (z.B. bei schweren offenen Wunden), oder sind eine oder mehrere Stadien der Wundheilung gestört (z.B. bei persistierenden Infektionen, Diabetes, Dekubitus und anderen ischämische Grunderkrankungen), so kann es zur Entstehung von chronischen Wunden kommen [14]. Diese weisen signifikante Unterschiede zu den akuten Wunden bezüglich ihrer Pathophysiologie auf.

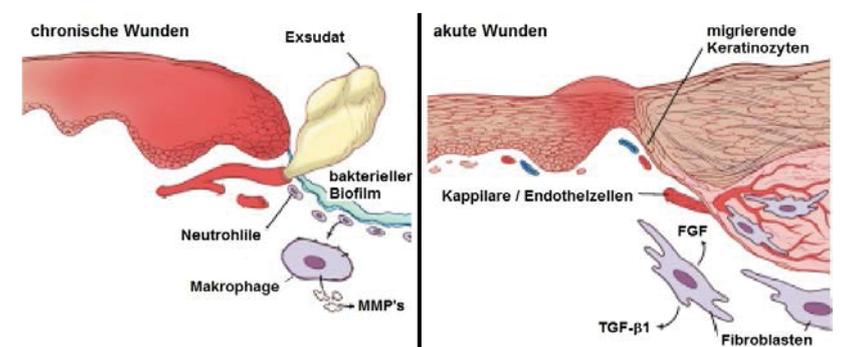
Die pathologisch veränderten Wunden befinden sich in einem Stadium der chronischen Inflammation, das primär durch die Anwesenheit einer Vielzahl von Monozyten und Makrophagen charakterisiert ist. Sie sind für den hohen Gehalt von Zytokinen (z.B. Interleukin (IL) -1, -6, und Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ ), Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der chronischen Wundflüssigkeit verantwortlich [80]. Die erhöhte proteolytische Aktivität führt zum Abbau von Wachstumsfaktoren und EZM Molekülen (u.a. Vitronectin und Fibronectin), die essentiell für die Wundheilung sind [122]. Die erhöhte Konzentration von ROS ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ) kann Zellen direkt beschädigen oder trägt zu einer erhöhten Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP -1, -2, -3, -9 und -13) bei [123,124]. Darüber hinaus sind chronische Wunden oft durch eine bakterielle Infektion gekennzeichnet. Bakterielle Komponenten (Extrazelluläres Adhärenz Protein (Eap), Formyl Methionyl Peptid, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin) tragen zu fehlerhaften Wundheilungsmechanismen bei, indem sie Zell-Matrix Verbindungen stören, oder die Entzündungsphase verlängern [125].

Die Inflammation chronischer Wunden führt also zum Abbau der umgebenden EZM Bestandteile. Die daraus resultierende fehlerhafte Matrix führt ihrerseits zu gestörte Zell-Matrix Verbindungen. Die Adhäsion von Keratinozyten ist z.B. auf dieser fehlerhaften Matrix *in vitro* herabgesetzt [32,33].

In chronischen Wunden wurde zudem eine stark verminderte Expression des Integrins  $\alpha_5\beta_1$  an Keratinozyten beobachtet. Dieses Integrin vermittelt die Adhäsion und Migration von Keratinozyten an das Fibronectin (s.a. **Kapitel 1.5**).

Wohl aus diesem Grund misslingt es den Keratinozyten (trotz einer gleichzeitig erhöhten Fibronectin Expression und einer Hyperproliferation) in Richtung Wundmitte zu migrieren, um die Wunde zu schließen [34]. In einer neuen Studie wird die Wiederherstellung von Integrin-EZM Beziehungen in chronischen Wunden mit Hilfe von externen Mitteln als eine mögliche frühe Förderung der Wundheilung diskutiert [126].

**Abbildung 5** gewährt einen Überblick der Unterschiede zwischen akuten und chronischen Wunden.



	chronische Wunden	akute Wunden
Blutgerinnung	keine	normal
Entzündungsphase	erhöht / verlängert	normal
Kapillare / Endothelzellen	undicht / vermehrtes Wundexsudat	migrierend
EZM	defekte EZM	aktive Synthese
Protease Inhibition	Ungleichgewicht	Gleichgewicht
Wundrand	rund und fibrotisch	flach
Keratinozyten-Migration	gehemmt	aktiv
Bakterien	bakterielle Kolonisation	keine bis wenige
Biofilm	präsent	fehlt
Narbe	exzessiv	normal
ROS	anwesend	abwesend

**Abb. 5**

**Unterschiede zwischen akuten und chronischen Wunden** (verändert nach Schultz and Wysocki, 2009 [15])

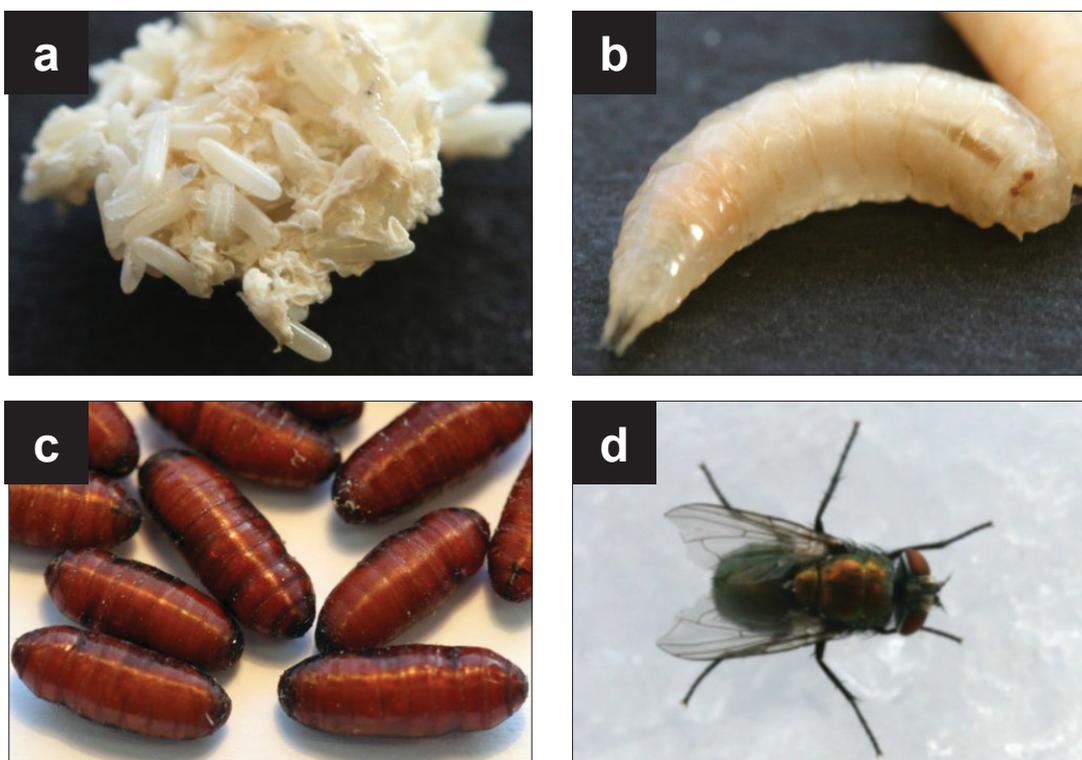
### 1.4 Der Einsatz von *Lucilia sericata* Larven in der Biochirurgie

Chronische Wunden sind eine Herausforderung für die moderne Gesundheitsversorgung. Ein Grundprinzip der Behandlung von chronischen Wunden ist das chirurgische Entfernen von nekrotischem Gewebe (Débridement) und die Behandlung der bakteriellen Infektion. Die Biochirurgie, ein Begriff der den Einsatz lebender Fliegenlarven zur Behandlung chronischer Wunden zusammenfasst, ist eine vielversprechende Ergänzung zu den schulmedizinischen Ansätzen [16]. Insbesondere die Spezies *Lucilia sericata* (Ordnung: Diptera; Familie: Calliphoridae (Schmeißfliegen); Gattung: *Lucilia* (Goldfliegen); Art: *L. sericata* [Meigen 1826]) (**Abb. 6**) wird in der Biochirurgie eingesetzt [17]. Sie gehört zu den fleischfressenden Fliegenspezies, die für die Biochirurgie geeignet sind, da ihre Larven zu den fakultativen Parasiten gehören, die unfähig sind, signifikante Mengen an lebendem Gewebe aufzunehmen oder zu beschädigen [35,36]. In einem standardisierten Verfahren schlüpfen aus den Eiern der Goldfliege nach 18 - 24 Stunden 1- 2 mm große Larven. In diesem ersten Larvenstadium werden sie zur Behandlung eingesetzt, bis sie sich nach etwa 4 bis 5 Tagen zu Puppen entwickeln.

Die Wirkungsweisen der *Lucilia sericata* Larven kann man wie folgt beschreiben: Zunächst reinigen sie die Wunde von totem Gewebe. Darüber hinaus desinfizieren sie die Wunde, in dem sie Bakterien aus dem Wundbereich entfernen und die Biofilm-Entstehung verhindern. Durch die Säuberung der Wunde wird die Zellproliferation gefördert und dadurch die Wundheilung positiv beeinflusst [37].

Allerdings unterliegt der Einsatz von *Lucilia sericata* Fliegenlarven gewissen Einschränkungen. Die Fliegenlarven sind nur 3 bis 4 Tage einsetzbar. Entsprechend oft müssen Verbandswechsel stattfinden und die Lieferung von neuen Larven muss logistisch abgestimmt werden. Fliegenlarven bedürfen zudem besonderen Zucht-, Transport- und Einsatzbedingungen. Hierzu muss die Sterilität der Fliegenlarven gewährleistet sein, denn das Risiko einer Infektion durch nichtsterile Larven sollte vermieden werden. Es gibt jedoch auch Kontraindikationen, die gegen einen Einsatz lebender Larven an Patienten sprechen: Koagulopathien (Blutgerinnungsstörungen) oder Wunden in der Umgebung von großen Blutgefäßen sind wegen des Blutungs- und Infektionsrisikos kontraindiziert. Desweiteren sind Wunden, die in enger

Nachbarschaft zur Bauchhöhle oder zu Organen wie dem Auge lokalisiert sind, kein Einsatzgebiet für die Biochirurgie. Patienten mit akuten und/oder schnell fortschreitenden Infektionen sollten von einer Behandlung mit Fliegenlarven absehen, ebenso wie Patienten mit niedriger Schmerzschwelle, bzw. solche, die von dem benötigten häufigen Verbandswechsel absehen möchten [38].



**Abb. 6**  
***Lucilia sericata***: Eier (a); Larve (b); Puppen (c); Adult (d) (aus Gestmann et al. (2012) [79])

Aus diesen Gründen wäre ein Wechsel von der Therapie mit intakten Larven hin zu Larvenextrakten oder einzelnen Bestandteilen von Larven wünschenswert. Entsprechende Untersuchungen konzentrierten sich bisher meistens auf die Sekretions- bzw. Exkretionsprodukte lebender Larven oder auf Extrakte aus Speicheldrüsen, Hämolymphe und Darm der Larven. Vor allem in der letzten Dekade konnten neue Erkenntnisse bezüglich der molekularen Mechanismen der Madentherapie erzielt werden und einzelnen Komponenten der Fliegenlarven positive Effekte auf die Wundheilung zugeschrieben werden. Bestandteile der Larven können die Wundheilung direkt (Wirkung auf lebenden Zellen) oder indirekt (Wirkung auf das Wundmilieu) beeinflussen. Zur ersten Kategorie zählt der Befund, dass gezeigt werden konnte, wie Bestandteile der Larven zu einer verringerten Produktion von  $H_2O_2$  in Neutrophilen führen kann. Da sie zudem die

Migration von Monozyten hemmen, drängen sie die Entzündungsreaktionen in chronischen Wunden zurück [24]. Bestandteile von Larven können zudem die Proliferation von Endothelzellen induzieren. Das begünstigt die Ausbildung von neuen Blutgefäßen und unterstützt somit die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des betroffenen Gewebes, wirkt der Nekrose entgegen und dient, wenn auch indirekt, der Ausbildung von neuem Gewebe [26,29].

**Tabelle 1**

**Bestandteile von *Lucilia sericata* Larven und ihre Wirkung auf die Wundheilung.**

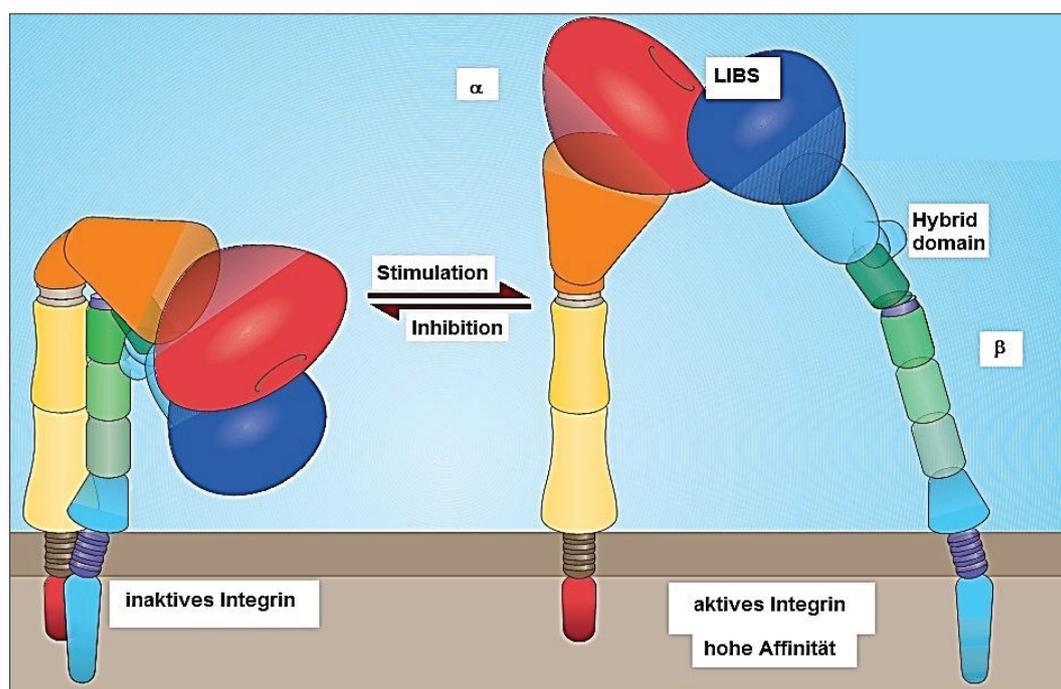
**SE:** Sekretions- bzw. Exkretionsprodukte (werden durch wiederholtes Waschen von Larven mit PBS gewonnen)

<b>Bestandteil(e)</b>	<b>Effekte</b>	<b>Ref.</b>
Allantoin	Stimulation von Granulationsgewebe	[18]
Urogenase Aktivität (Ammoniak)	Erhöhung des pH-Wertes in der Wunde	[19]
Hämolymphe, (SE)	pro-proliferativ für Fibroblasten	[20]
Serin- (Trypsin, Chymotrypsin) Proteasen, Aspartyl-Proteasen, MMP (Exopeptidase)	EZM-Degradation, Fibrin Solubilisation, Thrombin Abbau	[21]
Proteasen (Fibronectin, Collagen Abbau)	Erniedrigung der Fibroblasten Adhäsion und Streuung, Erhöhung der Fibroblasten Migration	[22]
Serine Proteasen	Erhöhung der Fibroblasten Migration durch Fibronectinabbau	[23]
Hitzelabile Komponenten von (SE)	Inhibition der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion und der Elastase-Aktivität von Neutrophilen, Inhibition der Migration von Neutrophilen und Monozyten	[24]
Speicheldrüsen Extrakt	keine Stimulation von humanen Neutrophilen	[25]
L-Histidin, 3-Guanidino-propionsäure, L-Valinol	Proproliferativ für humane Endothelzellen, Inhibition der Proliferation auf Fibroblasten	[26]
Lucifensin	Antimikrobielle Wirkung	[27]
Chymotrypsin I (rekombinant)	ECM-Degradation (Aktivität höher als das humane Chymotrypsin I)	[28]
Verschiedene Fettsäuren	Proproliferativ für humane Endothelzellen	[29]

Die indirekte Wirkung von Larven Bestandteilen scheint jedoch hauptsächlich der Abbau von Molekülen der provisorischen Matrix zu sein [21-23]. Verschiedene Serin- (Trypsin, Chymotrypsin) und Aspartyl-Proteasen sowie MMP werden dafür verantwortlich gemacht [21]. Es wird diskutiert, dass dies zu einer Lockerung der EZM und potentiell zu einer leichteren Migration von Fibroblasten führen könnte [22,23]. Zu den indirekten wundheilungsfördernden Wirkungen von Bestandteilen

aus *Lucilia sericata* Larven könnte auch die Abtötung von in der Wunde befindlichen Bakterien gezählt werden. So konnte mit Lucifensin ein Protein identifiziert werden, das die antimikrobielle Wirkung zu vermitteln scheint [27]. **Tabelle 1** gewährt einen Überblick der Studien, die die Wirkung der Larvenbestandteile auf die Wundheilung bisher untersucht haben.

### 1.5 Regulation epithelialer Adhäsion und Migration durch Integrine



**Abb. 7**  
**Integrin Aktivierung durch Konformationsänderung.**  $\alpha$ : Integrin-monomer  $\alpha$ ,  $\beta$ : Integrin-monomer  $\beta$ , LIBS (ligand induced binding site). (verändert nach Byron, 2009 [40]).

Integrine sind Transmembranproteine, die aus zwei, nicht kovalent gebundenen Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) bestehen. Bis heute sind 18  $\alpha$  und 8  $\beta$  - Untereinheiten bekannt, die 24 funktionale Dimere bilden [31]. Integrine sind von zentraler Bedeutung für die Interaktion der Zellen mit der sie umgebenden Matrix. Auf der Zytoplasma Seite sind sie mit dem Zytoskelett verbunden, auf der Zelloberfläche mit Bestandteilen der die Zellen umgebenden extrazellulären Matrix und „integrieren“ die Zellen somit in ihre Umgebung. In diesem Zusammenhang leiten die Integrine Informationen zur Zellumgebung, wie z.B. der Beschaffenheit der umgebenden Matrix oder der Stärke der Zelladhäsion, an die EZM ins Zellinnere

weiter (outside-in signaling) [127]. Darüber hinaus wird die Konformation und dadurch die Aktivität der Integrine durch interne zelluläre Stimuli beeinflusst (**Abb. 7**). Dieser Vorgang wird als inside-out signaling bezeichnet und kann u.a. zur veränderten Anhaftung der Integrine an die umgebende Matrix führen [39]. Durch diese Signalwege nehmen Integrine Einfluss auf Wundheilungsvorgänge wie die Adhäsion, Migration und die Proliferation.

**Tabelle 2:**

**Epidermale Integrine und ihre Liganden in der Basalmembran.** Der Wechsel vom ruhenden zum migratorischen Zustand der Keratinozyten geht mit einem veränderten Expressionsmuster der Integrine einher, der dynamische Wechselwirkungen mit der provisorischen Matrix ermöglicht. (verändert nach Kirfel and Herzog, 2004 [30]).

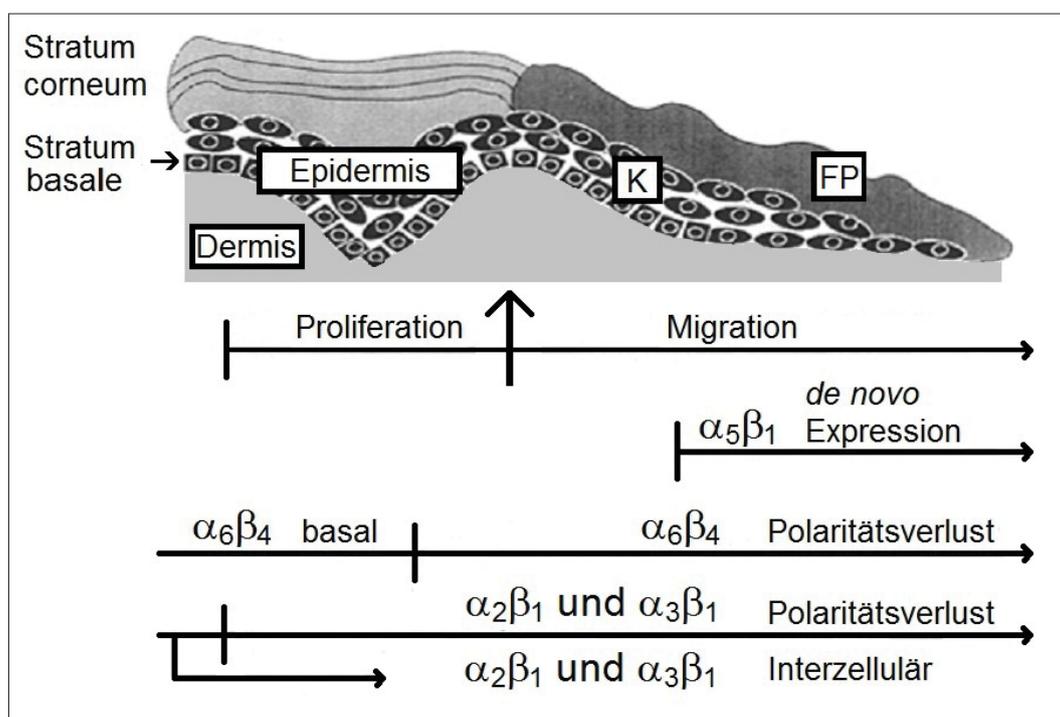
Integrin	EZM Ligand	Expression in Keratinozyten		Beteiligung an der Migration	Ref.
		ruhende	migrierende		
$\alpha_2\beta_1$	Kollagen	+	+	+	[42]
$\alpha_3\beta_1$	Laminin 5	+	+	+	[43,44]
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin	-	+	+	[45]
$\alpha_6\beta_4$	Laminin 5	+	-	-	[46]
$\alpha_v\beta_5$	Vitronectin	-	+	-	[47]
$\alpha_v\beta_6$	Vitronectin	-	+	-	[48]

Die Expression von Integrinen in der Epidermis beschränkt sich auf die basalen Keratinozyten. Die Integrindimere der Keratinozyten können unterteilt werden in solche, die das Monomer  $\beta_1$  enthalten oder in solche, die das Monomer  $\alpha_v$  enthalten wie auch das Integrin  $\alpha_6\beta_4$ . Während einige von ihnen konstitutiv exprimiert werden, werden andere nur während pathologischer Zustände oder während der Wundheilung exprimiert.

$\alpha_6\beta_4$  ist konstitutiver Bestandteil der Hemidesmosomen und vermittelt extrazellulär die Bindung der Keratinozyten an die Basalmembran durch den Kontakt zu Laminin-332. Intrazellulär stellt es den Kontakt zu den Intermediärfilamenten her.

Integrine, die das Monomer  $\beta_1$  enthalten, befinden sich basal (in sogenannten Cluster rings um die Hemidesmosomen) aber auch auf der apikolateralen Zellmembran. Sie sind intrazellulär mit dem Aktinzytoskelett verbunden. In Zellkultur sind sie für die Zellausbreitung auf dem Substrat verantwortlich.

Integrine, die das Monomer  $\alpha_v$  enthalten, binden meistens an das Vitronectin und werden zum Teil während der Wundheilung exprimiert [41]. Einen Überblick über die wichtigsten Integrine in der Epidermis und ihre Bedeutung für die Migration gibt **Tabelle 2**.

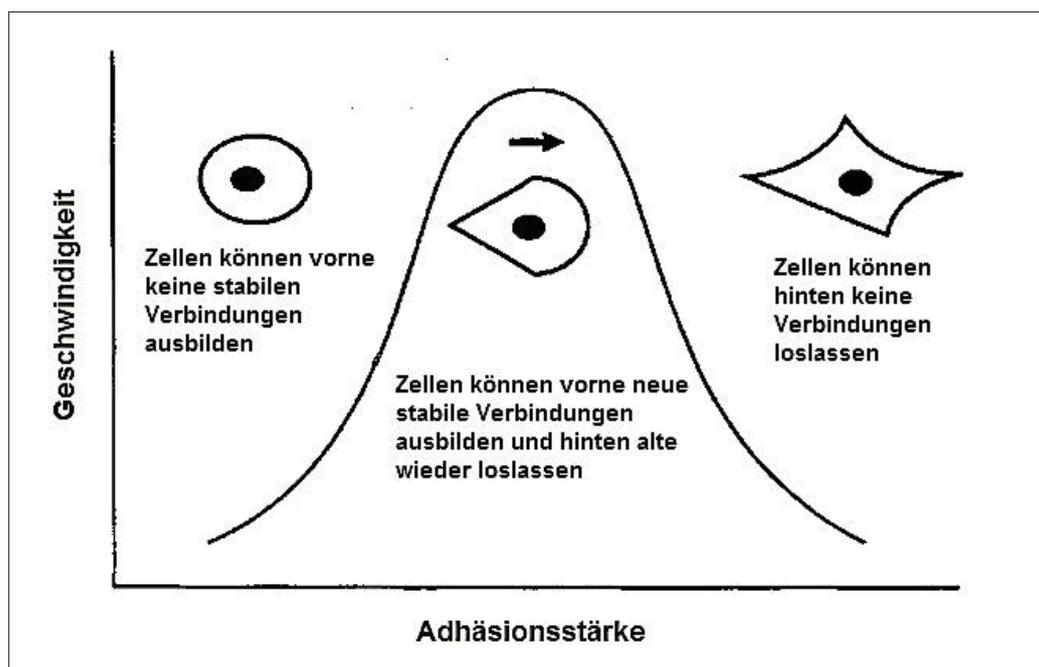


**Abb. 8**  
**Schematische Darstellung der epidermalen Wundheilung.** Proliferierende und migrierende Keratinozyten sind durch den schwarzen Pfeil getrennt. Keratinozyten (K) migrieren zwischen Fibrinpropf (FP) und Dermis. Die Veränderungen in der Expression von Integrinen werden ebenfalls dargestellt. (verändert nach Zambruno et al. 1995 [81])

Ein wichtiger Vorgang während der Re-Epithelisierung ist die Migration von Keratinozyten (s.a. **Kapitel 1.1**). Nach der Verwundung verändern basale Keratinozyten am Wundrand ihr kubisches Äußeres und werden flach und verlängert. Hemidesmosomen werden in die Zelle internalisiert und Zell-Zell Verbindungen werden dadurch gelöst [49]. Für den komplexen Vorgang der epithelialen Migration werden einige Integrine *de novo* synthetisiert (z.B.  $\alpha_5\beta_1$ ), andere wiederum verlieren ihre Polarität (z.B. das  $\alpha_6\beta_4$ , das vorher ausschließlich basal nun auch apikal exprimiert wird). Eine dritte Möglichkeit liegt in einer veränderten Lokalisation der Integrine. So werden  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$  nicht mehr an der basalen Seite der Zellen präsentiert sondern werden internalisiert.

Der Vorgang der Migration an sich findet wie im Folgenden beschrieben statt. Keratinozyten bilden dünne Membranprotrusionen (Filopodien) in Migrationsrichtung aus. Unter den Filopodien kommt es punktuell zur Konzentration von Integrinmolekülen. Sie entwickeln sich weiter zu punktförmigen lokalen Adhäsionsstellen sogenannte Fokale Komplexe (focal complexes; FC). Zur Entwicklung dieser Komplexe gehört anfangs Phosphotyrosin dann Talin und Paxillin. Später treten Vinculin und die Fokale Adhäsions-Kinase (focal adhesion kinase) (FAK) dem sich entwickelnden FC bei [128]. Mit der Zeit wachsen die FC unter Beteiligung einer Vielzahl an Faktoren (u.a. Zyxin,  $\alpha$ -Aktinin und Tensin unter Einfluss der Rho-GTPase) zu größeren Gebilden, den sogenannten Fokalen Adhäsionen (focal adhesions; FA), heran [104,129,130]. Auf der Zytoplasmaseite sind die FA mit den Aktinfilamenten verbunden. An diesen stabilen Zell-Matrix Verbindungen kommt es unter Beteiligung von FAK zur Ausbildung von Zugkräften [132]. Unter dem Einfluss dieser Zugkräfte kommt es zur Polarisation der Zelle [131]. Während die untere Zellmembran fest am Substrat fixiert ist, gleitet der Zellkörper über die vorderen FA, während die hinteren FA abgebaut werden [51]. Der Abbau kann auf vielen Wegen erfolgen: Zunächst wird entweder intrazellulär die Verbindung zum Zytoskelett oder extrazellulär zum Ligand unterbrochen. Danach können Integrine, zum Teil als Komplex mit Ligand, internalisiert werden. Im anderen Fall werden an der apikalen Seite der Keratinozyten Membranbereiche als Makroaggregate abgeschnürt und als solche zurückgelassen [30]. Diese Überreste können als Migrationsspur hinter den Zellen sichtbar gemacht werden. Die Migrationsspuren dienen *in vitro* und wahrscheinlich auch *in vivo* als Richtungsweiser für nachfolgende Zellen [56-57,74-76].

Eine ausreichende Adhäsion ist Voraussetzung für die Migration und wirkt regulatorisch auf die Migrationsgeschwindigkeit. Die Adhäsionsstärke ihrerseits nimmt mit erhöhter Ligandkonzentration, Integrinexpression und Integrinaffinität proportional zu [53]. Bei einer niedrigen Adhäsion können die vorderen Zellen keine stabilen Verbindungen zum Substrat ausbilden, um so ausreichend hohe Zugkräfte für die Migration aufzubauen. Bei einer hohen Adhäsion sind Verbindungen am hinteren Ende sehr stark und deren langsames Ablösen senkt die Geschwindigkeit ab. (**Abb. 9**) [52,53].



**Abb. 9**  
**Die Adhäsionsstärke reguliert die Migrationsgeschwindigkeit.** (verändert nach Palecek et al., 1999 [52])

Neben der Migration einzelner Zellen können Epithelzellen *in vitro* in großen Gruppen oder als Zellverbände migrieren. In dieser kollektiven Migration werden Aktinfilamente in einer solchen Weise angeordnet, dass der gesamte Zellverband als kontraktiler Körper funktioniert. Die Zellen am vorderen Rand bilden Filopodien aus und unter dieser Filopodien entstehen FA. Die Zellen in den mittleren und hinteren Bereichen des Zellverbandes werden im Wesentlichen hinter den fortschreitenden Zellen hergezogen [58]. Während der kollektiven Bewegung der Zellen, scheinen die Integrine  $\alpha_2\beta_1$  und  $\alpha_3\beta_1$  eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zell-Zell Adhäsion zu spielen und vielleicht auch bei der Koordination der Bewegung [59].

## 2 Fragestellung

Bei der Behandlung von chronischen Wunden ist wiederholt gezeigt worden, dass die Therapie mit lebenden Larven der Spezies *Lucilia sericata* einen positiven Effekt auf die Wundheilung ausüben kann. Die Therapie mit lebenden Maden weist allerdings eine Reihe von Nachteilen auf.

Darüber hinaus gibt es auch Hinweise, dass native Sekretions- bzw. Exkretionsprodukte von *Lucilia sericata* Larven bzw. einzelne chemische Komponenten ebenfalls einen positiven Einfluss auf die kutane Wundheilung ausüben können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, beide Ansätze zu kombinieren und eine möglichst weitgehende systematische Untersuchung von Extrakten der gesamten Larve von *Lucilia sericata* hinsichtlich ihres Einfluss auf die Wundheilung durchzuführen. Aufgrund der Sterilität des Extraktes bietet dieser viele Vorteile im Vergleich zur Lebendmadentherapie bei der Anwendung im klinischen Bereich.

Im Fokus der Arbeit sollte der Einfluss des Extraktes auf die zwei wichtigsten Zelltypen der Haut stehen: Fibroblasten und Keratinozyten. Ihnen fallen die entscheidenden Prozesse bei der Wundheilung zu. Nach einer proliferativen Phase folgt die feinregulierte Adhäsion der neu generierten Zellen an die provisorische Wundmatrix und der anschließenden Wanderung der Zellen in Richtung Wundmitte, um den Wundverschluss zu erreichen.

Zunächst sollten diese drei, die Wundheilung bestimmenden Vorgänge, getrennt voneinander in Monolayerkulturen von Keratinozyten und Fibroblasten untersucht werden.

In einer zweiten Phase sollten die Ergebnisse in einem dreidimensionalen Vollhautmodell, das näher der *in vivo* Situation anzusiedeln ist, verifiziert werden. Das Phenion® Full-Thickness Skin Model, das über eine Epidermis und Dermis verfügt, erlaubt die gleichzeitige Untersuchung aller zuvor erwähnten

wundheilungsrelevanten Parameter. Zusätzlich ermöglicht es die Wechselwirkungen zwischen den beiden Hautkompartimenten Epidermis und Dermis zu adressieren. Um das Hautmodell entsprechend einsetzen zu können, musste ergänzend eine hoch reproduzierbare Verwundungsmethode etabliert werden, die beide Kompartimente des Hautmodells betrifft. Dabei sollte die Methode eine solche Wundgröße erzeugen, dass die Wundschließung genug Zeit in Anspruch nimmt, um Unterschiede zwischen Extrakt und Kontrollen sichtbar zu machen und die gleichzeitig eine topische Extraktapplikation (gleich der *in vivo* Situation) erlaubt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1 Extrakte aus *Lucilia sericata*

Die Extrakte wurden von der Firma Alpha-Biocare GmbH gemäß Patent (EP1827465 18.10.2007 - PRÄPARAT AUS DIPTEREN-PUPPEN ZUR BEHANDLUNG VON WUNDEN) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Der Herstellungsprozess lässt sich wie folgt beschreiben:

Die Eiablage von Fliegen der Art *Lucilia sericata* sowie die Aufzucht der Larven - bis zur Verpuppung- erfolgten auf Pferdefleisch. Die frischverpuppten Larven wurden gewaschen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die so gewonnenen Puppen wurden ca. ein Jahr lang gesammelt. Für die Herstellung der Extrakte wurden Puppen mit Reinstwasser gemischt und homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 min auf über 56°C erhitzt und anschließend über verschiedene Filtrationsstufen klärend filtriert. Danach wurde das Feinfiltrat steril filtriert und für die speziellen Versuchszwecke in 25 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen aliquotiert und lyophilisiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Lyophilisat bei -80°C gelagert.

Für die Versuche wurden die Aliquote auf das ursprüngliche Volumen mit Reinstwasser resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) gemäß Herstellerangaben gemessen.

##### 3.1.2 Zellkulturmedien

für Fibroblasten (für Monolayer-Versuche):

DMEM, High Glucose, GlutaMAX™	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
FOETAL BOVINE SERUM (10% v/v )	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin G (100 IU/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Streptomycin (100 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

für Fibroblasten (Vollhautmodell-Anzucht):

DMEM, High Glucose, GlutaMAX™	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
FOETAL BOVINE SERUM (10% v/v )	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

## Material und Methoden

Ascorbyl-2-phosphat (1 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin G (100 IU/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Streptomycin (100 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

für Keratinozyten (serumhaltig) (für die Isolation aus Biopsien und die Vollhautmodell-Anzucht):

DMEM, High Glucose, GlutaMAX™ (3:1 Verhältnis zum HAM F12)	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
HAM F12	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
Adenine (24,3 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ascorbyl-2-phosphat (1 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Choleratoxin ( $10^{-10}$ M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EGF (10 ng/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fetal Clone II (Hyclone) (10% v/v)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hydrocortisone (0,4 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Insulin (0,12 IU/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Triiodo-L-Thyronine ( $2 \times 10^{-9}$ M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin G (100 IU/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Streptomycin (100 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

für Keratinozyten (serumfrei) (für Monolayer Versuche)

EpiLife® Medium mit 60 µM Calcium	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
Human Keratinocyte Growth Supplement (1% v/v)	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
Penicillin G (100 IU/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Streptomycin (100 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

für Vollhautmodell (ALI-Phase):

DMEM, High Glucose, GlutaMAX™ (3:1 Verhältnis zum HAM F12)	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
HAM F12	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
Ascorbyl-2-phosphat (1 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hydrocortisone (0,4 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Insulin (0,12 IU/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

	Deutschland
Bovine Serum Albumin - Fraction V (BSA) (1,6 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin G (100 IU/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Streptomycin (100 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### 3.1.3 Chemikalien, Kits, Verbrauchsmaterial

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
4',6- Diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Accutase®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Antibody Diluent	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Blotting-Grade Blocker (Non fat dry milk)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin - Fraction V (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Collagen Type I, rat tail	Merck Millipore, Billerica, USA
Collagen, Type IV, human placenta	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Crystal Violet	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK
Eosin G- Lösung (0,5% w/v wässrig)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol abs.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fibronectin, Cellular, from human foreskin fibroblasts	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH,

## Material und Methoden

	Hamburg, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
HEPES Buffer Solution 1M	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Keratinocyte Growth Factor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kollagenase (aus <i>Clostridium histolyticum</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Mayer Hämatoxylin-Lösung (1 g/l wässrig)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Mitomycin C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
Poly-D-lysine Hydrobromide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Protein Block, Serum-Free	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Roti®-Histofix (Formaldehydlösung, 4% w/v, säurefrei (pH7) - phosphatgepuffert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histokitt (Einschlussmittel)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Plast (Paraffin, ohne DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
Thermolysin (aus <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> <i>rokko</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (TRIS-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA)	Life Technologies GmbH, Paisley, UK

## Material und Methoden

TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ziegenserum (normal goat serum)	Life Technologies GmbH, Paisley, UK

Kit	Hersteller
Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Amersham, Hyperfilm, ECL, Chemiluminescence Film	GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK
C-Chip Neubauer improved	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
Cell Culture-Inserts (Cat. No. 80209)	Ibidi® GmbH, Martinsried, Deutschland
Deckgläser für die Mikroskopie	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gefäß für Objektträger (Färbetrog)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
iBlot® Transfer Stack, Mini (Nitrocellulose)	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
NALGENE® 5100 Kryobehälter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Nunc Kryoröhrchen (1,8 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1,0 mm, 12 Well	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
Rotilabo®-Einbettkassetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stift für die Umrandung von Gewebeschnitten (DAKO Pen)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
SuperFrost® Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zellkultur Mikroplatte (96-Loch) CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur Multiwell Platte (6-Loch) CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb (Cell Strainer, 70 µm, white)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

### 3.1.4 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage	AG 204	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Autoklav	Varioklav 400 EP-Z	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Blockthermostat	HLC HBT-130	HLC - Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Brutschrank	CB210	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Electrophoresis Power Supply	EPS 601	GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK
Entwicklungs- maschine für Filme	CURIX 60	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgium
Flachbettscanner	Perfection V750 Pro	Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan
Gel Transfer Apparatur	iBlot® Gel Transfer Device	Life Technologies GmbH, Paisley, UK
Gewebeinfiltrationsau- tomat	ASP 300	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Laborwaage	PG802-S	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Mikroskop (Invertoskop, Phasenkontrast, Fluoreszenz)	DMIRB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifuge	5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotom	Histoslide 200 SM2000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Paraffin Einbettungs- Station	EG1140H	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Paraffinstrecktisch	HI1220	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Plattformschüttler	Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
pH-Meter	765	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Reinraumwerk-bank	Holten Lamin Air	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Reinstwasseranlage	Synergy 185	Merck Millipore, Billerica, USA
Spektrophotometer	SPECTRAMax® PLUS <sup>384</sup>	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
Taumelnder Plattformschüttler	1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Vakuumpumpe	Vacunsafe	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Vibrationsschüttler	Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3SR Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Charakteristika der verwendeten Zellen

#### HDF - humane dermale Fibroblasten

HDF Zellen sind humane Hautfibroblasten, die von Präputien 0-4jähriger Jungen kaukasischen Hauttyps stammen und bei Zirkumzisionen gewonnen wurden.

#### HDEK – humane Keratinozyten

HDEK Zellen sind humane Hautkeratinozyten, die von Präputien 0-4jähriger Jungen des kaukasischen Hauttyps stammen und bei Zirkumzisionen gewonnen wurden.

#### Feeder

Feeder Zellen wurden aus humanen Hautfibroblasten gewonnen (Passage 4-6), die mit Mitomycin C, das die weitere Teilung der Zellen unterbindet, behandelt wurden. Sie dienten der Anzucht primärer humaner Keratinozyten aus Zirkumzisionen.

### 3.2.2 Isolation von Keratinozyten aus Biopsien

Die zur Isolation der Zellen verwendeten Biopsien stammten aus Kliniken in Köln (Praxisklinik Dr. Ulus) und Krefeld (Praxisklinik Dr. Fischer).

Zuerst wurden die Biopsien in 70% v/v Ethanol für 1 min gewaschen. Sie wurden anschließend dreimal in sterilem PBS zuzüglich 500 IU/ml Penicillin G und 500 µg/ml Streptomycin für je 1 min gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Fettgewebe mit einem Skalpell großzügig entfernt und die Haut in kleine Stückchen geschnitten. Die Hautstückchen wurden auf eine Petrischale mit der Epidermis nach oben gelegt. Eine Thermolysinlösung (0,05% w/v in HEPES-Puffer 0,01 M) wurde in die Petrischale zugegeben, jedoch ohne die Biopsiestückchen vollständig zu bedecken. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Epidermis von der Dermis separiert. Die Epidermis wurde in 20 ml einer bei 37°C vorgewärmten Trypsin/EDTA Lösung für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von serumhaltigem Keratinozytenmedium gestoppt. Nach Resuspension und Zentrifugation (10 min bei 110 g) wurde die Anzahl primären Keratinozyten in einer Zählkammer bestimmt.

### 3.2.3 Expansion von Keratinozyten

Die Keratinozyten wurden in mit Feederlayer besetzten Kulturflaschen in serumhaltigem Keratinozytenmedium eingesät (bis zu  $4 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>). Die Flaschen wurden im Brutschrank in einer wasserdampfgesättigten, auf 37°C temperierten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen in den ersten 48 Stunden nicht bewegt wurden und anschließend alle zwei Tage frisches Medium erhielten.

### 3.2.4 Kryokonservierung von Keratinozyten

Nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz wurden durch eine 2-3 minütige Trypsin/EDTA Inkubation und unter Mikroskop-Kontrolle zunächst die Feederzellen abgelöst und abgesaugt. Durch erneute Trypsin/EDTA Zugabe und Inkubation wurden die Keratinozyten abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellsuspension anschließend bei 110 g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (serumhaltiges Keratinozytenmedium und 10% v/v DMSO) wiederaufgenommen und mit einer Dichte von ca.  $3 \times 10^6$  Zellen/ml in speziellen Kryoröhrchen in einem Kryobehälter zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.2.5 Kultivierung von Keratinozyten

Die Zellen wurden schnell aufgetaut und in serumfreiem Keratinozytenmedium weiterkultiviert. Nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz wurden die Zellen durch eine 10-15 minütige Accutase-Inkubation abgelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert, resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder Lochplatten überführt. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 2 bis 5 verwendet.

### 3.2.6 Isolation von Fibroblasten aus Biopsien

Die von der Epidermis separierten Dermisstücke wurden mit Hilfe von Schere und Pinzette möglichst klein zerteilt und in ein Zentrifugenröhrchen mit 40 ml

Kollagenase-Lösung (0,2 U/ml) in DMEM transferiert. Die Suspension wurde für 3-4 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Zellsuspension mit einer Pipette durchmischt. Die entstandene Zellsuspension wurde mittels eines Zellsiebes mit 70 µm Maschengröße von Verunreinigungen befreit, bei 110 g 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in Fibroblastenmedium aufgenommen.

### 3.2.7 Expansion von Fibroblasten

Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Aussaat von bis zu  $4 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Kulturflaschen. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen in den ersten 48 Stunden nicht bewegt wurden und anschließend alle zwei Tage frisches Medium erhielten.

### 3.2.8 Kryokonservierung von Fibroblasten

Nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz wurden durch eine 2-3 minütige Trypsin/EDTA Inkubation und unter Mikroskop-Kontrolle die Fibroblasten abgelöst. Die Trypsin-Aktivität wurde durch Zugabe von Fibroblastenmedium gestoppt, anschließend wurde bei 110 g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (50% Fibroblastenmedium, 40% Fötales Rinderserum und 10% DMSO) wiederaufgenommen und mit einer Dichte von ca.  $3 \times 10^6$  Zellen/ml in speziellen Kryoröhrchen in einem Kryobehälter zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.2.9 Kultivierung von Fibroblasten

Die Zellen wurden schnell aufgetaut und in Fibroblastenmedium weiterkultiviert. Nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz wurden durch eine 2-4 minütige Trypsin/EDTA Inkubation die Zellen abgelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert, resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder Lochplatten überführt. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 2 bis 5 verwendet.

### 3.2.10 Vitalitätsbestimmung von Zellen

Der Einfluss der Extrakte auf die Vitalität wurde anhand des MTT-Tests untersucht. Grundlage dieser Analyse ist, dass das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden, metabolisch aktiven Zellen durch eine mitochondriale Dehydrogenase in ein blaues, unlösliches Formazansalz umgewandelt wird, dessen Absorption, als Maß für die Vitalität der Zellen, photometrisch bestimmt werden kann.

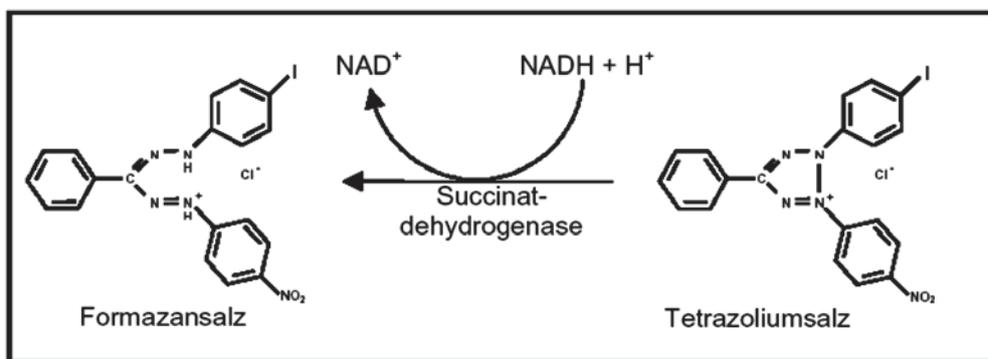


Abb. 10

**Prinzip des MTT-Tests:** Bildung von Formazansalz als Parameter für die Vitalität von Zellen.

Der Test wurde in 96-Loch Platten folgendermaßen durchgeführt:

Zur Aufnahme des Tetrazoliumsalzes wurde das Inkubationsmedium zunächst vorsichtig entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dies wurde nötig, da, wie in Vorversuchen beobachtet werden könnte, der Extrakt allein das MTT umsetzen kann. Die Zellen wurden anschließend mit einer MTT-Lösung (0,5 mg/ml) in Versuchsmedium für 30-60 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Aufnahme in die Zelle wird das Tetrazoliumsalz von einer mitochondrialen Succinatdehydrogenase unter Verbrauch von NADH+H<sup>+</sup> chemisch modifiziert. Es werden von dem Enzym Wasserstoffionen auf das Tetrazoliumsalz übertragen, wodurch der Tetrazoliumring gespalten wird und ein blaues, unlösliches Formazansalz entsteht (s.a. **Abb. 10**). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das MTT-haltige Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit DMSO solubilisiert. Das in DMSO gelöste Formazan wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm quantifiziert. Der Nullabgleich erfolgte dabei

durch Messung von reinem DMSO. Die Vitalität behandelter Zellen wurde als Prozent der Formazan-Bildung im Vergleich mit der Formazan-Bildung unbehandelter Zellen bestimmt (**Abb. 11**).

$$\% \text{ Vitalität} = \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll-Zellen)}} \times 100$$

**Abb. 11**  
**Berechnung der Vitalität**

### 3.2.11 Proliferations-Test

Der Einfluss der Extrakte auf die Proliferation wurde mit dem BrdU-Test (Roche) untersucht. Grundlage dieser Analyse ist die Verwendung des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU), das durch proliferierende Zellen an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird und so mit Hilfe eines enzymmarkierten Antikörpers quantifizierbar wird.

Der Test wurde in 96-Loch Platten durchgeführt und lässt sich wie folgt beschreiben:

Zunächst erfolgte, durch Zugabe der BrdU-Markierungs-Lösung in das Inkubationsmedium und anschließender Inkubation (drei Stunden bei 37°C), der Einbau von 5-Brom-2-desoxyuridin in die DNA. Anschließend wurden die Zellen mit einer alkoholischen Lösung auf der Wachstumsfläche fixiert und gleichzeitig permeabilisiert (Raumtemperatur für 30 min). Danach wurde ein mit einer Peroxidase gekoppelter anti-BrdU-Antikörper zugegeben (Raumtemperatur für 60 min) und anschließend, nach mehrmaligem Waschen, eine Substratlösung (tetramethyl-benzidine) addiert. Das Substrat wurde durch die Peroxidase umgesetzt. Die dabei entstehende Farbentwicklung wurde (nach 4min bei HDF und 3 min bei HDEK) spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 370 nm mit einer Referenzwellenlänge von 492 nm quantifiziert. Der Nullabgleich erfolgte durch Messung von reinem Substrat ohne Peroxidase. Die proliferativen Effekte einer Behandlung wurden als Prozent der optischen Dichte der behandelten Zellen, verglichen mit der optischen Dichte unbehandelter Zellen, bestimmt (**Abb. 12**).

$$\% \text{ Proliferation} = \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll-Zellen)}} \times 100$$

**Abb. 12**  
**Berechnung der Proliferation**

### 3.2.12 Bestimmung der Zelladhäsion

Der Einfluss der Extrakte auf die Zelladhäsion wurde mit dem Kristallviolett-Adhäsions-Test untersucht. Grundlage dieser Analyse ist die Fähigkeit von Zellen an verschiedene Substrate unterschiedlich zu binden. Die Zellen wurden in Kavitäten einer Zellkulturplatte eingesät, die zuvor mit den (wundheilungsrelevanten) extrazellulären Matrix-Molekülen Fibronectin, Kollagen I und Kollagen IV beschichtet wurden. Adhärenente Zellen werden mit Kristalviolett gefärbt. Die Absorbptionsunterschiede zwischen den Kavitäten geben Unterschiede im Adhäsionsverhalten wieder. Der Test wurde in 96-Loch Platten durchgeführt und lässt sich wie folgt beschreiben:

Kavitäten von 96-Loch Platten wurden mit folgenden Substraten vorbehandelt:

Poly-D-Lysin (5 min bei Raumtemperatur) (12,66 µg/ml, 50 µl/Kavität)  
 Fibronectin (1 Stunde bei Raumtemperatur) (10 µg/ml, 50 µl/Kavität)  
 Kollagen I (1 Stunde bei Raumtemperatur) (63,3 µg/ml, 50 µl/Kavität)  
 Kollagen IV (über Nacht bei 4°C) (10 µg/ml, 50 µl/Kavität)

Die Kavitäten hatten eine Grundfläche von 0,3165 cm<sup>2</sup>.

Anschließend wurden alle Kavitäten mit Bovinem Serum Albumin (10 mg/ml, 50 µl/Kavität) für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt, um unspezifische Bindungen zu blockieren.

Die Zellen wurden in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert und behandelt. Für Kontrollen und Behandlungen wurde je eine Flasche angesetzt. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend von den Flaschen wie oben beschrieben abgelöst. 30.000 Zellen pro Kavität wurden in eine zuvor beschichtete 96-Loch Platte eingesät. Die Platten wurden im Brutschrank für

30 min inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Kavitäten (mittels serologischer Pipette) mit PBS gewaschen. Adhärenz Zellen wurden auf der Wachstumsfläche fixiert (30 min, Ethanol 70% v/v), das Ethanol abgezogen und die Zellen mit einer wässrigen Kristallviolett Lösung (30% w/v) gefärbt. Nach 30 min Inkubation wurden die Loch Platten fünfmal mit Reinstwasser gewaschen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C getrocknet. Am nächsten Tag wurden in jede Kavität 50 µl Triton™ X-100 (0,02% v/v in Reinstwasser) pipettiert und 1 Stunde auf einem Plattenschüttler bei 500 rpm inkubiert. Zum Schluss wurden in jede Kavität 50 µl Isopropanol hinzu pipettiert und 10 min auf dem Plattenschüttler bei 500rpm inkubiert. Die Extinktion wurde spektrophotometrisch bei 590 nm bestimmt. Der Nullabgleich erfolgte durch Messung von 50 µl Triton™ X-100 zzgl. 50 µl Isopropanol ohne Zellen. Die Effekte einer Behandlung auf die Zelladhäsion wurden als Prozent der optischen Dichte der behandelten Zellen, verglichen mit der optischen Dichte unbehandelter Zellen, bestimmt (**Abb. 13**).

$$\% \text{ Adhäsion} = \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll-Zellen)}} \times 100$$

**Abb. 13**  
**Berechnung der Zelladhäsion**

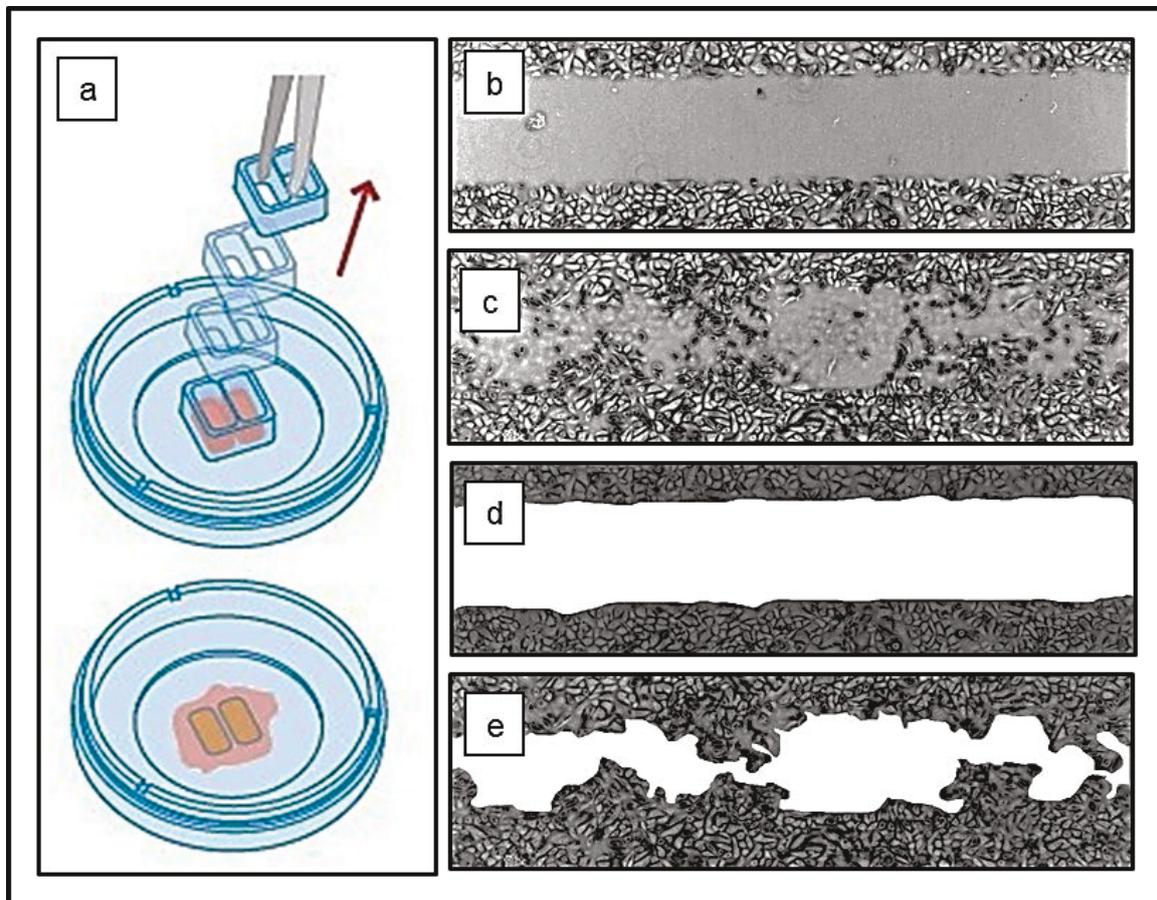
### 3.2.13 Bestimmung der Zellmigration

Der Einfluss der Extrakte auf die Zellmigration wurde mit einem Wundheilungs-Test untersucht. Grundlage dieser Analyse ist die Fähigkeit von adhärenz Zellen sich in eine vordefinierte zweidimensionale zellfreie Strecke zwischen zwei Monolayern (Wunde) hineinzubewegen. Unterschiede in ihrer Geschwindigkeit können durch Fotodokumentation und deren Analyse quantifiziert werden.

Der Test wurde in 6-Loch Platten durchgeführt und lässt sich wie folgt beschreiben:

Ein Insert (ibidi®) wurde gemäß Herstellerangaben in eine Kavität einer 6-Loch Platte plaziert. 15.000 Zellen (HDF oder HDEK) wurden in jede Kavität des Inserts eingesät. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert und nach Erreichen der

gewünschten Konfluenz (in der Regel am nächsten Tag) das Insert entfernt (**Abb. 14 a**).



**Abb. 14**

**Kultivierung von Zellen in einem ibidi® Insert.** Nach dessen Entfernen ist der Abstand zwischen den Monolayern immer gleich ( $500\ \mu\text{m}$ ) (**a**) [Quelle: ibidi.de]. Auf diese Weise kultivierte Keratinozyten wurden am Anfang (**b**) und am Ende des Versuches fotografiert (**c**). Mit Hilfe der Opensource Software ImageJ wurden die zellfreien Areale markiert (weiß) und deren Grundfläche berechnet (**d-e**).

Für einen Teil der Versuche wurde vor dem Einsetzen des Inserts der Boden der 6-Loch Platte mit Fibronectin beschichtet (Konzentration  $19,2\ \mu\text{g/ml}$ ,  $500\ \mu\text{l/Kavität}$ , 1 Stunde bei Raumtemperatur) ( $9,6\ \text{cm}^2$  Grundfläche einer Kavität). In diesem Fall wurde nach dem Ende des Versuches mittels Immunfluoreszenzfärbung überprüft, ob die Fibronectinbeschichtung beim Entfernen des Inserts beschädigt wurde (s.a. **Kapitel 3.2.19.2 Seite 54**).

Nach dem Entfernen des Inserts wurde die Kavität der 6-Loch Platte einmal mit Medium gewaschen und anschließend mit den verschiedenen Ansätzen im Brutschrank inkubiert. Mit einem Mikroskop (Leica) wurde der Raum zwischen den Zellmonolayern zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert (**Abb. 14 b, c**).

Markierungen auf dem Boden der Platte haben garantiert, dass immer derselbe Bereich zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert werden konnte. Anschließend wurden die Bilder mit Hilfe der Opensource Software ImageJ ausgewertet. Die zellfreien Areale wurden umrandet, (**Abb. 14 d, e**) und deren Grundfläche berechnet. Es wurden nur Zellen berücksichtigt, die sich innerhalb des migrierenden Zellverbandes befanden. Durch die Grundflächen am Anfang und am Ende des Versuches konnte die Zellmigration in Prozent berechnet werden (**Abb. 15**).

$$\% \text{ Zellmigration} = \frac{\text{Grundfläche (Anfang)} - \text{Grundfläche (Ende)}}{\text{Grundfläche (Anfang)}} \times 100$$

**Abb. 15**  
**Berechnung der Zellmigration**

### 3.2.14 Quantitative Protein Analyse

Für diese Analyse wurden Proteine im elektrischen Feld (in einem Gradienten-SDS-Gel) der Größe nach getrennt und anschließend durch spezifische Antikörper quantitativ nachgewiesen. Folgende Schritte wurden im Einzelnen durchgeführt:

Zellyse: NHEK oder HDF wurden bis zur Konfluenz (80-90%) in einer 6-Loch Platte kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgezogen und die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von eiskaltem Lysis-Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,2% v/v Triton™ X-100, 10% v/v Glycerol, pH 7,5 zzgl. Proteinase Inhibitor Cocktail). Die lysierten Zellen wurden in Reaktionsgefäße aufgenommen und auf Eis inkubiert (15 min). Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 4°C, 5 min) und Gesamtproteingehaltmessung (DC Protein Assay Kit, Bio-Rad) wurden die Lysate bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Denaturierende SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis): Die Proteine in den Zelllysaten wurden mittels Elektrophorese in einem SDS Gel aufgetrennt. Im SDS-PAGE wandern die Proteine auf Grund eines elektrischen Feldes durch ein dreidimensionales Netzwerk aus Acrylamid und Bis-Acrylamid. Dort werden sie bezüglich ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Dies wird durch den Zusatz des amphiphilen Detergenz SDS ermöglicht, das sich stöchiometrisch an die Proteine anlagert und Mizellen mit konstant negativer Ladung je Masseneinheit bildet. Bei der Probenvorbereitung wurden die Proteine mit einem Überschuss an SDS 10 min auf 70°C erhitzt und so die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zerstört. Zusätzlich wurden Schwefelbrücken zwischen Cysteinen durch Zugabe von Dithiothreitol aufgebrochen. Für die Elektrophorese wurde ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet: ein Bis-Tris-HCl Puffer (pH 6,4) im Gel (NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris gradienten Gel) und ein MOPS- Puffer (pH 7,7) als Elektrophorese Laufpuffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM MOPS, 0,1% SDS w/v). Jede Probe eines Gels hatte den gleichen Gesamtproteingehalt (7,5 µg).

### Protein Nachweis (Western Blot):

Nach der Trennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (blotting). Für den Transfer wurde eine „dryblotting“ Methode benutzt. Bei dieser Methode werden die Gele in einer iblot™ Apparatur zwischen zwei Elementen eines iblot™ Stapels platziert. Das untere Element besteht aus der Kupferanode und der Nitrozellulosemembran. Das Obere besteht aus der Kupferkathode und einem (mit Wasser durchfeuchteten) Filterpapier. Beide Elektroden enthalten ein Ionenreservoir, eingebettet in einer Gelmatrix. Die Übertragungszeit betrug, auf Grund der geringen Entfernung zwischen den Elektroden, die hohe Stromstärken für den Transfer ermöglichen, nur 7 min. Der Transfer wurde mittels Ponceau S (0,1% w/v) Färbung auf Gleichmäßigkeit überprüft. Die Nitrozellulosemembran wurde eine Stunde mit Blocking Puffer (TBS-T: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Tween® 20 zzgl. 5% w/v Blotting-Grade Blocker) geblockt und anschließend mit dem Primärantikörper (gelöst in Blocking Puffer) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde am nächsten Tag dreimal für je 15 min mit TBS-T gewaschen, für eine Stunde mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (gelöst in

Blocking Puffer) inkubiert und schließlich wieder dreimal für je 15 min mit TBS-T gewaschen.

Primärantikörper Antigen	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
GAPDH	Maus	1:20000	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
Integrin-β1	Kaninchen	1:2500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Integrin-β1	Maus	1:2000	Merck Millipore, Billerica, USA
Integrin-β1	Maus	1:7500	Merck Millipore, Billerica, USA

Sekundärantikörper	Konjugiert	Verdünnung	Hersteller
Ziege-Anti-Maus	Peroxidase	1:2500	Merck Millipore, Billerica, USA
Ziege-Anti-Kaninchen	Peroxidase	1:2500	Merck Millipore, Billerica, USA

**Abb. 16**  
**Western Blot Antikörper.**

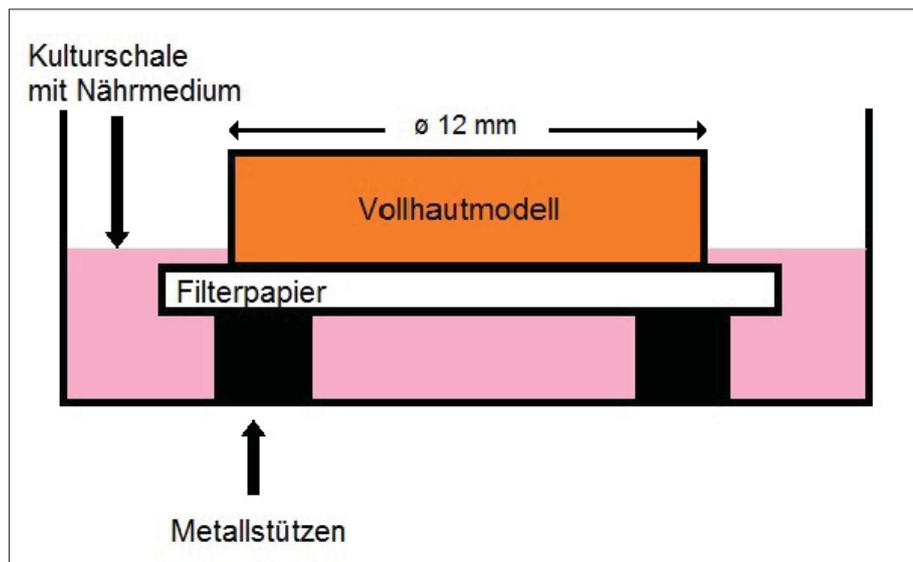
Zum Nachweis der Bindung wurden die beiden Nachweisreagenzien (Luminol-Lösung, Verstärker-Lösung; ECL Plus Western Blotting Detection Reagents) im Verhältnis 40:1 zusammengegeben und die Membran damit getränkt. In der Dunkelkammer wurde die Membran in Frischhaltefolie eingepackt und mit einem Chemilumineszenz-Film in eine Filmkassette gelegt. Der Film wurde je nach Antikörper verschieden lang exponiert und anschließend entwickelt und fixiert. Die Filme wurden gescannt und die Bilder mit Hilfe der Software TotalLab TL100 v2006c (TotalLab Ltd, Newcastle upon Tyne, UK) ausgewertet. Die eingesetzten Antikörper sind in **Abbildung 16** aufgelistet.

### Stripping und Reprobing:

Um die Antikörper wieder zu entfernen (Stripping), wurden die Membranen dreimal für je 10min mit kochend heißem Stripping Puffer (100 mM Glycine, pH 2) inkubiert. Die Membranen wurden anschließend fünfmal mit TBS-T gewaschen und eine Stunde mit Blocking Puffer inkubiert. Die Membranen wurden mit neuen Antikörpern wie oben beschrieben inkubiert (Reprobing).

### 3.2.15 Herstellungs- und Kultivierungsmethode des Phenion® Full-Thickness Skin Model (Vollhautmodell)

Hierbei handelt es sich um ein organotypisches *in vitro* Hautmodell, hergestellt von Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf, Deutschland. Das Vollhautmodell ist eingehend beschrieben und charakterisiert worden [67,68]. Es wird routinemäßig in einer Reihe von *in vitro* Studien verwendet [69-72]. Es besteht aus humanen Keratinozyten und Fibroblasten desselben Spenders.

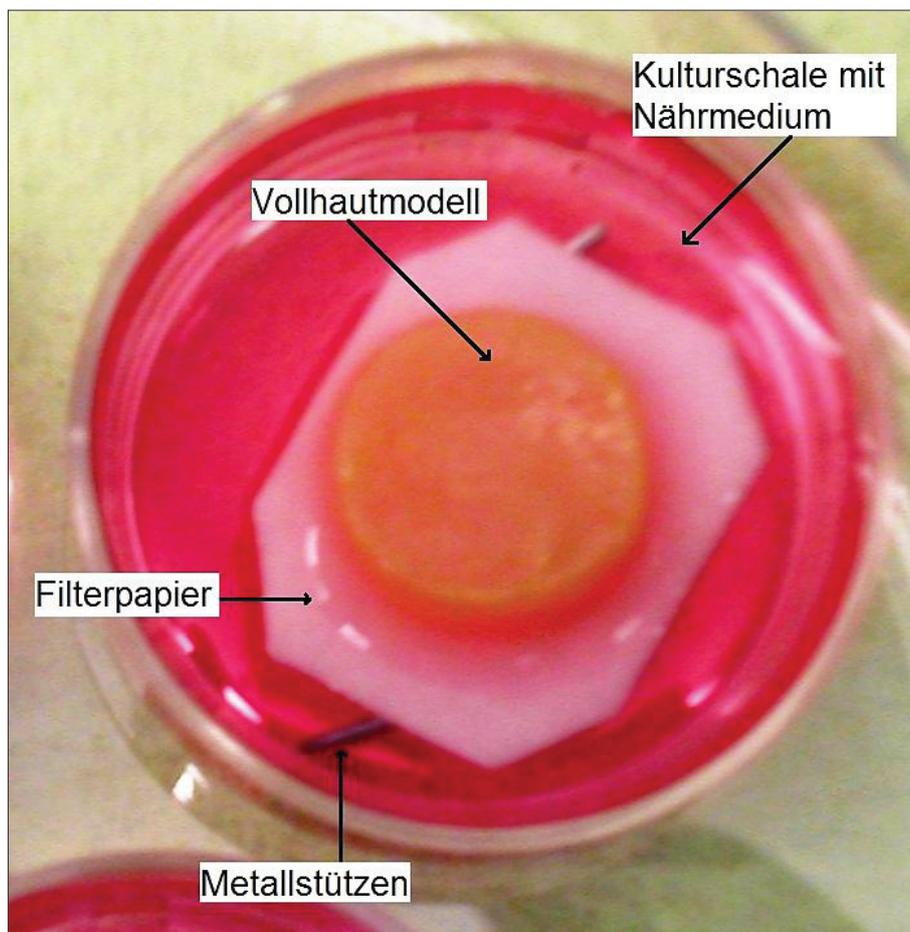


**Abb. 17**  
Kultivierung des Vollhautmodells in der ALI-Phase. Seitliche Ansicht im Schema.

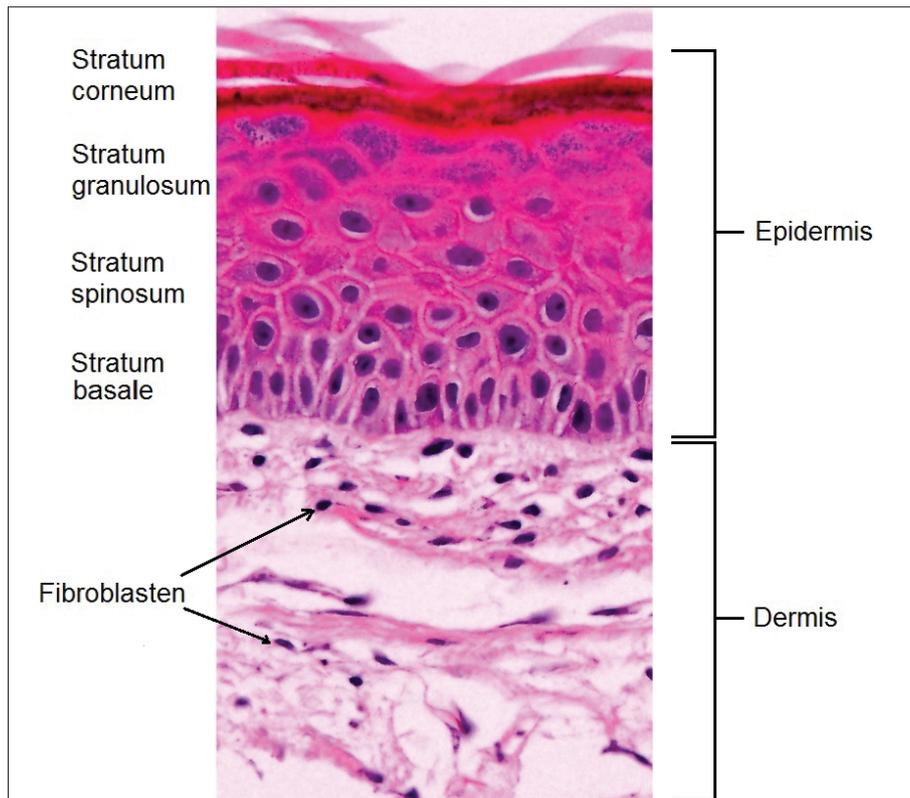
Alle Inkubationsschritte wurden auf einer 37°C temperierten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid im Brutschrank durchgeführt. Die Herstellung lässt sich wie folgt beschreiben: Humane Fibroblasten und Keratinozyten wurden aus Vorhautbiopsien isoliert (s.a. **Kapitel 3.2.2** und **3.2.6**). Während die Keratinozyten in mit Feeder-Zellen ausgesäten Flaschen im serumhaltigen Keratinozyten Medium bis Passage 3 propagiert wurden, wurden die Fibroblasten in Fibroblastenmedium (zzgl. Ascorbyl-2-phosphat) bis Passage 5 weiterkultiviert.

Für die Vollhautmodell Produktion wurden als erstes Fibroblasten in Fibroblastenmedium auf eine Matrix ausgesät. Diese Matrix bestand aus quervernetztem Kollagen und befand sich in einer Kavität einer 24-Loch Platte. Nach 2 wöchiger Inkubation wurden Keratinozyten über der -mittlerweile mit Fibroblasten kolonisierten- Matrix ausgesät und eine Woche lang mit

serumhaltigen Keratinozytenmedium weiterkultiviert. Nach dieser submersen Inkubationsphase wurden die Modelle auf Filterpapier platziert, die auf Metallstützen lagen und in der Luft-Flüssigkeits-Grenze (sog. „Air Liquid Interface“ od. ALI-Phase) für weitere 12 Tage inkubiert (**Abb. 17 und 18**). Nach dieser Zeit wiesen die Hautmodelle in Hämatoxylin-Eosin gefärbten histologischen Schnitten eine Unterteilung in Dermis und Epidermis auf. Die Epidermis wies zudem eine typische Ausdifferenzierung auf (**Abb. 19**). Die Wundheilungsversuche wurden mit auf diese Weise hergestellten Vollhautmodellen durchgeführt.



**Abb. 18**  
Kultivierung des Vollhautmodells in der ALI-Phase.



**Abb. 19**  
Hämatoxylin-Eosin gefärbter Querschnitt des Phenion® Full-Thickness Skin Models am 12. Tag der ALI-Phase.

### 3.2.16 Das dreidimensionale *in vitro* Wundheilungsmodell

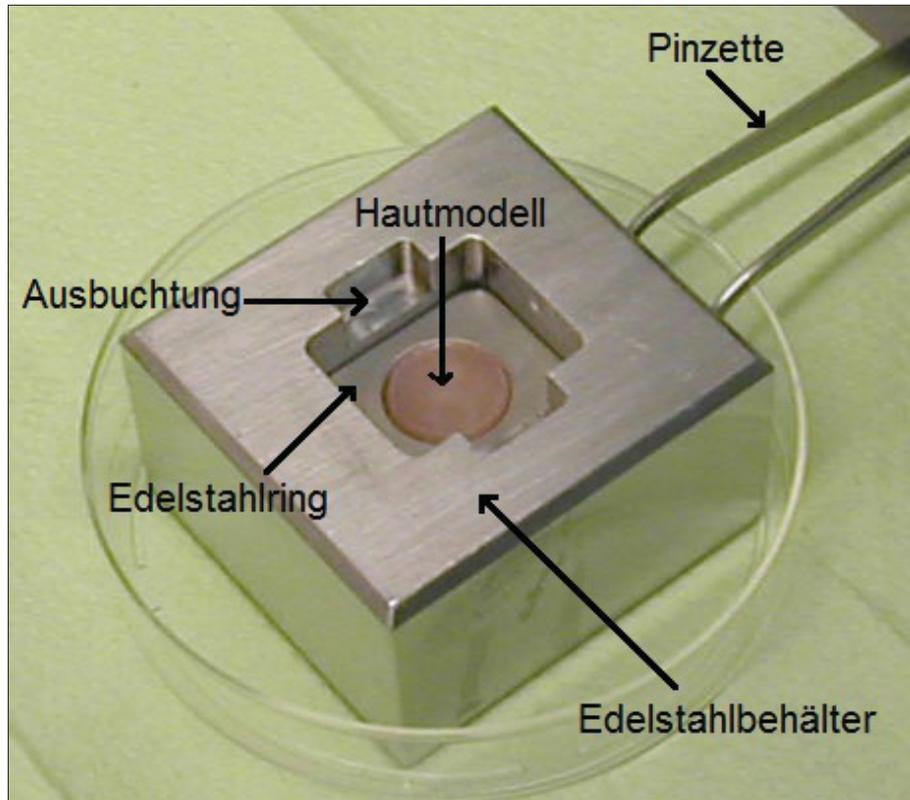
Es wurden insgesamt vier unterschiedliche Hautverwundungsmethoden etabliert. Die am besten geeignete wurde identifiziert und im weiteren als alleinige Methode eingesetzt:

- A. Inzision
- B. Exzision
- C. Hitzeeinwirkung
- D. Kälteverwundung

Alle Experimente zu den unterschiedlichen Verwundungsmethoden wurden am 12. Tag der ALI-Phase durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Hautmodelle mit Hilfe einer Edelstahlpinzette in einen Edelstahlring, der sich in einem

Edelstahlbehälter befand, platziert (**Abb. 20**). Ring und Behälter wurden speziell für diesen Zweck angefertigt.

Anschließend wurden die Wunden wie im Weiteren beschrieben gesetzt und markiert.



**Abb. 20**

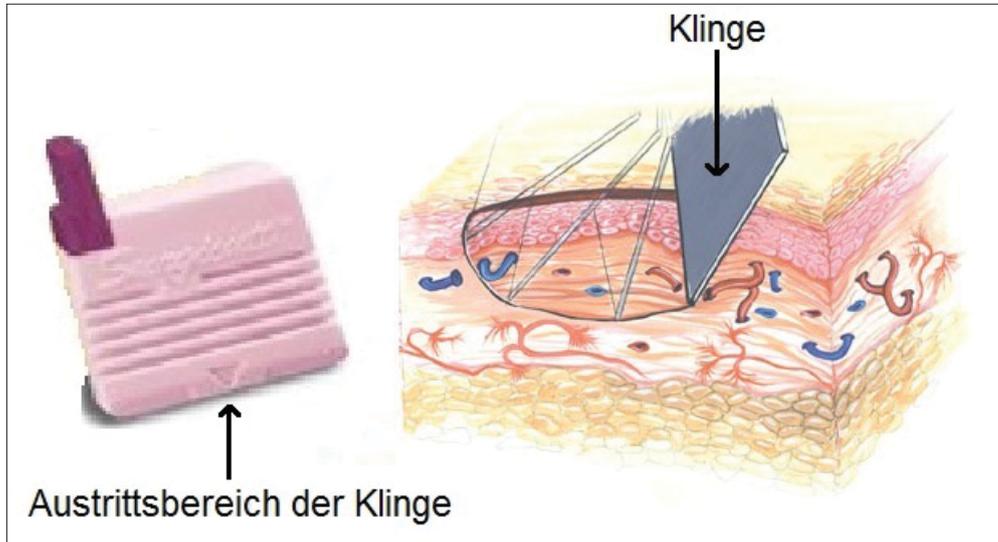
**Versuchsaufbau:** Das Hautmodell wurde in einen Edelstahlring platziert. Der Ring befand sich in einem Edelstahlbehälter.

### 3.2.16.1 Verwundungsmethoden

#### A. Inzision (Einschneiden)

Die Verwundung wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Einweginstruments durchgeführt (Surgicutt<sup>®</sup>, ITC, Edison, USA). Surgicutt<sup>®</sup> ist ein steriles, standardisiertes Einweginstrument, das einen 5mm langen und 1mm tiefen Schnitt zieht. Eine chirurgische Stahlklinge, die mit einer Druckfeder kombiniert ist, wird auf Knopfdruck aus einem geschlossenen Plastikgehäuse freigegeben und schnell anschließend sofort wieder zurück. Diese schnelle Bewegung führt die Verwundung durch (**Abb. 21**).

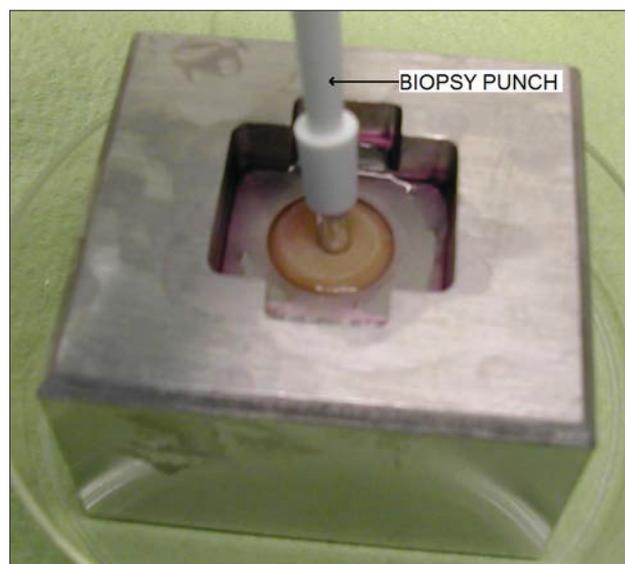
Im Rahmen der Vorarbeiten wurde das Surgicutt® auf die Ausbuchtungen des Edelstahlbehälters platziert (Abb. 20). Der Mechanismus wurde ausgelöst, und die Hautmodelle wurden durch die Klinge verwundet.



**Abb. 21**

**Inzision:** Das Einweginstrument Surgicutt® (links) wurde auf das Hautmodell platziert. Nach dem Auslösen des Mechanismus trat die Klinge an der unteren Seite heraus. Durch die schnelle halbkreisförmige Bewegung wurde das Hautmodell verwundet. Auf der rechten Seite ist die Verwundung auf der Haut schematisch dargestellt (Bilder Quelle: itcmed.com).

### B. Exzision (Ausschneiden)



**Abb. 22**

Hautmodellverwundung durch das BIOPSY PUNCH von STIEFEL®.

Die Verwundung wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Einweginstruments STIEFEL® BIOPSY PUNCH durchgeführt (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München, Deutschland). Das Instrument wurde auf die Mitte des Hautmodells platziert. Durch sanftes Drehen und Drücken wurde das BIOPSY PUNCH etwa 2 mm in das Hautmodell hineingeführt (**Abb. 22**). Mit Hilfe einer Edelstahlpinzette wurde ein zylindrisches Stück des Hautmodells (Biopsie) aufgenommen und entfernt. Eine Vertiefung mit dem Durchmesser des jeweils verwendeten Biopsie Instrumentes wurde sichtbar. Für die Versuche wurden BIOPSY PUNCH mit Durchmessern von 2, 4, und 6 mm verwendet. Ein Teil der Biopsien wurde in Formalin fixiert und einer histologischen Analyse unterzogen.

### C. Hitzeeinwirkung

#### 1. Verbrennung

Die Verbrennung wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen LötKolbens LUX® (Mod. Nr. 539405) (maximale Temperatur 370°C) (Emil Lux GmbH & Co. KG, Wermelskirchen, Deutschland) durchgeführt. Seine abgeflachte Spitze hatte die Dimensionen von 5x3 mm. Der LötKolben wurde ausreichend lang vorgeheizt und auf der flachen Seite auf das Hautmodell gesetzt und 12 sec lang auf die gleiche Stelle gehalten.

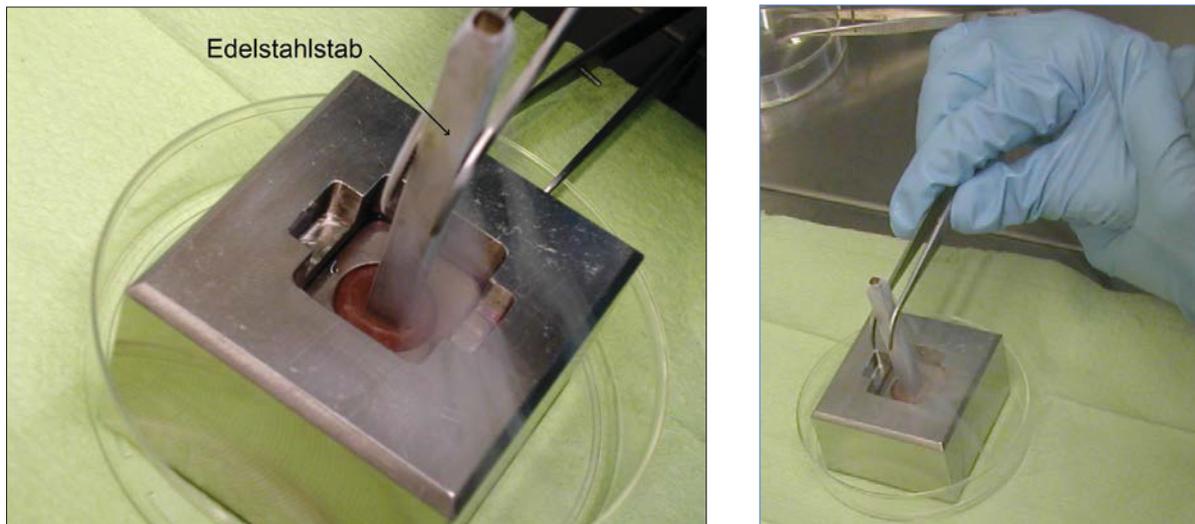
#### 2. Verbrühung

Die Verbrühung wurde mit Hilfe eines speziell angefertigten Edelstahlstabes, dessen Endstück ein Quadrat mit einer Kantenlänge von 6x6 mm war, durchgeführt. Der Stab wurde zunächst in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 90°C äquilibriert und anschließend mit Hilfe einer Edelstahlpinzette auf die Mitte des im Edelstahlbehälter befindlichen Modells platziert und 15 sec lang senkrecht ganz bis nach unten gedrückt (ähnlich **Abb. 23**).

### D. Kälteverwundung

Ein Edelstahlstab (s.o.) wurde in flüssigem Stickstoff bei -176°C äquilibriert. Mit Hilfe einer Edelstahlpinzette wurde der Stab auf die Mitte des im

Edelstahlbehälter befindlichen Modells platziert und senkrecht ganz bis nach unten gedrückt (**Abb. 23**).



**Abb. 23**  
**Kälteverwundung des Vollhautmodells:** Ein zuvor im flüssigen Stickstoff äquilibrierter Edelstahlstab wurde auf die Mitte des Hautmodells platziert und 15 sec lang bis ganz nach unten gedrückt.



**Abb. 24**  
Nach der Verwundung des Vollhautmodells ist eine quadratische Vereisungsstelle sichtbar.

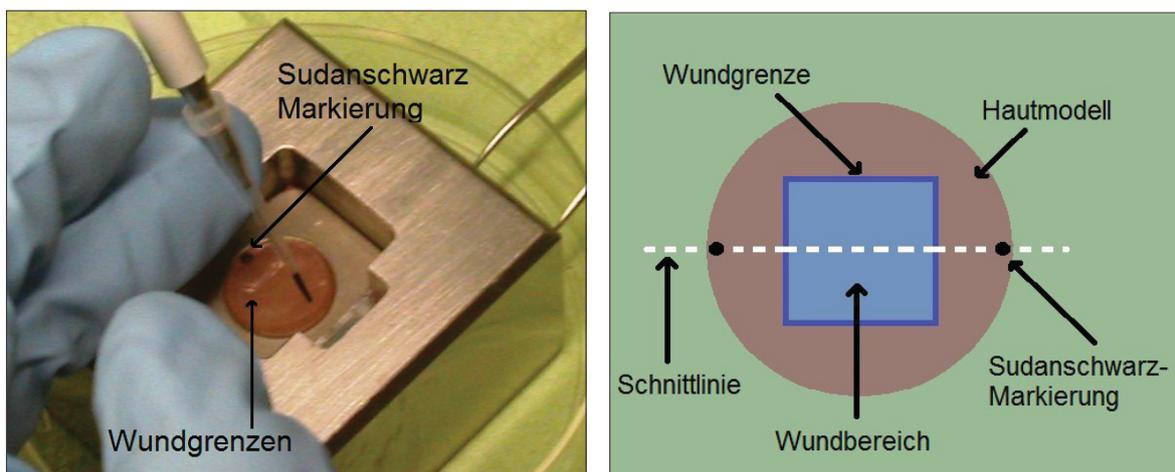
Nach 15 sec wurde der Stab abgehoben und wieder in den flüssigen Stickstoff getaucht. Das Hautmodell wies nach der Verwundung eine weiße

Vereisungsstelle auf, die sich in der Mitte befand und die Dimension des Stabes hatte (**Abb. 24**).

### 3.2.16.2 Markierung der Wunde

Für die dem Versuch anschließende Bearbeitung der Hautmodelle (Gewebefixierung, Paraffineinbettung, Anfertigung von Schnitten und histochemische Färbung) sowie der finalen Auswertung war es notwendig, die Ausrichtung der Wundfläche auch nach dem Versuch nachvollziehen zu können. Aus diesem Grund wurde die Wunde mit Hilfe von Sudanschwarz B direkt nach der Verwundung markiert (**Abb. 25**). Sudanschwarz ist ein Gewebefarbstoff, der in der Haut Keratine und Lipide färbt [73]. Der Farbstoff wurde sofort durch die Epidermis aufgenommen und blieb an gleicher Stelle für die gesamte Dauer des Versuches.

Zwei Markierungen wurden auf zwei entgegengesetzten Seiten der Wunde am Rand des Hautmodells pipettiert. Nach Versuchsende wurde das Hautmodell mit Hilfe eines Skalpell entlang der imaginären Linie zwischen den Markierungspunkten in zwei Hälften geschnitten und in einer Einbettkassette in Formaldehydlösung fixiert.



**Abb. 25**

**Markierung des Wundbereiches.** Nach der Verwundung des Vollhautmodells wurden je 0,5  $\mu$ l Tropfen einer Sudanschwarz Lösung an zwei entgegengesetzten Punkten am Hautmodellrand pipettiert (links). Entlang der Linie durch diese zwei Markierungen (die einen rechten Winkel zur Wundgrenze bildete) wurde das Hautmodell am Ende des Versuches in zwei Hälften geschnitten (rechts).

### 3.2.16.3 Behandlung und experimentelle Setups

#### Behandlung und Ansätze:

3 Stunden nach der Verwundung wurden die Modelle aus dem Brutschrank entnommen und mit dem Extrakt und den Kontrollen (Lösungsmittel oder BSA) behandelt. 20 µl von jeweils Extrakt oder Kontrollen wurden in die Mitte der Wunde pipettiert. Die Konzentrationen des Extraktes und des BSA betragen 1 mg Protein/ml. Die Behandlung wiederholte sich alle 24 Stunden über einen Zeitraum von 5 Tagen. Als weitere Kontrollen dienten Hautmodelle, die nicht mit Extrakt behandelt wurden, sowie Hautmodelle, die nicht verwundet und nicht behandelt wurden. Für alle Behandlungen und Kontrollen wurden jeweils 2 Modelle benutzt.

#### Experimentelle Setups:

Die Wirkung der Extrakte wurde mit Hilfe von zwei Setups untersucht, die sich hinsichtlich des Versuchszeitraums und der Probenahme unterschieden.

#### **Setup A** (kurzer Beobachtungszeitraum)

Probenentnahme:

Tag 1 bis 5    1. Woche

Tag 8        2. Woche

#### **Setup B** (langer Beobachtungszeitraum)

Probenentnahme:

Tag 1-3-5    1. Woche

Tag 8        2. Woche

Tag 15       3. Woche

### 3.2.17 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Vollhautmodelle wurden für mindestens 24 Stunden in Formaldehydlösung (4% w/v, Roti<sup>®</sup>-Histofix) fixiert bevor sie in Paraffin (Roti<sup>®</sup>-Plast) eingebettet wurden. Von den Proben wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger

(SuperFrost<sup>®</sup>) transferiert. Danach wurden die Paraffinschnitte über Nacht getrocknet, bevor sie am nächsten Tag für jeweils 10 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 2 min rehydriert wurden (100%, 100%, 96%, 70%, 50% v/v in Wasser).

Anschließend wurden die Schnitte entweder für die Hämatoxylin-Eosin Färbung (5 min in Reinstwasser) oder für die immunhistochemische Färbung (5 min in TBS-T) vorbereitet.

### 3.2.18 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die in Gefäßen mit Reinstwasser befindenden Objektträger (s. **3.2.18**) wurden zunächst in eine Mayer Hämatoxylin-Lösung für 5min getaucht. Anschließend wurden die Objektträger in Gefäßen unter fließendem Leitungswasser für 15 min gespült. Nach anschließendem kurzem Eintauchen in Reinstwasser (30 sec) wurden die Objektträger in einer Eosin G Lösung (zzgl. 1 Tropfen Eisessig pro 100 ml Lösung) für 3 min eingetaucht. Die Objektträger wurden für 5min in Reinstwasser gespült und anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96%, 100% v/v in Wasser) für je 2 min entwässert. Nach zweimaligen Eintauchen in Xylol-Gefäßen für jeweils 10 min wurden die Objektträger mit Roti<sup>®</sup>-Histokitt benetzt und mit Deckgläsern versehen.

### 3.2.19 Immunhistochemie

Unter Verwendung spezifischer Antikörper konnte die Expression ausgewählter Proteine qualitativ nachgewiesen werden. Dabei wurden primäre Antikörper, die an das spezifische Antigen binden, durch mit Fluorochromen gekoppelten sekundären Antikörper erkannt, wodurch die nachzuweisenden Antigene unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden konnten. Folgende Antigene wurden in Rahmen dieser Arbeit untersucht:

### 3.2.19.1 Nachweis von Ki67 und Berechnung der Proliferation

Das Ki67 wird der Zellproliferation zugeordnet, da es in Zellen detektiert wird, die in den G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- oder M-Phasen des Zellzyklus befinden und nicht in ruhende Zellen (G<sub>0</sub>-Phase).

Die sich in Gefäßen mit TBS-T befindenden Objektträger (s. **3.2.18**) wurden zunächst in Citrat-Puffer (0,01 M tri-Natriumcitrat-2-hydrat in Reinstwasser, pH 6,0) für 25 min in einem Wasserbad bei 95-99°C erhitzt. Die Objektträger wurden nach dem Abkühlen in TBS-T überführt. Die Schnitte wurden anschließend mit einem geeigneten Stift (DAKO Pen) umrandet, mit Blockierlösung (Ziegenserum 10% v/v, Triton™ X-100 0,1% v/v in TBS-T) bedeckt und 45min in einer geschlossenen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Blockieren der unspezifischen Bindungen folgte eine Inkubation über Nacht bei 5°C mit dem primären Antikörper (gelöst in Antibody Diluent, Dako) in einer feuchten Kammer. Als Kontrollen dienten Objektträger, die nur mit Antibody Diluent behandelt wurden. Nach viermaligem Waschen für je 15 min mit TBS-T wurden die Objektträger mit dem Sekundärantikörper (gelöst in Antibody Diluent, Dako) zzgl. 4',6- Diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid (DAPI), das doppelsträngige DNA färbt, in einer feuchten vor Licht geschützten Kammer für eine Stunde inkubiert. Die Objektträger wurden erneut viermal für je 15 min mit TBS-T gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit einem Tropfen Fluorescence Mounting Medium (Dako) fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die eingesetzten Antikörper sind in **Abbildung 26** aufgelistet.

Für die Auswertung wurden als erstes Fluoreszenzbilder mit den Extinktionsfiltern für DAPI und FITC aufgenommen und anschließend überlagert. Die Kerne von ruhenden Zellen erschienen Blau, alle anderen erschienen Grün. Um eine Maß für das Proliferationsvermögen der unterschiedlich behandelten Modelle zu erhalten, wurden über einen Bereich von 1000 µm die Zellen der Basalschicht, die nur mit DAPI oder auch mit Ki67 gefärbten waren, gezählt und in die folgende Formel eingepflegt:

$$\% \text{ Zellproliferation} = \frac{\text{Anzahl grüne Kerne}}{\text{Anzahl grüne Kerne} + \text{Anzahl blaue Kerne}} \times 100$$

Bei verwundeten Hautmodellen wurde die Bestimmung an der Migrationsspitze der neuen Epidermis begonnen und in Richtung Wund/Modellrand fortgesetzt:

Primärantikörper Antigen	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Ki67	Maus	1:10	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Sekundärantikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
Ziege-Anti-Maus	AlexaFluor 488 (FITC)	1:200	Life Technologies GmbH, Paisley, UK

**Abb. 26**  
Antikörper Immunhistochemie (Ki67)

### 3.2.19.2 Immunhistochemischer Nachweis von Fibronectin und Überprüfung der Fibronectinbeschichtung

Kavitäten von 6-Loch Platten wurden einmal mit PBS gewaschen und für 20 min mit Ethanol (70% v/v) fixiert. Anschließend wurde das Ethanol entfernt und die Kavitäten zweimal mit PBS gewaschen bevor sie mit der Blockierlösung (Protein Block, Dako) für 45 min inkubiert wurden. Anschließend wurde der Primärantikörper (gelöst in Antibody Diluent, Dako) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen für je 15 min mit TBS-T wurden die Kavitäten mit dem Sekundärantikörper (gelöst in Antibody Diluent, Dako) in Dunkelheit für eine Stunde inkubiert. Sie wurden erneut viermal für je 15 min mit TBS-T gewaschen.

Primärantikörper Antigen	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Fibronectin	Kaninchen	1:100	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland

Sekundärantikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
Ziege-Anti-Kaninchen	AlexaFluor 488 (FITC)	1:200	Life Technologies GmbH, Paisley, UK

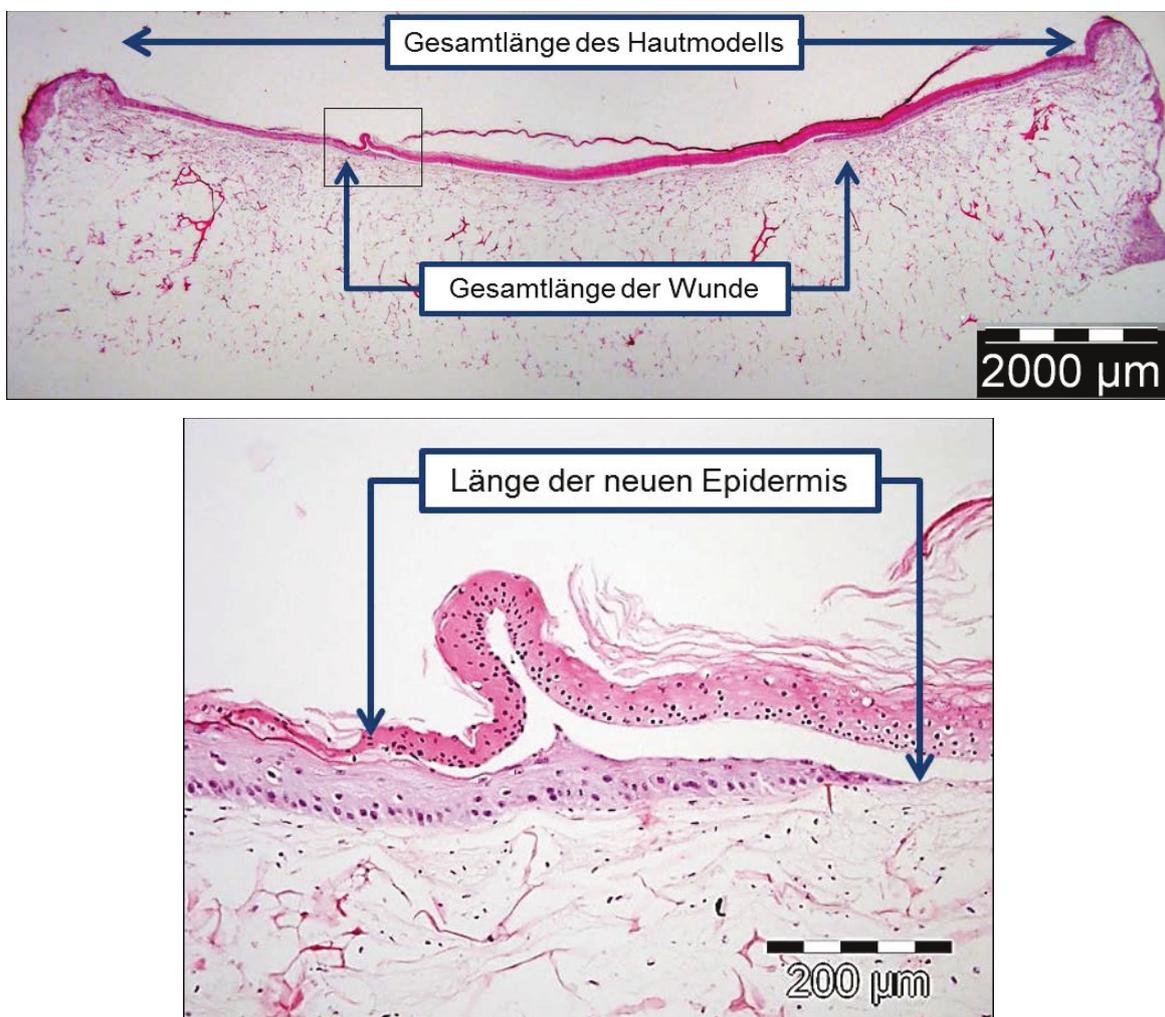
**Abb. 27**  
Antikörper Immunhistochemie (Fibronectin)

Abschließend wurden die Kavitäten mit einem Tropfen Fluorescence Mounting Medium (Dako) fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Oberflächen, derer Beschichtung intakt war erschienen durchgehend grün. Die Beschichtung wurde insbesondere zwischen den Zellmonolayern überprüft.

Die eingesetzten Antikörper sind in **Abbildung 27** aufgelistet.

### 3.2.20 Berechnung der Wundheilung von Kältewunden

Zunächst wurden die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Querschnitte unter dem Mikroskop fotografiert. Zur Bestimmung der Gesamtlänge von Hautmodell und Wunde wurden mit Hilfe einer speziellen Software jeweils zwei Bilder eines Hautmodells zu einem Bild kombiniert (multi-image-alignment (MIA)) (**Abb. 28** oben).



**Abb. 28**

**Berechnung der epidermalen Wundheilung des Vollhautmodells nach Kälteverwundung.** Oben: zwei Bilder wurden zu einem kombiniert (MIA). Die Gesamtlänge des Hautmodells sowie die Gesamtlänge der Wunde wurden gemessen. Der schwarzumrandete Bereich ist unten vergrößert dargestellt. Die Länge der neuen Epidermis wurde gemessen. Als Anfang wurde der Punkt definiert an dem die abgestorbene und abgelöste Epidermis von der Dermis abhob.

Als Wundanfang wurde die Stelle definiert, an der sich die primäre und mittlerweile abgestorbene Epidermis von der darunter liegenden Dermis ablöste (**Abb. 28** unten). Die Messungen wurden mit Hilfe der Software ImageJ vorgenommen. Pro Modell wurden 4 Querschnitte vermessen und zu einem Wert zusammengefasst.

## 4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollte die Wirkung von Extrakten aus *Lucilia sericata* auf die Wundheilung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden zwei *in vitro* Testsysteme ausgesucht. Ein zweidimensionales (2D) Monolayer- und ein dreidimensionales (3D) Vollhautmodell-System.

Während das 2D System die Analyse von Einzelschritten im Rahmen der Wundheilung zulässt, erlaubt die Verwendung eines 3D Vollhautmodells den komplexen Vorgang möglichst ähnlich der *in vivo* Situation nah abzubilden

### 4.1 Versuche an Keratinozyten- und Fibroblasten Monolayerkulturen

Die Zellen, die an der Wundheilung beteiligt sind, durchlaufen drei unterschiedliche Prozesse, die fein aufeinander angestimmt sind: Proliferation, Migration und Adhäsion. Für die erste systematische Analyse der Extrakte wurde die Wundheilung in eben diese Einzelprozesse aufgesplittet und mit Hilfe verschiedener *in vitro* Methoden separat voneinander untersucht.

Die Experimente wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit derselben Extraktcharge durchgeführt. Dabei wurden Keratinozyten und Fibroblasten von 2-4 unterschiedlichen Biopsien verwendet, um Auskunft über eventuelle Spender-abhängige Effekte geben zu können. Die Ansätze wurden mindestens zweimal, in der Regel jedoch dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Damit die Darstellung der Ergebnisse gleichzeitig übersichtlich und vollständig erfolgen konnte, konzentrierte man sich bei der Darstellung im Folgenden in der Regel auf zwei Versuche.

#### 4.1.1 Vitalität

Zunächst wurde der Einfluss des Extraktes auf die Vitalität untersucht, um die maximale Einsatzkonzentration des Extraktes für anschließende Versuchsansätze zu ermitteln und um zu vermeiden, dass zytotoxische Effekte die eigentlichen Extrakteffekte überdecken.

Für diese Dissertation wurde ein zuvor standardisiertes Verfahren zur Herstellung von *Lucilia sericata* Extrakten verwendet. Drei unterschiedliche Chargen, die mit

diesem Verfahren hergestellt wurden, haben in diesen initialen Ansätzen Anwendung gefunden. Alle Versuche umfassten die relevanten Kontrollen (Lösungsmittelkontrolle, H<sub>2</sub>O; Proteinkontrolle, BSA; Positivkontrolle, Kompletmedium).

#### 4.1.1.1 Einfluss des Extraktes auf die Vitalität von Fibroblasten

Fibroblasten von insgesamt vier Spendern wurden mit Fibroblastenmedium (Kompletmedium, 10% v/v FCS) kultiviert, bevor es durch Minimalmedium (1% v/v FCS) für 24 Stunden ersetzt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit den Extrakten (in Minimalmedium) für 48 Stunden behandelt. Die Vitalität wurde mit dem MTT-Test gemessen.

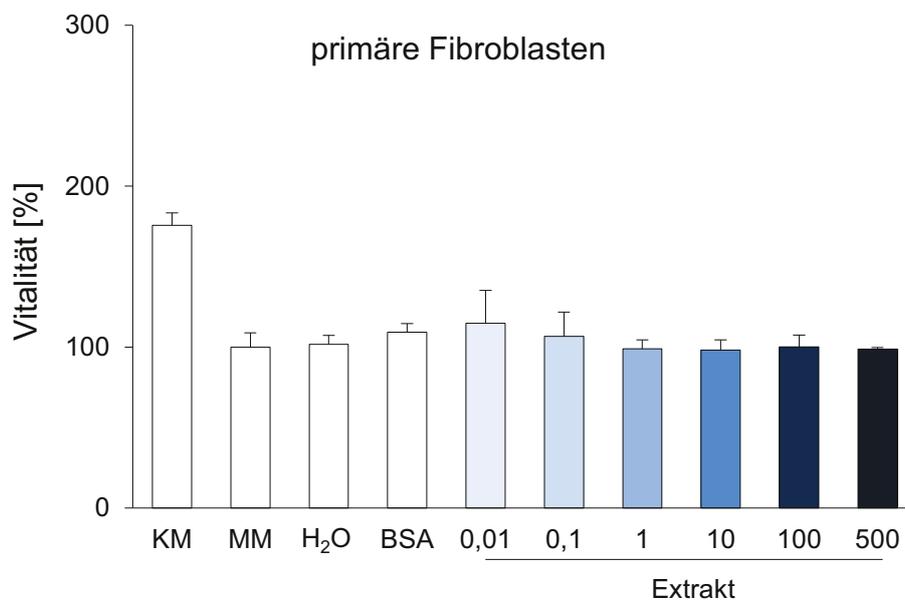


Abb. 29

***Lucilia sericata* Extrakt hat insbesondere in hohen Konzentrationen keine negative Auswirkungen auf die Vitalität von Fibroblasten (ausgesuchter Versuch) (Extraktcharge 1).** Die Zellen wurden in Kavitäten von 96-Loch Platten kultiviert. Sie wurden für 24 Stunden mit Minimalmedium inkubiert und anschließend mit den Extrakten in Minimalmedium behandelt. Die MTT-Messung erfolgte nach 48 Stunden. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. **KM:** Kompletmedium (10% v/v FCS); **MM:** Minimalmedium (1% v/v FCS); **H<sub>2</sub>O:** 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle); **BSA:** 500 µg/ml (Proteinkontrolle); **Extrakt:** µg/ml.

Auf **Abbildungen 29** und **30** sind zwei ausgesuchte Versuche dargestellt. Sie unterscheiden sich in der Verwendung der Extraktcharge.

Es ist klar zu erkennen, dass das Kompletmedium (KM) zu einer verstärkten Bildung des Formazansalzes führt. Dies lässt sich nicht nur mit einer verbesserten

Vitalität der Zellen erklären sondern außerdem mit einer verstärkten Proliferation der im KM kultivierten Zellen, im Gegensatz zu den anderen Ansätzen, bei denen die Zellen mit einer deutlich geringeren FCS Konzentration kultiviert wurden. Parallel sind alle drei Extrakte in einem weiten Konzentrationsbereich 0,0001-500 µg/ml vergleichend untersucht worden. Auch die höchste Konzentration von 500 µg/ml führte zu keiner Veränderung der Vitalität. BSA wurde in gleich hoher Konzentration als Kontrolle mitgeführt, um -im Falle einer Extraktwirkungsunspezifische Wirkungen durch eine hohe Proteinkonzentration auszuschließen.

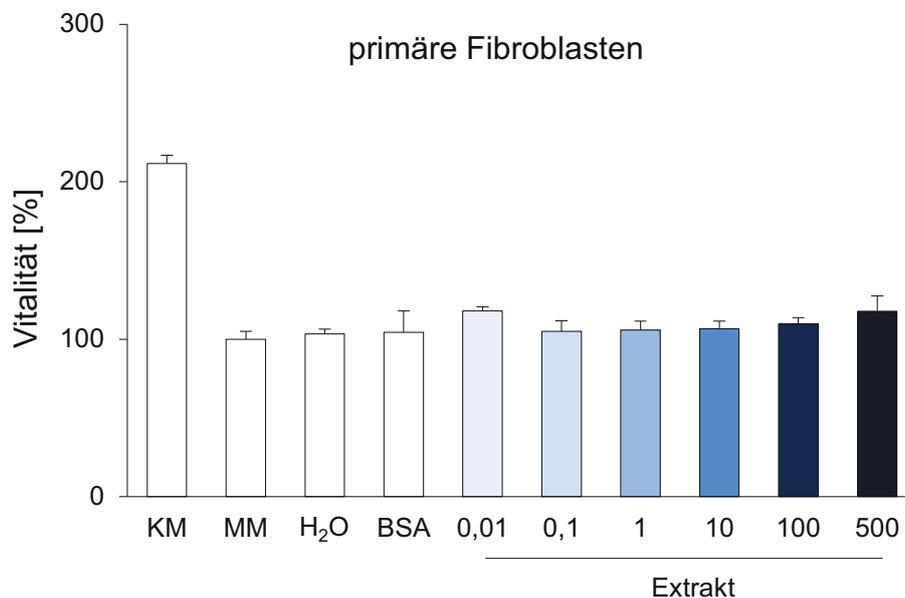


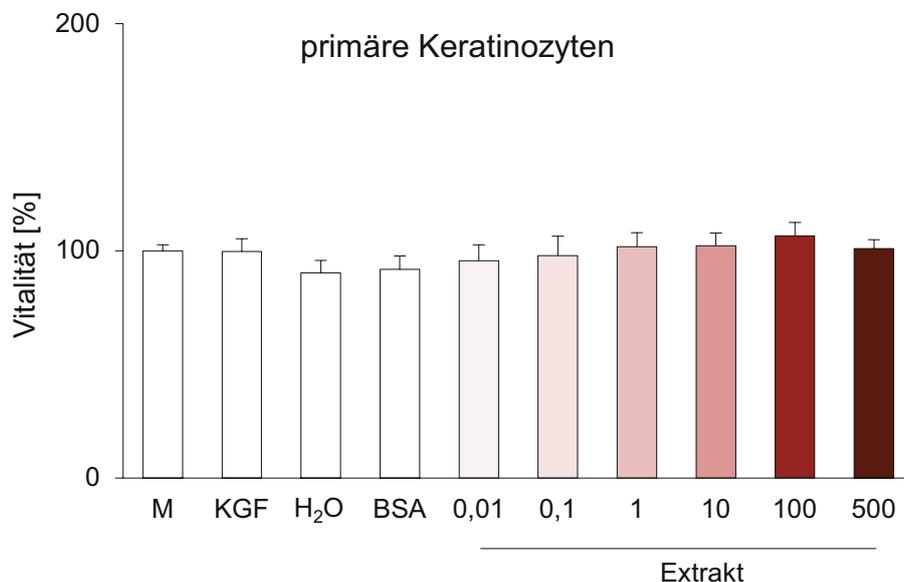
Abb. 30

***Lucilia sericata* Extrakt hat selbst in hohen Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Vitalität von Fibroblasten (ausgesuchter Versuch) (Extraktcharge 2).** Die Zellen wurden in Kavitäten von 96-Loch Platten kultiviert. Sie wurden für 24 Stunden mit Minimalmedium inkubiert und anschließend mit den Extrakten in Minimalmedium behandelt. Die MTT-Messung erfolgte nach 48 Stunden. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. **KM:** Komplettmedium (10% v/v FCS); **MM:** Minimalmedium (1% v/v FCS); **H<sub>2</sub>O:** 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle); **BSA:** 500 µg/ml (Proteinkontrolle); **Extrakt:** µg/ml.

Beide dargestellten Extraktchargen sowie eine weitere (Ergebnisse nicht gezeigt) zeigen keine signifikanten Unterschiede untereinander bezüglich ihres Einflusses auf die Vitalität von Fibroblasten. Diese Ergebnisse konnten auch bei Verwendung von unterschiedlichen Fibroblastenspendern bestätigt werden.

#### 4.1.1.2 Einfluss des Extraktes auf die Vitalität von Keratinozyten

Keratinozyten von insgesamt vier Zellspendern wurden ebenfalls für 48 Stunden behandelt. Die Keratinozyten wurden für das gesamte Projekt in einem kommerziell erhältlichen und definierten Medium ohne FCS kultiviert. Die Herstellung eines Minimalmediums durch die Nichtverwendung zugehöriger Additive führte wiederholt zum Absterben der Zellen, so dass auf ein Minimalmedium für die Keratinozyten verzichtet wurde. Die Vitalität wurde mit dem MTT-Test gemessen.



**Abb. 31**

***Lucilia sericata* Extrakt hat selbst in hohen Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Vitalität von Keratinozyten (ausgesuchter Versuch) (Keratinozytenspender 1).** Die Zellen wurden in Kavitäten von 96-Loch Platten kultiviert. Sie wurden für 48 Stunden mit den Extrakten behandelt. Im Anschluss erfolgte die MTT-Messung. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. **Medium:** (Epilife®); **KGF:** 5 ng/ml; **H<sub>2</sub>O:** 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle); **BSA:** 500 µg/ml (Proteinkontrolle); **Extrakt:** µg/ml.

Da nach der Untersuchung von vier unterschiedlichen Fibroblastenspendern und drei Extrakten keine Beeinflussung der Zellvitalität zu detektieren war, konzentrierte sich die Analyse der Keratinozyten auf eine Extraktcharge, die auch in allen weiteren Versuchen zum Einsatz kam. Der gleiche große Konzentrationsbereich von 0,0001 - 500 µg/ml führte auch bei den Keratinozyten der vier unterschiedlichen Spender zu keiner Beeinflussung der Vitalität. Auf **Abbildungen 31** und **32** sind zwei ausgesuchte Versuche dargestellt. Sie

unterscheiden sich in der Verwendung von zwei unterschiedlichen Keratinozytenspendern.

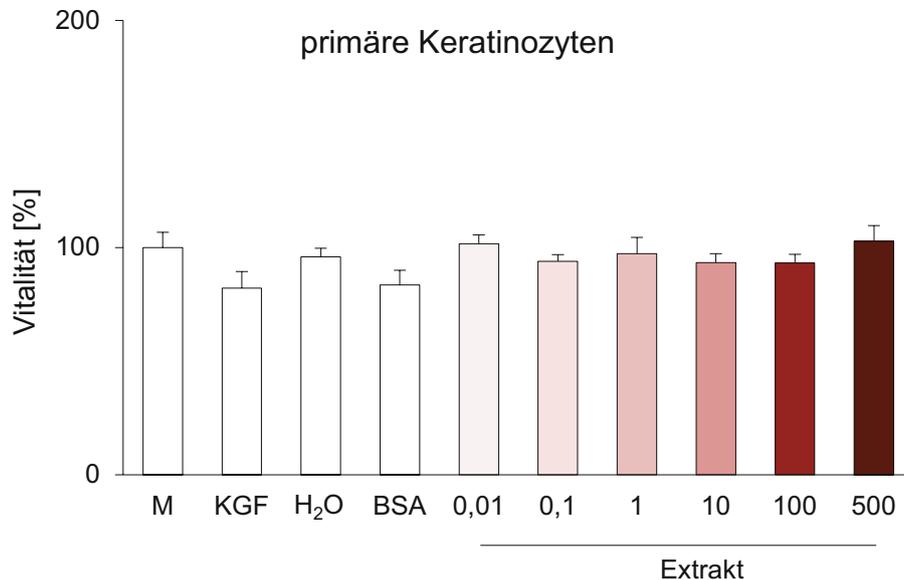


Abb. 32

**Lucilia sericata** Extrakt hat selbst in hohen Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Vitalität von Keratinozyten (ausgesuchter Versuch) (**Keratinozytenspender 2**). Die Zellen wurden in Kavitäten von 96-Loch Platten kultiviert. Sie wurden für 48 Stunden mit den Extrakten behandelt. Im Anschluss erfolgte die MTT-Messung. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. **Medium:** (Epilife®); **KGF:** 5 ng/ml; **H<sub>2</sub>O:** 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle); **BSA:** 500 µg/ml (Proteinkontrolle); **Extrakt:** µg/ml.

#### 4.1.2 Proliferation

Die Untersuchungen zur Vitalität von Keratinozyten und Fibroblasten wurden durch Experimente ergänzt, die den Einfluss der Extrakte auf die Proliferation analysierten. Die Zellen wurden wie in 4.1.1.1 und 4.1.1.2 beschrieben behandelt und eine mögliche Veränderung der Zellzahl über den Nachweis von eingebauten BrdU in die DNA der Zellen betrachtet.

##### 4.1.2.1 Einfluss des Extraktes auf die Proliferation von Fibroblasten

Es wurden Fibroblasten von insgesamt vier Spendern und drei Extraktchargen im Konzentrationsbereich zwischen 0,0001 und 500 µg/ml untersucht.

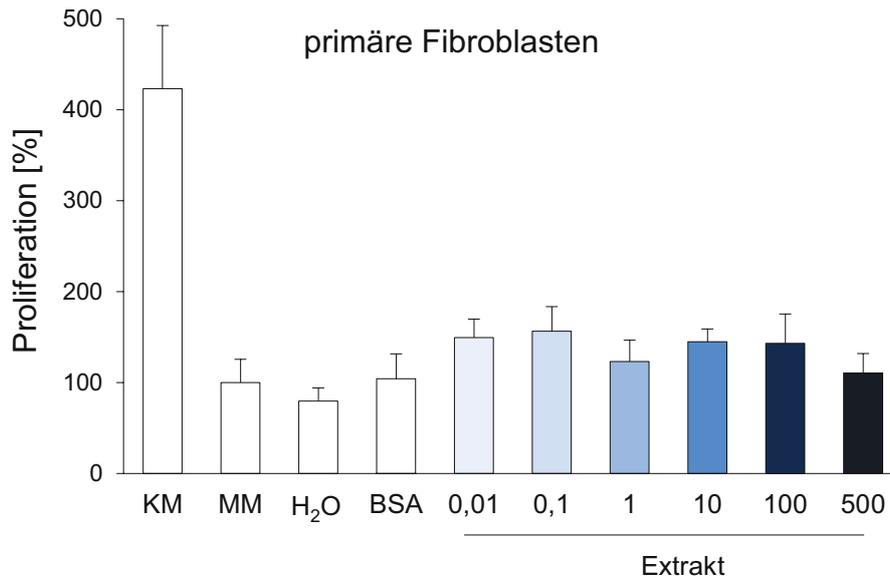


Abb. 33

*Lucilia sericata* Extrakt weist in diesem **ausgesuchten Versuch** bei einer Konzentration von **0,1 µg/ml** einen **leichten positiven proliferativen Effekt auf Fibroblasten** auf. Die Zellen wurden in Kavitäten von 96-Loch Platten kultiviert. Sie wurden für 24 Stunden mit Minimalmedium inkubiert und anschließend mit den Extrakten in Minimalmedium behandelt. Die Proliferationsmessung erfolgte nach 48 Stunden. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. **KM**: Komplettmedium (10% v/v FCS); **MM**: Minimalmedium (1% v/v FCS); **H<sub>2</sub>O**: 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle); **BSA**: 500 µg/ml (Proteinkontrolle); **Extrakt**: µg/ml.

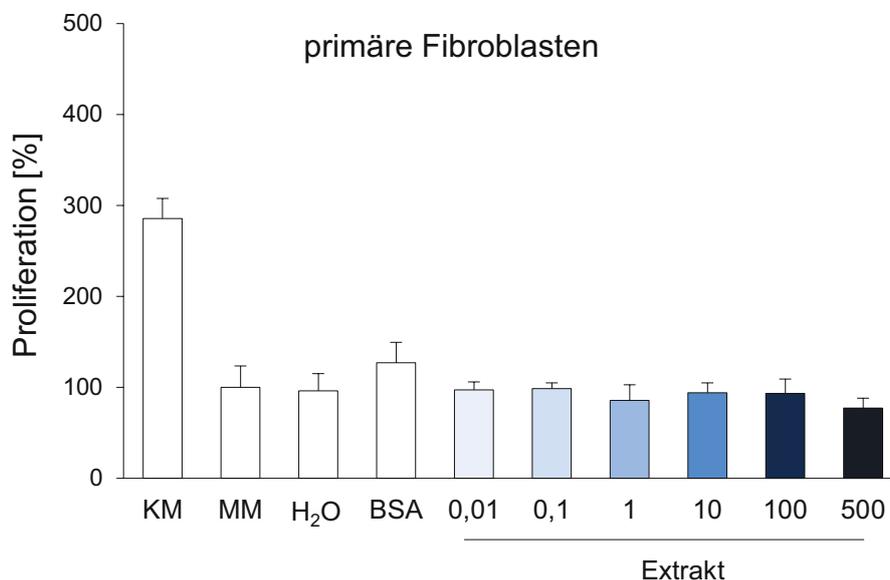


Abb. 34

*Lucilia sericata* Extrakt weist in diesem **ausgesuchten Versuch** bei einer Konzentration von **500 µg/ml** einen **leichten negativen Effekt auf die Proliferation von Fibroblasten**. Die Zellen wurden in Kavitäten von 96-Loch Platten kultiviert. Sie wurden für 24 Stunden mit Minimalmedium inkubiert und anschließend mit den Extrakten in Minimalmedium behandelt. Die Proliferationsmessung erfolgte nach 48 Stunden. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. **KM**: Komplettmedium (10% v/v FCS); **MM**: Minimalmedium (1% v/v FCS); **H<sub>2</sub>O**: 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle); **BSA**: 500 µg/ml (Proteinkontrolle); **Extrakt**: µg/ml.

Mit diesem Ansatz konnte kein maßgeblicher Einfluss der Extrakte auf die Proliferation festgestellt werden. In manchen Versuchen induzierte die Extraktkonzentration von 0,1 µg/ml einen leichten positiven proliferativen Effekt (**Abb.33**), während eine Konzentration von 500 µg/ml einen leichten Rückgang der Proliferation (**Abb. 34**) bewirkte. In der Gesamtheit der Ergebnisse konnten somit den Extrakten kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation zugewiesen werden. Auf beiden Abbildungen ist zudem eine deutliche Erhöhung der Proliferation von Fibroblasten zu erkennen, wenn diese mit Kompletmedium behandelt wurden. Dieses Ergebnis erklärt größtenteils den beobachteten Anstieg der mitochondrialen Aktivität, die in den parallelen Versuchen zur Vitalität von Fibroblasten, zum Teil auf die vermehrte Zellzahl zurückzuführen war (**4.1.1.1**).

### **4.1.2.2 Einfluss des Extraktes auf die Proliferation von Keratinozyten**

Ein vergleichbares Ergebnis wurde nach der Analyse von Keratinozyten von vier unterschiedlichen Spendern und einer Extraktcharge im Konzentrationsbereich zwischen 0,001 und 500 µg/ml erzielt. Wie im Kapitel **4.1.1.2** bereits erläutert, wurden die Keratinozyten für das gesamte Projekt in einem kommerziell erhältlichen und definierten Medium ohne FCS kultiviert. Eine Reduktion von ausgewählten Ergänzungen des Grundmediums führte wiederholt zum Absterben der Zellen, sodass auf ein Minimalmedium für die Keratinozyten verzichtet wurde. Die Zellen wurden für 48 Stunden behandelt, und im Anschluss wurde die Proliferation gemessen.

In manchen Versuchen induzierte die Extraktkonzentration von 1 µg/ml einen schwachen positiven proliferativen Effekt, während eine Konzentration von 500 µg/ml einen ebenso schwachen negativen Effekt verursachte (**Abb. 35**). In weiteren Versuchen wurde jedoch eine schwach negative Wirkung der Extrakte bei einer Konzentration von 1 µg/ml festgestellt (**Abb. 36**). Insgesamt konnte auch hier den Extrakten kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation zugewiesen werden.

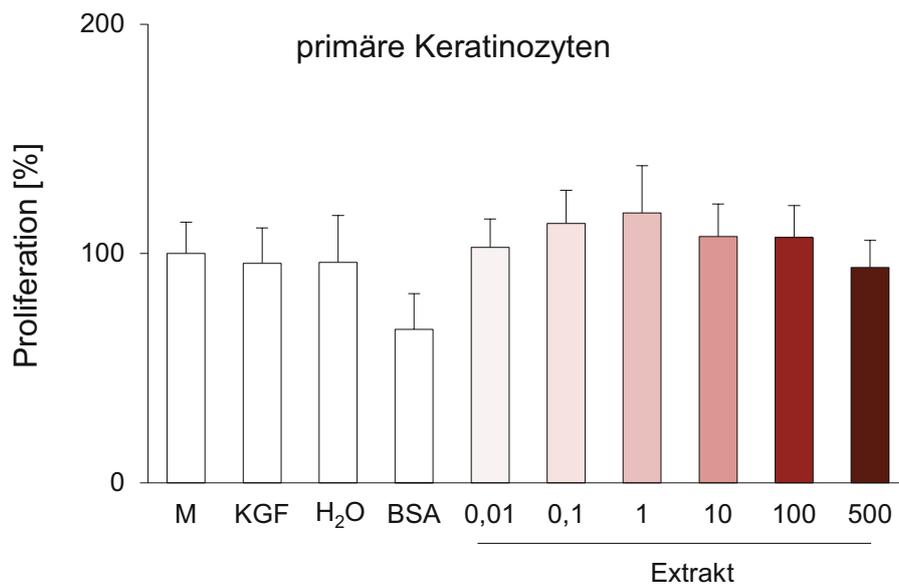


Abb. 35

*Lucilia sericata* Extrakt weist in diesem **ausgesuchten Versuch** bei einer Konzentration von **1 µg/ml** einen leicht positiven proliferativen Effekt auf Keratinozyten. Die Zellen wurden in Kavitäten von 96-Loch Platten kultiviert. Sie wurden für 48 Stunden mit den Extrakten behandelt. Im Anschluss erfolgte die Proliferationsmessung. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. **Medium:** (Epilife®); **KGF:** 5 ng/ml; **H<sub>2</sub>O:** 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle); **BSA:** 500 µg/ml (Proteinkontrolle); **Extrakt:** µg/ml.

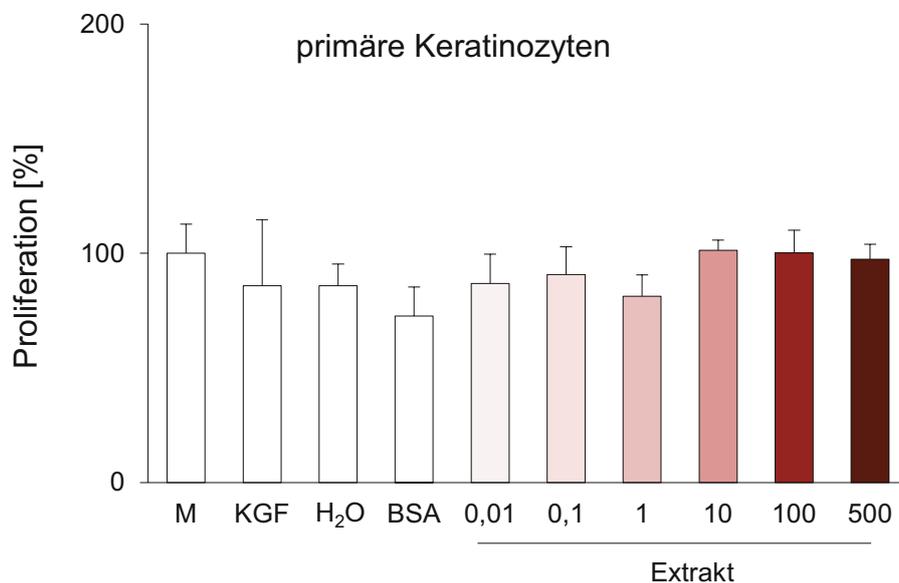


Abb. 36

*Lucilia sericata* Extrakt weist in diesem **ausgesuchten Versuch** bei einer Konzentration von **1 µg/ml** einen leicht negativen Effekt auf die Proliferation von Keratinozyten. Die Zellen wurden in Kavitäten von 96-Loch Platten kultiviert. Sie wurden für 48 Stunden mit den Extrakten behandelt. Im Anschluss erfolgte die Proliferationsmessung. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. **Medium:** (Epilife®); **KGF:** 5 ng/ml; **H<sub>2</sub>O:** 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle); **BSA:** 500 µg/ml (Proteinkontrolle); **Extrakt:** µg/ml.

### 4.1.3 Adhäsion

Die ersten Untersuchungen zeigten, dass die Extrakte, auch in hohen Konzentrationen, sowohl keinen spezifischen als auch keinen -durch die hohe Proteinmenge bedingten- unspezifischen zytotoxischen Effekt aufwiesen. Parallele Analysen ergaben darüber hinaus, dass die Proliferation von Keratinozyten und Fibroblasten unbeeinflusst blieb. Folglich wurden nun Prozesse untersucht, die wie die Adhäsion nur erfolgen, wenn sich Zellen nicht in der Teilung befinden.

Zunächst wurde der Einfluss der Extrakte auf die Zelladhäsion nach entsprechender Behandlungszeit von 48 Stunden und ausgewählten Extraktkonzentrationen (1, 10, 100, 500 µg/ml) untersucht. Mit diesem Ansatz wurden in mindestens fünf voneinander unabhängigen Experimenten mindestens zwei unterschiedliche Spender bewertet.

Dabei wurde die Adhäsion mit Hilfe spezifischer Substrate wie Fibronectin, Kollagen Typ I und Kollagen Typ IV untersucht. Zusätzlich wurden BSA und Poly-D-Lysin (geblockt mit BSA) eingesetzt, um eine unspezifische Wirkung der Extrakte ausschließen zu können.

#### 4.1.3.1 Einfluss des Extraktes auf die Adhäsion von Fibroblasten

Zwei Fibroblastenspender und eine Extraktcharge wurden auf die folgende Weise untersucht: Fibroblasten wurden für 24 Stunden in Minimalmedium (1% v/v FCS) kultiviert und danach für 48 Stunden mit den Extrakten in Minimalmedium behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die ebenso lange in Kompletmedium kultiviert wurden. Im Anschluss erfolgte die Adhäsionsmessung.

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Extrakte auf die Adhäsion von Fibroblasten beobachtet werden (**Abb. 37**). Jede Grafik auf dieser Abbildung repräsentiert eine andere 96-Loch Platte. Unterschiede im Adhäsionsverhalten sind nur innerhalb einer Grafik vorbehaltlos vergleichbar. Es ist jedoch zu erkennen, dass bei allen Grafiken Zellen, die mit Kompletmedium behandelt wurden, eine erhöhte Adhäsion auf allen Substraten aufwiesen. Ein ausbleibender Effekt könnte auf die Unterversorgung der Zellen durch das Mangelmedium zurückzuführen sein und, um das auszuschließen, wurden Zellen aus den gleichen Fibroblastenspendern in weiteren Versuchen in Kompletmedium

kultiviert und für 48 Stunden mit den Extrakten behandelt. Auch bei diesem Experiment konnte kein signifikanter Einfluss der Extrakten auf die Adhäsion beobachtet werden (Abb. 38).

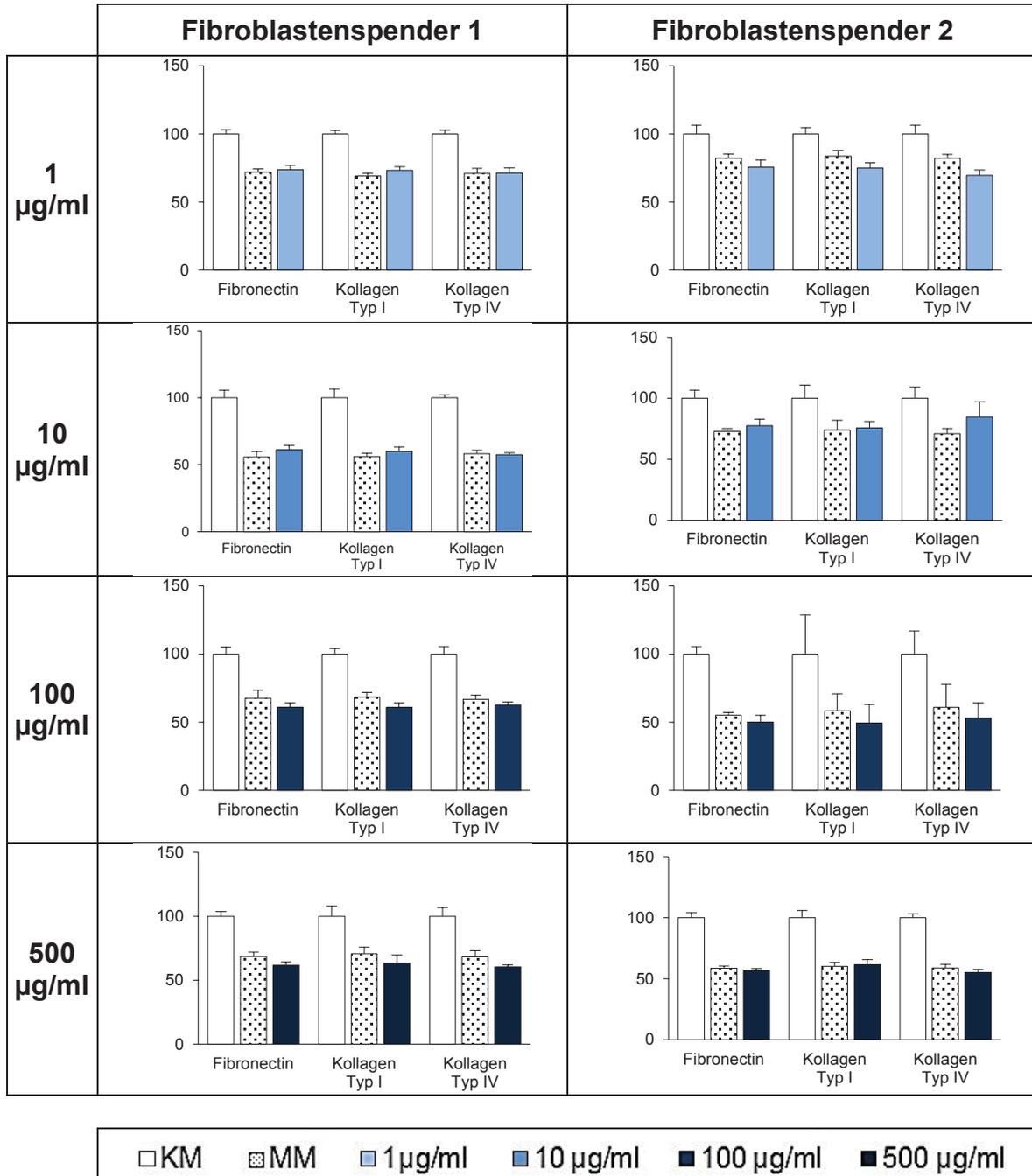


Abb. 37

**Lucilia sericata** Extrakt hat keinen Einfluss auf die Adhäsion von Fibroblasten (zwei ausgesuchte Versuche mit zwei verschiedenen Fibroblastenspendern). Die Zellen wurden in Kompletmedium (KM) kultiviert. Sie wurden für 24 Stunden mit Minimalmedium (MM) inkubiert und anschließend mit den Extrakten in Minimalmedium behandelt. Die Adhäsionsmessung erfolgte nach 48 Stunden. Die dargestellten Ergebnisse geben die Adhäsionsmittelwerte [%] +/- Standardabweichung wieder. Eingesetzte **Extraktkonzentrationen: 1 µg/ml; 10 µg/ml; 100 µg/ml** und **500 µg/ml**.

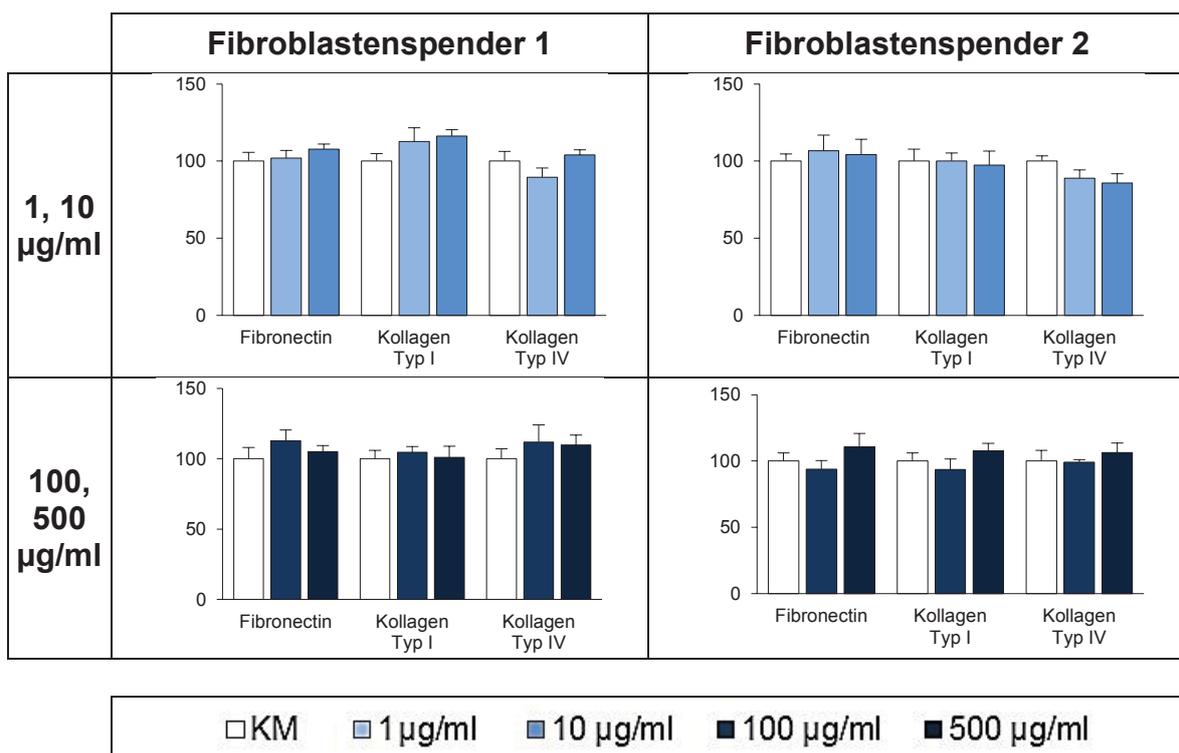


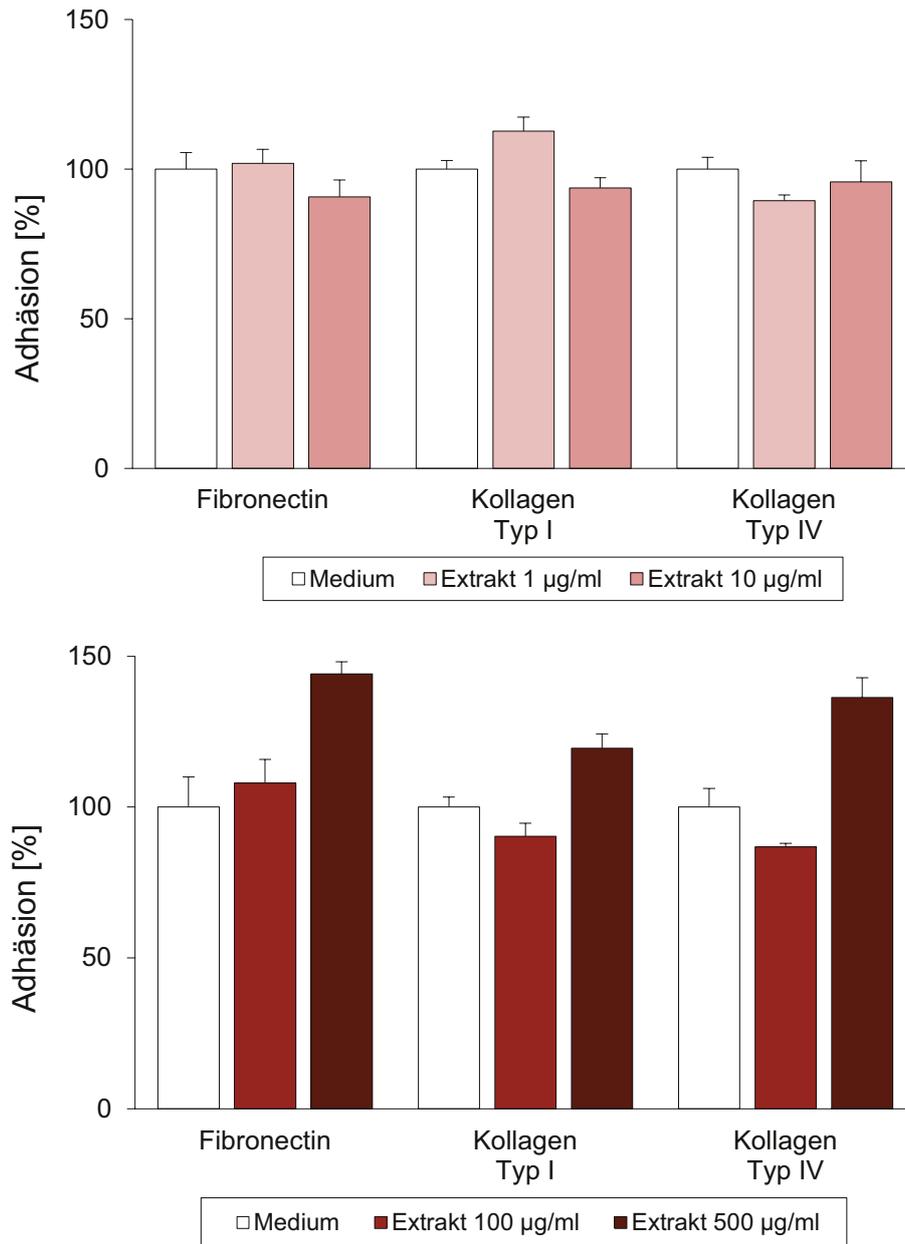
Abb. 38

***Lucilia sericata* Extrakt hat keinen Einfluss auf die Adhäsion von Fibroblasten (zwei ausgesuchte Versuche mit zwei verschiedenen Fibroblastenspendern).** Die Zellen wurden in kultiviert. Sie wurden mit den Extrakten in Komplettmedium (KM) behandelt. Die Adhäsionsmessung erfolgte nach 48 Stunden. Die dargestellten Ergebnisse geben die Adhäsionsmittelwerte [%] +/- Standardabweichung wieder. Eingesetzte **Extraktkonzentrationen: 1 µg/ml; 10 µg/ml; 100 µg/ml und 500 µg/ml.**

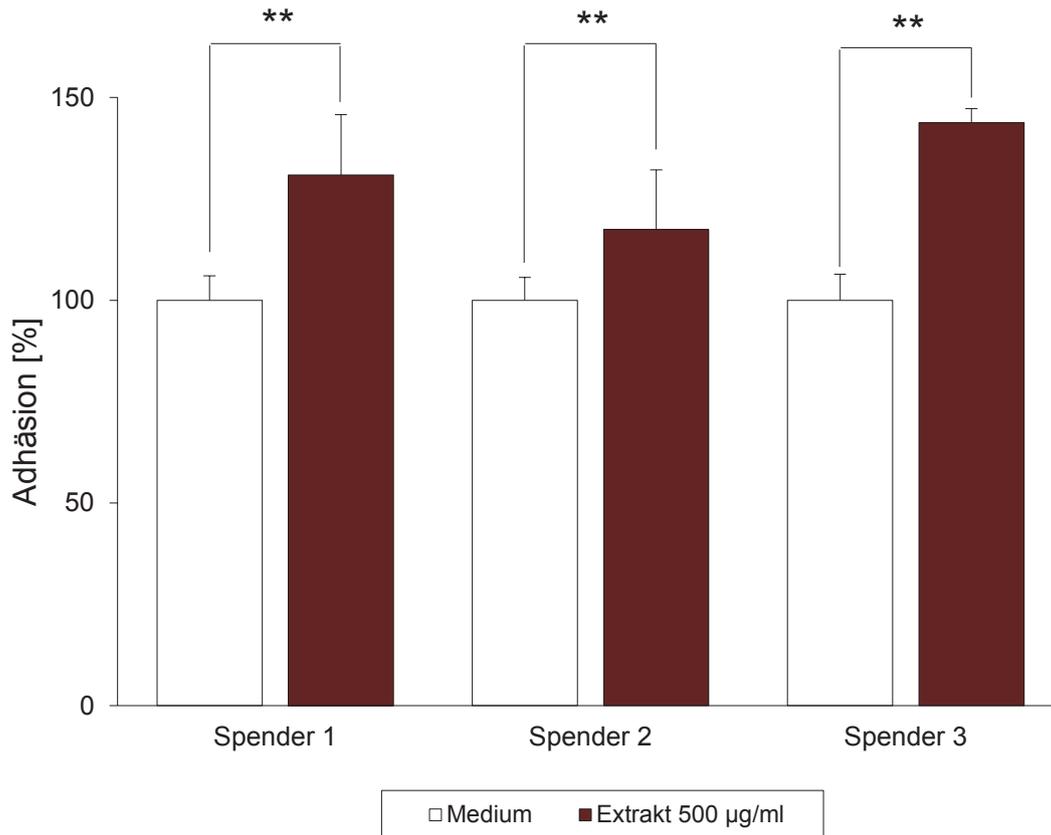
#### 4.1.3.2 Einfluss des Extraktes auf die Adhäsion von Keratinozyten

Keratinozyten von vier unterschiedlichen Spendern wurden ebenfalls für 48 Stunden mit den Extrakten behandelt.

Extraktkonzentrationen von 1, 10 und 100 µg/ml zeigten keinen Einfluss auf die Adhäsion der Keratinozyten, wie im ausgesuchten Versuch auf **Abbildung 39** zu sehen ist. Allerdings führte eine Extraktkonzentration von 500 µg/ml zu einer erhöhten Adhäsion der Zellen auf Fibronectin und auf den Kollagenen Typ I und IV (**Abb. 39 unten**), eine Konzentration die in vorherigen Versuchen als nicht zytotoxisch charakterisiert wurde.

**Abb. 39**

**Erhöhung der Adhäsion von Keratinozyten durch *Lucilia sericata* Extrakt (ausgesuchter Versuch).** Die Zellen wurden mit den Extrakten für 48 Stunden behandelt. Im Anschluss erfolgte die Adhäsionsmessung. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Eingesetzte Extraktkonzentrationen: 1 µg/ml, 10 µg/ml (**oben**); 100 µg/ml, 500 µg/ml (**unten**).

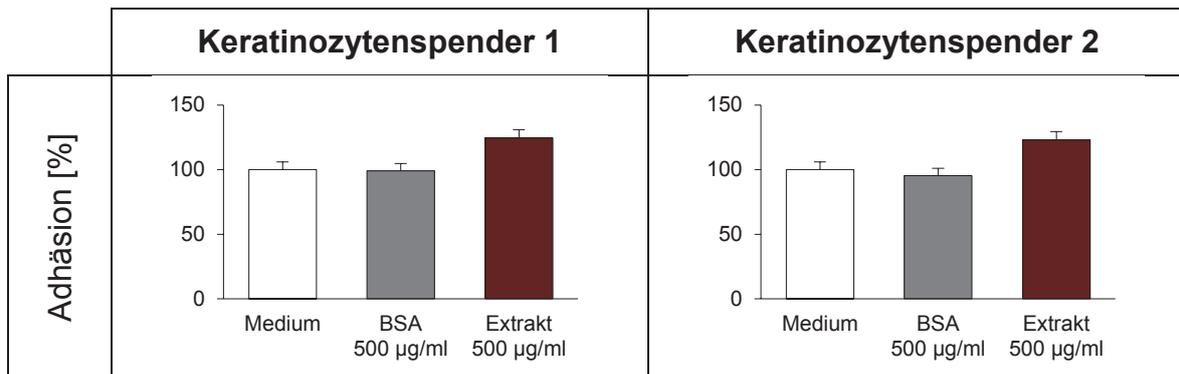
**Abb. 40**

Die Adhäsionserhöhung auf Fibronectin ist unabhängig vom Keratinozytenspender. Das konnte in drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei unterschiedlichen Keratinozytenspendern beobachtet werden. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung.  $P < 0,01$  (\*\*).

Die Adhäsion an Kollagen Typ I erhöhte sich in 6 durchgeführten Versuchen im Durchschnitt signifikant um 10% gegenüber den Kontrollzellen. Ebenfalls zeigte sich in 2 von 6 Versuchen eine signifikant erhöhte Adhäsion an Kollagen Typ IV von 10% gegenüber der Kontrollzellen.

Die Adhäsion an Fibronectin war im Durchschnitt sogar um 30% gegenüber den Kontrollzellen erhöht. Neben dem tendenziell stärkeren Anstieg wurden im Gegensatz zum Kollagen, auch Hinweise auf eine dosisabhängige Wirkung deutlich und dadurch die Relevanz der Ergebnisse unterstützt. So ist die Erhöhung der Adhäsion bereits bei einer Extraktkonzentration von 100 µg/ml erkennbar. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml ist die Erhöhung dann reproduzierbar signifikant ( $P < 0,01$ ). Neben dem in **Abbildung 39** ausgewählten Experiment konnte das Ergebnis in weiteren drei unabhängigen Versuchen mit drei weiteren Keratinozytenspendern reproduziert werden (**Abb. 40**).

In nachfolgenden Experimenten konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um einen unspezifischen Proteineffekt handelt. In diesen Experimenten wurden die Zellen mit BSA in einer Konzentration von 500 µg/ml für 48 Stunden behandelt. Es konnte keine Erhöhung der Adhäsion beobachtet werden (**Abb. 41**).



**Abb. 41**

**Die Adhäsionserhöhung auf Fibronectin ist kein unspezifischer Proteineffekt.** Die Zellen wurden mit den Extrakten oder mit BSA für 48 Stunden behandelt. Im Anschluss erfolgte die Adhäsionsmessung. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung.

#### 4.1.4 Migration

Nachdem Hinweise für eine veränderte Adhäsion der Zellen nach Behandlung mit *Lucilia sericata* Extrakt gesammelt werden konnten, wurde die Migration der Zellen untersucht. Ein Vorgang, der von der Adhäsion deutlich beeinflusst wird und eine zentrale Rolle während der Wundheilung spielt. Zu diesem Zweck wurde der sogenannte Wundheilungs-Test verwendet.

##### 4.1.4.1 Einfluss des Extraktes auf die Migration von Fibroblasten

Für die Untersuchungen wurden Fibroblasten von zwei unterschiedlichen Spendern, die schon in den Adhäsionsversuchen verwendet worden waren, in Inserts der Fa. ibidi® eingesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Inserts entfernt und die Zellen der Migration freigegeben. Der Bereich zwischen den Zellfeldern wurde am Anfang (t=0) und am Ende (t=24 Stunden) der Versuche fotografiert und das Ausmaß der freien Felder mit Hilfe einer Software bestimmt.

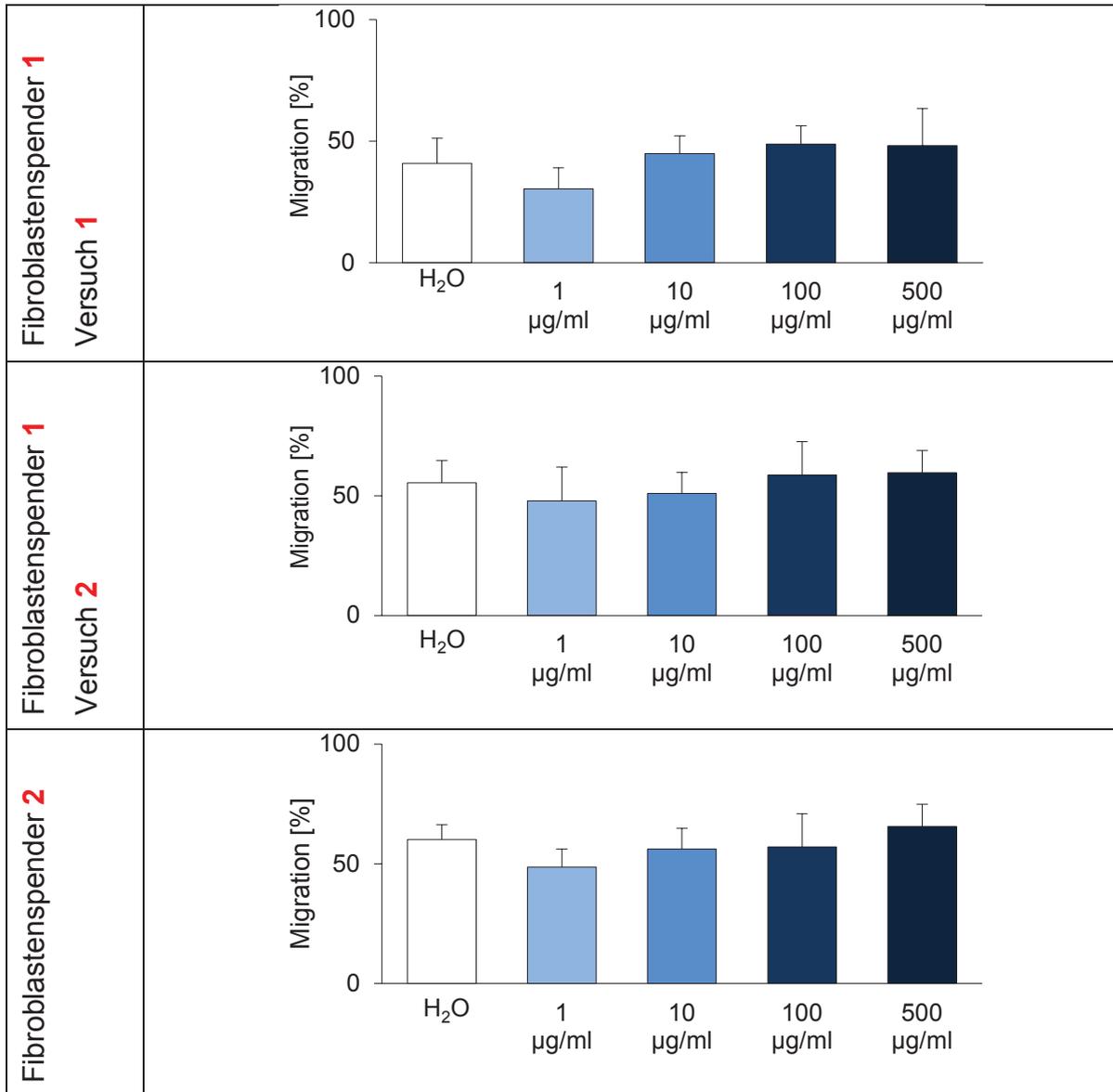


Abb. 42

**Migrationsmessung von Fibroblasten unter Einfluss von *Lucilia sericata* Extrakt.** Die Zellen wurden in Inserts (ibidi®) kultiviert. Der Bereich zwischen den Zellmonolayern wurde am Anfang ( $t=0$ ) und am Ende ( $t=24$  Stunden) der Migration fotografiert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. **H<sub>2</sub>O:** 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle); **Extrakt:**  $\mu\text{g/ml}$ .

Mit diesem Ansatz wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (**Abb. 42**). In allen Versuchen induzierte die Extraktkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  tendenziell eine Reprimierung der Migration. Mit Zellen des „Fibroblastenspender 1“ konnte dieser negative Effekt in einem Experiment als signifikant ausgelesen werden. Die gleiche Tendenz konnte mit Zellen des „Fibroblastenspender 2“ festgestellt werden, die statistische Signifikanz ließ sich allerdings nicht reproduzieren. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit „Fibroblastenspender 1“ wiederholt, wobei sich das gleiche Bild aus dem

vorherigen Versuch mit Spender 2 zeigte. Da alle anderen Konzentrationen bis hin zum maximalen Ansatz von 500 µg/ml keinen Einfluss auf die Migration im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ausübten, wurden dem Extrakt zusammenfassend keine Effekte auf die Migration von Fibroblasten in Monolayerkulturen zugeschrieben.

#### 4.1.4.2 Einfluss des Extraktes auf die Migration von Keratinozyten

Für die Untersuchungen zur Extraktwirkung wurden Keratinozyten von zwei unterschiedlichen Spendern, die schon in den Adhäsionsversuchen verwendet wurden, in Inserts der Fa. ibidi® eingesät und für 48 Stunden kultiviert. Nach Entfernen des Inserts wurden die Zellen der Migration freigegeben. Der Bereich zwischen den Zellmonolayern wurde am Anfang (t=0) und am Ende (t=12 Stunden) des Versuches fotografiert und das Ausmaß der freien Felder mit Hilfe einer Software bestimmt.

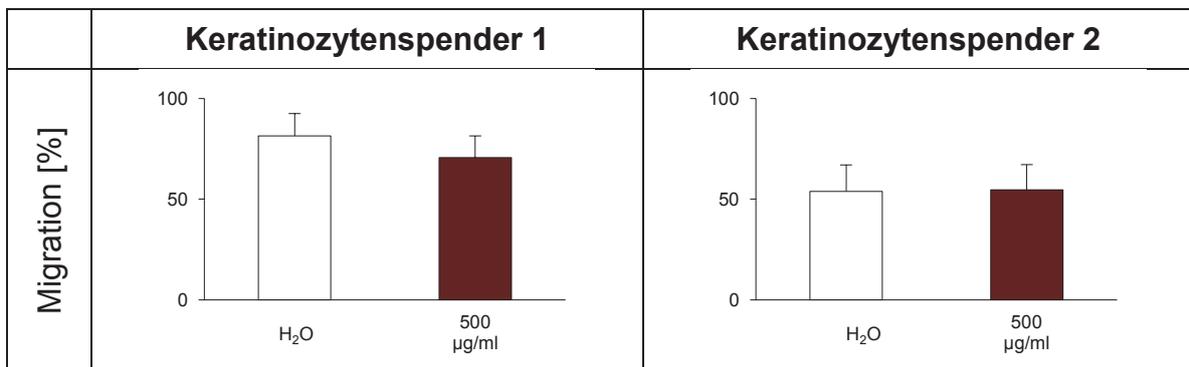


Abb. 43

**Lucilia sericata** Extrakt weist auf Oberflächen ohne Beschichtung keinen signifikanten Effekt auf. Die Zellen wurden in Inserts (ibidi®) kultiviert. Die Zellen wurden nur für die Migrationsdauer behandelt. Die Oberfläche war **nicht beschichtet**, der Bereich zwischen den Zellmonolayern wurde am Anfang (t=0) und am Ende (t=12 Stunden) der Migration fotografiert. Die dargestellten Ergebnisse geben die Migrationsmittelwerte [%] +/- Standardabweichung wieder. **Extraktkonzentration: 500 µg/ml. H<sub>2</sub>O; 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle).**

Zunächst wurden Extrakt behandelte Ansätze mit der Lösungsmittelkontrolle (H<sub>2</sub>O; 1% v/v) verglichen. Es konnte für keinen der Extraktkonzentrationen ein reproduzierbarer und signifikanter Einfluss auf die Migration von Keratinozyten festgestellt werden bis hin zu einer Konzentration von (500 µg/ml) (**Abb. 43**).

Diese ersten Experimente wurden ohne Beschichtung der Kulturplatten durchgeführt. In den Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten hatte sich gezeigt,

dass der Extrakt besonders Zellprozesse, die mit Fibronectin verknüpft waren, zu beeinflussen wusste.

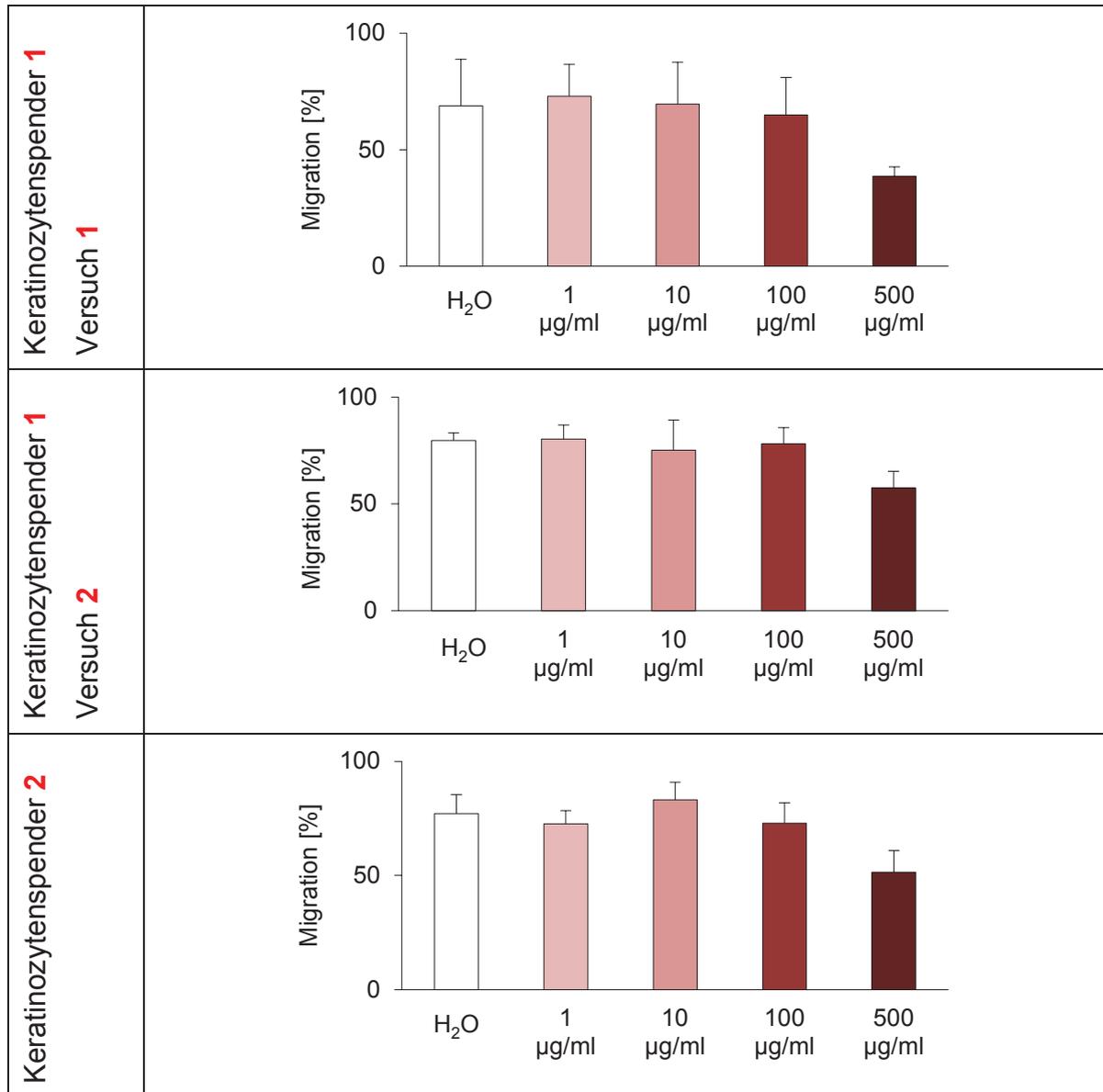


Abb. 44

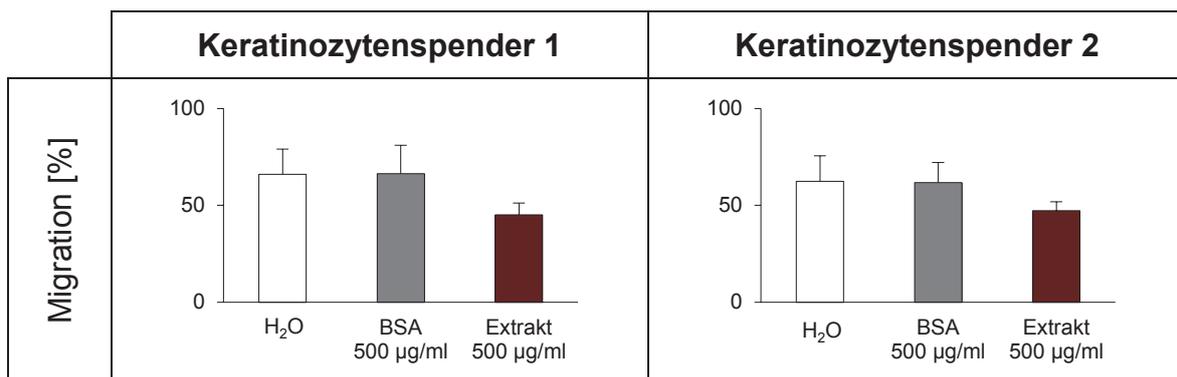
**Lucilia sericata** Extrakt reprimiert die Migration von Keratinozyten. Die Zellen wurden in Inserts (ibidi®) kultiviert. Die Oberfläche war mit **Fibronectin** beschichtet. Der Bereich zwischen den Zellmonolayern wurde am Anfang (t=0) und am Ende (t=9 Stunden) der Migration fotografiert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. **H<sub>2</sub>O**: 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle); **Extrakt**: µg/ml. P<0,001 (\*\*\*)

Ausgehend von diesen Befunden wurde der Einfluss der Extrakte auf das Migrationsverhalten von Keratinozyten untersucht, die zuvor in mit Fibronectin beschichteten Insert kultiviert worden waren. Dabei wurden dieselben Zellspender der Adhäsionsversuche verwendet. Nach 48h wurden die Inserts entfernt und so die Zellen der Migration freigegeben. Der Bereich zwischen den Zellmonolayern

wurde am Anfang (t=0) und am Ende (t=9 Stunden) des Versuches fotografiert. Erst nachdem mittels Immunhistochemie die Unversehrtheit der Fibronectinbeschichtung nach dem Entfernen des Inserts belegt war, wurde der Versuch als relevant betrachtet und mittels einer Software (wie in Material und Methoden beschrieben) ausgewertet.

Die Zellen migrierten erwartungsgemäß schneller auf dem spezifischen Substrat Fibronectin (im Vergleich zur unbehandelten Plastik). Darüber hinaus zeigt **Abbildung 44** deutlich, dass der Extrakt einen negativen Einfluss auf die Migration hat. In drei voneinander unabhängigen Versuchen migrierten Zellen, die mit einer Extraktkonzentration von 500 µg/ml behandelt wurden im Durchschnitt 25% langsamer als Zellen, die mit der Lösungsmittelkontrolle (H<sub>2</sub>O: 1% v/v) behandelt worden waren.

In nachfolgenden Versuchen, wurde überprüft, ob es sich bei der beobachteten Wirkung um einen unspezifischen Effekt durch einen hohen Proteingehalt handelt. Zu diesem Zweck wurden Keratinozyten nicht nur mit dem Extrakt behandelt, sondern parallele Ansätze erhielten BSA in gleich hoher Konzentration von 500 µg/ml. **Abbildung 45** zeigt deutlich, dass dieses für die Wundheilung nicht relevantem Proteingemisch keinen Effekt auf die Migration von Keratinozyten ausübte und es sich bei der verringerten Migration um einen spezifischen, durch den Extrakt induzierten Effekt zu handeln scheint.



**Abb. 45**

**Der negativ migratorische Effekt von *Lucilia sericata* Extrakt ist kein unspezifischer Proteineffekt** Die Zellen wurden in Inserts (ibidi®) kultiviert. Die Zellen wurden nur für die Migrationsdauer behandelt. Die Oberfläche war mit Fibronectin beschichtet, der Bereich zwischen den Zellmonolayern wurde am Anfang (t=0) und am Ende (t=9 Stunden) der Migration fotografiert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. H<sub>2</sub>O: 1% v/v (Lösungsmittelkontrolle).

#### 4.1.5 Zusammenfassung der Vitalitäts-, Proliferations- Adhäsions- und Migrations-Versuche

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Extraktkonzentration von 500 µg/ml die Adhäsion von Keratinozyten auf Fibronectin signifikant und zu einem geringeren Maße auf den Kollagenen Typ I und IV erhöhte. Die gleiche Extraktkonzentration setzte die Migrationsgeschwindigkeit auf Fibronectin spenderunabhängig und dosisabhängig herab. Diese Ergebnisse könnten auf eine selektive Wirkung der Extrakte auf die Rezeptoren für Fibronectin und Kollagen hinweisen. Keratinozyten binden mit artverwandten Rezeptoren sowohl an Fibronectin als auch an verschiedene Typen von Kollagen. Um mögliche Mechanismen der Extraktwirkung zu beleuchten, konzentrierten sich Untersuchungen in den nachfolgenden Experimenten auf diese Rezeptoren, bei denen es sich um Integrinheterodimere handelt:  $\alpha_5\beta_1$  (wichtigster Kontakt für Fibronectin auf der Zelloberfläche),  $\alpha_2\beta_1$  (vermittelt Kontakt zu Kollagenen) und  $\alpha_3\beta_1$  (Kontakt für Laminin, das jedoch als Regulator der Migration von Keratinozyten auf Fibronectin und Kollagen gilt). Die gemeinsame Untereinheit dieser funktionellen Dimere ist das Integrinmonomer  $\beta_1$ . Einflüsse auf dieses Integrin würden unmittelbare Folgen auf die Adhäsion und Migration von Keratinozyten haben [52]. Um diese Annahme zu testen, wurden im Weiteren quantitative Proteinanalysen von Integrin- $\beta_1$  durchgeführt.

#### 4.1.6 Identifizierung beteiligter Integrine an der veränderten Adhäsion und Migration

Keratinozyten der Spender, die bereits in den Adhäsions- und Migrations-Versuchen verwendet wurden, wurden subkonfluent für 48 Stunden mit *Lucilia sericata* Extrakt behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert.

Zunächst wurde untersucht, ob der Extrakt einen Einfluss auf die Gesamtmenge an Integrin- $\beta_1$  ausübt. Im Western-Blot (**Abb. 46**) sind zwei Banden zu erkennen. Die obere Bande (ca. 120 kDa) ist die glykosylierte Form des Integrin- $\beta_1$ , die das reife Protein darstellt; die untere Bande (ca. 110 kDa) ist die nicht-glykosylierte Form, die das unreife, nicht glykosylierte, Protein darstellt. In diesem ausgesuchten Versuch, der jedoch repräsentativ für alle Experimente ist, tritt eine Veränderung des Proteinexpressionsmusters nach Extraktbehandlung deutlich

hervor. Diese deutet auf eine Zunahme, sowohl des reifen, als auch des unreifen Proteins hin. Die densitometrische Analyse von drei unabhängigen Versuchen ergab im Durchschnitt eine Erhöhung des  $\beta_1$  um 20% und eine Erhöhung des pre- $\beta_1$  um 100%.

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob neben der induzierten Gesamtmenge vermehrt aktives Protein zu detektieren war. Zu diesem Zweck wurden zwei Antikörper verwendet, die unterschiedliche Epitope erkennen, die erst bei einer Aktivierung der Integrine zugänglich werden. Zum einen wurde der Klon HUTS-4 eingesetzt, der an der substratunabhängigen Hybrid-Domain bindet [77] und zum anderen wurde der Klon B44 verwendet, der auf der „Ligand Induced Binding Site (LIBS)“ [78] bindet.

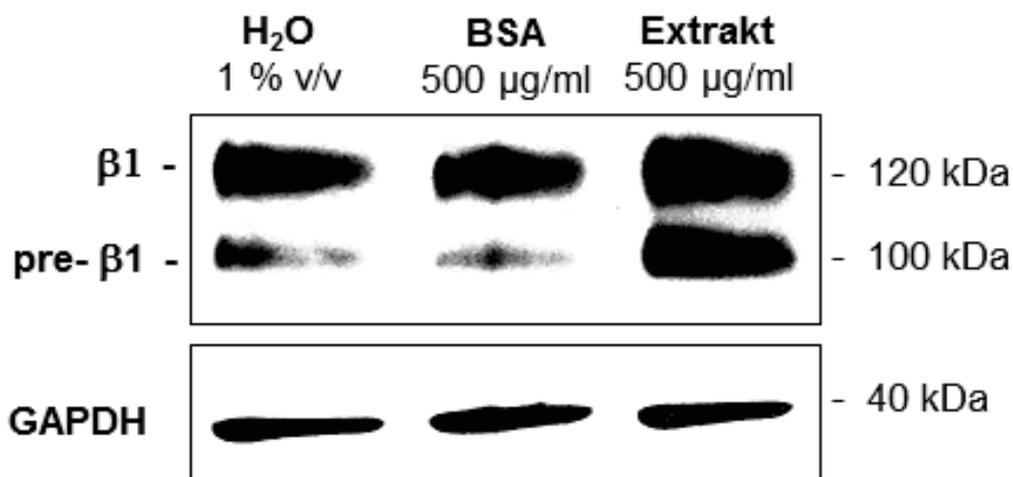


Abb. 46

**Einfluss von *Lucilia sericata* Extrakt auf die Expression des Integrins  $\beta_1$  (ausgesuchter Versuch).** Keratinozyten wurden in Kavitäten von 6-Loch Platten kultiviert. Sie wurden mit den Extrakten für 48 Stunden behandelt. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Beide Western Blots (**Abb. 47 a, b**) zeigen eine Induktion der entsprechenden Banden. Die densitometrische Analyse von drei unabhängigen Versuchen ergab im Durchschnitt eine Induktion der Bande der „Substratunabhängigen Hybrid-Domain“ (HUTS-4) um 30% (**Abb. 47 a**) und eine Erhöhung der LIBS Bande (B44) um 50% (**Abb. 47 b**).

Dies lieferte abschließend Hinweise darauf, dass die veränderte Adhäsion der Keratinozyten auf Fibronectin und Kollagen durch eine verstärkte

Proteinexpression von Integrin- $\beta_1$  vermittelt sein könnte, da neben der Gesamtmenge auch vermehrt die aktivierte Form des  $\beta_1$  Monomers zu detektieren war.

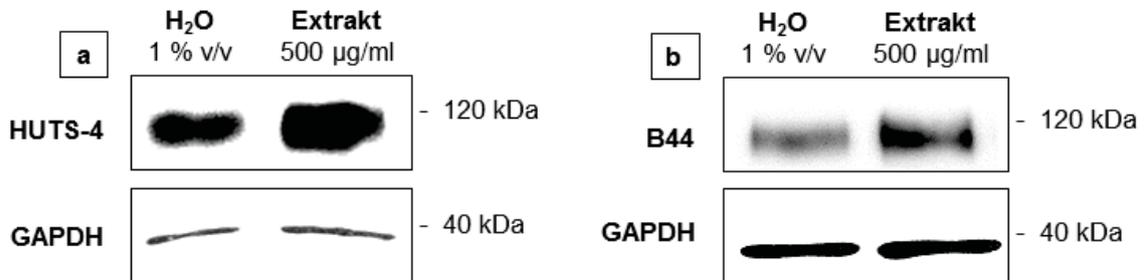


Abb. 47

**Einfluss von *Lucilia sericata* Extrakt auf die Aktivierung des Integrins  $\beta_1$  (ausgesuchter versuch).** Die Zellen wurden in Kavitäten von 6-Loch Platten kultiviert. Sie wurden mit den Extrakten für 48 Stunden behandelt. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

## 4.2 Analyse der wundheilungsfördernden Wirkung von *Lucilia sericata*

### Extrakten auf Vollhautmodelle

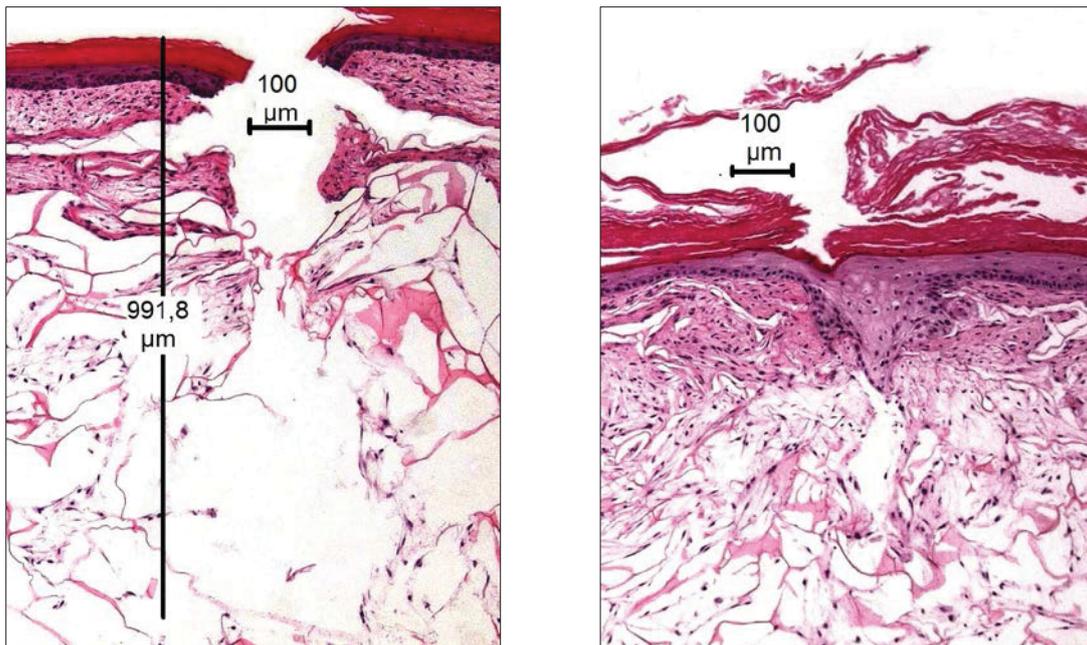
Nachdem in den Monolayerversuchen erste Einflüsse des *Lucilia sericata* Extraktes auf die Wundheilung nachgewiesen werden konnten, sollte die Relevanz der Befunde an einem Vollhautmodell verifiziert werden. Hierzu wurde das Phenion® „Full-Thickness Skin Models“ (Vollhautmodell) ausgewählt. Es verfügt neben der Epidermis auch über eine umfangreiche Dermis. Die darin eingelagerten Fibroblasten vermögen u.a. sekundär ECM aufzubauen, zu der auch Elastin zählt, das in anderen kommerziell erhältlichen Vollhautmodellen nicht nachzuweisen ist (Mewes et al. 2007 [67]).

Zunächst wurden verschiedene Verwundungsmethoden etabliert und vergleichend untersucht. Die Experimente wurden mit mindestens zwei Vollhautmodellchargen in voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Methoden zu ermöglichen, das experimentelle Vorgehen auf die Verwendung einer Extraktcharge konzentriert.

#### 4.2.1 Inzision

Das Einschneiden wurde mit dem Instrument Surgicutt® durchgeführt. Die Extraktbehandlung erfolgte ab dem Verwundungstag insgesamt fünfmal (Tag 1-5). Proben wurden sechsmal abgenommen (Tag 1-5 und 8). Im Anschluss erfolgte die histologische Auswertung.

Dabei kam es zu folgendem Ergebnis: die Verwundungsmethode lieferte nahezu konstant tiefe und breite Wunden (**Abb. 48**). Die Wunden waren jedoch entweder am ersten, spätestens jedoch am zweiten Tag nach der Verwundung bereits wieder verschlossen. Somit schied diese Verwundungsmethode aus, denn in diesem kurzen Zeitraum wären die möglichen wundheilungsfördernden Effekte der *Lucilia sericata* Extrakte nur schwerlich von den Kontrollen unterscheidbar.



**Abb. 48**

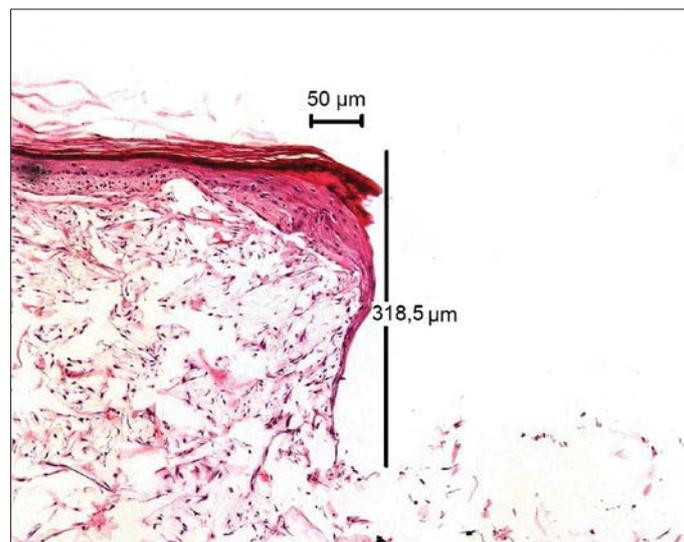
**Inzision:** Hämatoxylin-Eosin gefärbte Querschnitte des Phenion® „Full-Thickness Skin Models“ am gleichen Tag (ALI-Tag 12) (**links**) und zwei Tage (ALI-Tag 14) (**rechts**) nach Verwundung. Die Verwundung wurde dem Instrument Surgicutt® durchgeführt. Im Bild rechts ist die Wunde durch die Epidermis verschlossen.

#### 4.2.2 Exzision

Um eine größere Wunde zu generieren, die über einen längeren Zeitraum heilen würde, wurde eine weitere Verwundungsmethode mit dem Instrument STIEFEL® BIOPSY PUNCH entwickelt. Mit Hilfe des Punchs wurde an Tag 1 eine Biopsie vom Phenion® „Full-Thickness Skin Model“ entnommen. Das so „verwundete“ Modell wurde am selben und den darauf folgenden 4 Tagen mit Extrakt behandelt. Zur Überprüfung der Wundheilung wurden an Tag 1, 3, 5, 8 und 15 nach den Biopsienahmen jeweils 2 Modelle zur histologischen Auswertung entnommen.

Es zeigte sich, dass die Wundbreite bei allen Modellen sehr ähnlich war. Allerdings variierte die Wundtiefe teilweise stark zwischen den Vollhautmodellen. Zwar war die Extraktbehandlung aufgrund des klar sichtbaren Wundbereichs einfach durchzuführen, die Wundheilung verlief durch die Größe der Wunde jedoch sehr langsam. Auch zwei Wochen nach der Verwundung waren nicht alle Wunden verheilt. Dies lag darin begründet, dass die neu gebildete Epidermis zunächst die Strecke bis zum Wundboden zurücklegen musste (**Abb. 49**). Dies

nahm ca. eine Woche in Anspruch, bevor das anschließende Bedecken des Wundbodens über einen Zeitraum von zwei Wochen erfolgte. Die Verwendung des Vollhautmodells wird jedoch für einen Zeitraum von 2 Wochen empfohlen. Die Nutzung dieser neuen Methode würde grundsätzlich über den optimalen Nutzungszeitraum des Vollhautmodells hinausgehen. Die Verwendung von Vollhautmodellen anderer Anbieter wäre nicht von Vorteil gewesen, da sie über keinen größeren Nutzungszeitraum verfügen.



**Abb. 49**

**Exzision:** Hämatoxylin-Eosin gefärbter Querschnitt des Phenion<sup>®</sup> „Full-Thickness Skin Models“ eine Woche nach Verwundung (ALI-Tag 19). Die Verwundung wurde mit dem Instrument STIEFEL<sup>®</sup> BIOPSY PUNCH durchgeführt. In diesem Fall ist eine etwa 0,3 mm tiefe Wunde entstanden. Die epitheliale Migrationsspitze hat an diesem Tag den Wundboden erreicht.

### 4.2.3 Hitzeeinwirkung

Hierbei wurden zwei Ansätze verfolgt:

#### 1. Verbrennung

Die Verbrennung wurde mit Hilfe eines Lötkobens (LUX<sup>®</sup>) vorgenommen. Es stellte sich heraus, dass erst ab einer Kontaktzeit von 12sec eine ausreichende Verwundung zustande kam. Diese Verwundung war jedoch so gravierend, dass die Dermis sehr tief (manchmal bis zum Filterpapier) zerstört wurde. Diese großen Wunden heilten nicht bis zum Ende der maximalen Beobachtungszeit (2 Wochen), und eine topische Extraktapplikation war auf Grund der Wundgröße nicht mehr möglich (der Extrakt erreichte sofort das Medium).

### **2. Verbrühung**

Die Verbrühung wurde mit Hilfe eines speziell angefertigten Edelstahlstabes, dessen Endstück ein Quadrat mit einer Kantenlänge von 6x6 mm war, durchgeführt. Die Verwundungszeit betrug 15 sec. Die Versuchszeit (Beobachtungszeitraum) betrug 2 Wochen. Es stellte sich heraus, dass diese Wunden wenig standardisiert gesetzt werden konnten, da die verwundeten Modelle eine hohe Varianz untereinander aufwiesen und somit kein geeignetes Testsystem bildeten, um Extrakteffekte zu unterscheiden.

Auf Grund der gewonnenen Erfahrung konnte jedoch eine neue Verwundungsmethode entwickelt werden.

#### **4.2.4 Kälteverwundung**

Die Verwundung wurde hier mit Hilfe des oben erwähnten Edelstahlstabes durchgeführt, der zuvor in flüssigen Stickstoff getaucht wurde. Es hat sich in Vorversuchen herausgestellt, dass eine Verwundungszeit von 15sec optimale Wunden produzierte.

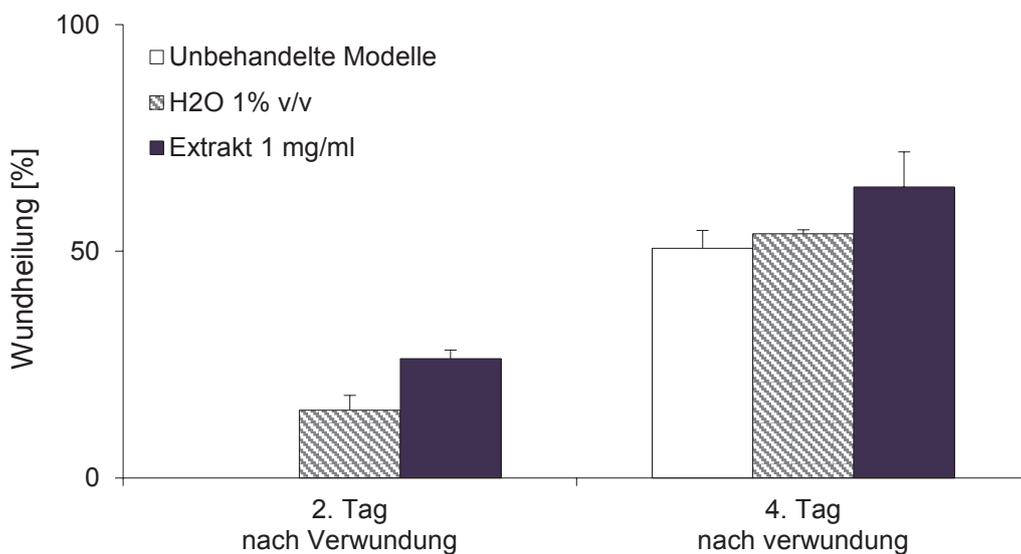
Die histologische Auswertung wies eine hohe Standardisierbarkeit nach. Die Wunden waren im Durchschnitt 6mm breit, wobei die Abweichungen in der Wundbreite weniger als 5% betragen. Die epithelialen Zellen, die bei der Verwundung unterhalb des Stabes gelegen waren, waren in allen Fällen abgestorben. Spätestens am ersten Tag nach Verwundung hob sich die abgestorbene Epidermis von der Dermis ab. Diese „Blasenbildung“ ist in sämtlichen Fällen entstanden. Die Stellen, an denen die (alte) Epidermis noch an der Dermis haftete, dienten als Startpunkte für die epitheliale Regeneration und zugleich als Orientierungsstellen für die Auswertung. Die Wundtiefe reichte bis zur unteren Seite des Vollhautmodells und war in allen verwundeten Vollhautmodellen gleich. Eine Extraktapplikation erfolgte topisch auf die abgestorbene Epidermis, die die sofortige Penetration der Probe durch die Wunde in das Medium verhinderte.

Nachdem somit sichergestellt wurde, dass diese Verwundungsmethode die speziellen Versuchsvoraussetzungen erfüllte, wurden Versuche mit dem Extrakt

und den entsprechenden Kontrollen (H<sub>2</sub>O; Lösungsmittelkontrolle und BSA; Proteinkontrolle) durchgeführt.

Die Versuche mit Monolayerkulturen lieferten Hinweise, dass zum einen das Extrakt erst ab einer Konzentration von 500 µg/ml eindeutige Effekte entfalten würde und zum anderen, dass diese Effekte am wahrscheinlichsten bei Keratinozyten zu erwarten wären. Somit wurde auf eine Extraktkonzentration von 1mg/ml und auf die epitheliale Regeneration ein erster Focus gesetzt.

Aus diesem Grund wurde zunächst folgendes experimentelle Setup gewählt: Die Extraktbehandlung erfolgte ab dem Verwundungstag insgesamt fünfmal (Tag 1-5). Proben wurden sechsmal abgenommen (Tag 1-5 und Tag 8). Im Anschluss erfolgte die histologische Auswertung.

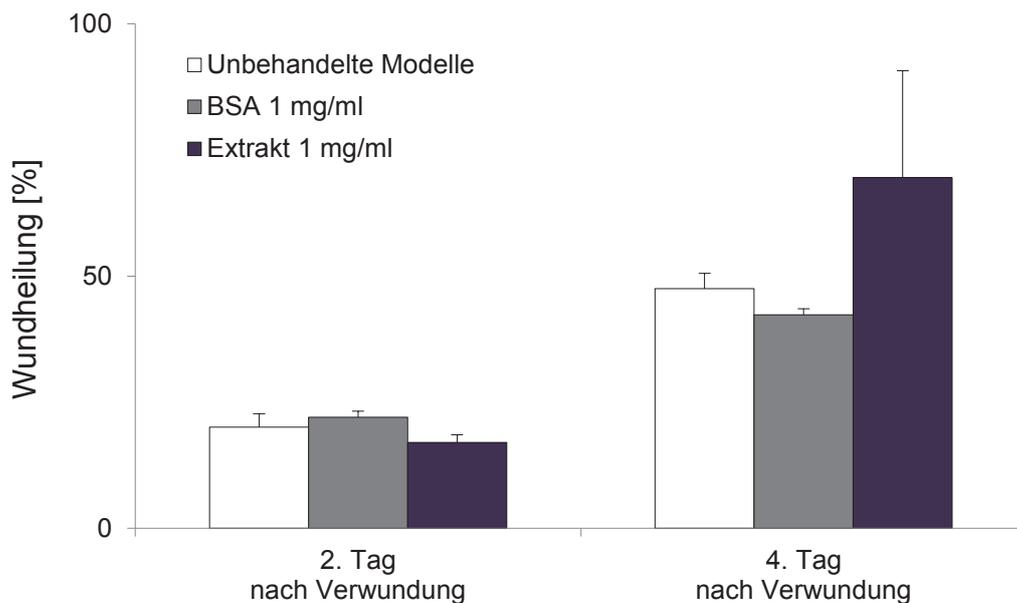


**Abb. 50**  
**Vollhautmodelle, die mit Extrakt behandelt wurden, weisen eine verbesserte epidermale Wundheilung auf.** Die Vollhautmodelle wurden durch einen im flüssigen Stickstoff gekühlten Edelstahlstab verwundet. Sie wurden entweder unbehandelt belassen oder mit H<sub>2</sub>O (1% v/v) oder mit Extrakt (1 mg/ml) von *Lucilia sericata* jeden Tag ab Verwundung topisch behandelt. Werte sind Mittelwerte [%] +/- Standardabweichung.

Aufgrund des großen Umfangs der Versuchsansätze, konnten nicht alle Versuchsansätze in einem Experiment vereint werden. Aus diesem Grund wurde der Effekt von *Lucilia sericata* Extrakt zunächst im Vergleich zum Lösungsmittel untersucht. Das Ergebnis der Wundheilungsberechnung ist eindeutig (**Abb. 50**). Schon ab dem zweiten Tag nach Verwundung wiesen mit Extrakt behandelte Vollhautmodelle eine verbesserte epidermale Wundheilung auf. Am vierten Tag

nach der Verwundung betrug der Unterschied 10% gegenüber den mit dem Lösungsmittel behandelten Vollhautmodellen. Am 7. Tag nach Verwundung waren alle Wunden geschlossen.

Als nächstes wurde überprüft, ob es sich bei dem beobachteten Effekt um einen unspezifischen Effekt handeln könnte, der durch den hohen Proteingehalt bedingt sein könnte. Zu diesem Zweck wurden Vollhautmodelle nicht nur mit dem Extrakt behandelt, sondern parallele Ansätze erhielten BSA in gleich hoher Konzentration von 1 mg/ml. Vier Tage nach Verwundung wiesen mit Extrakt behandelte Ansätze eine um 15% verbesserte epidermale Wundheilung gegenüber der unbehandelten Vollhautmodellen auf. BSA führte zu einem leichten, nicht signifikanten, Rückgang der Wundheilung (**Abb. 51**). Am 7. Tag nach Verwundung waren alle Wunden geschlossen.

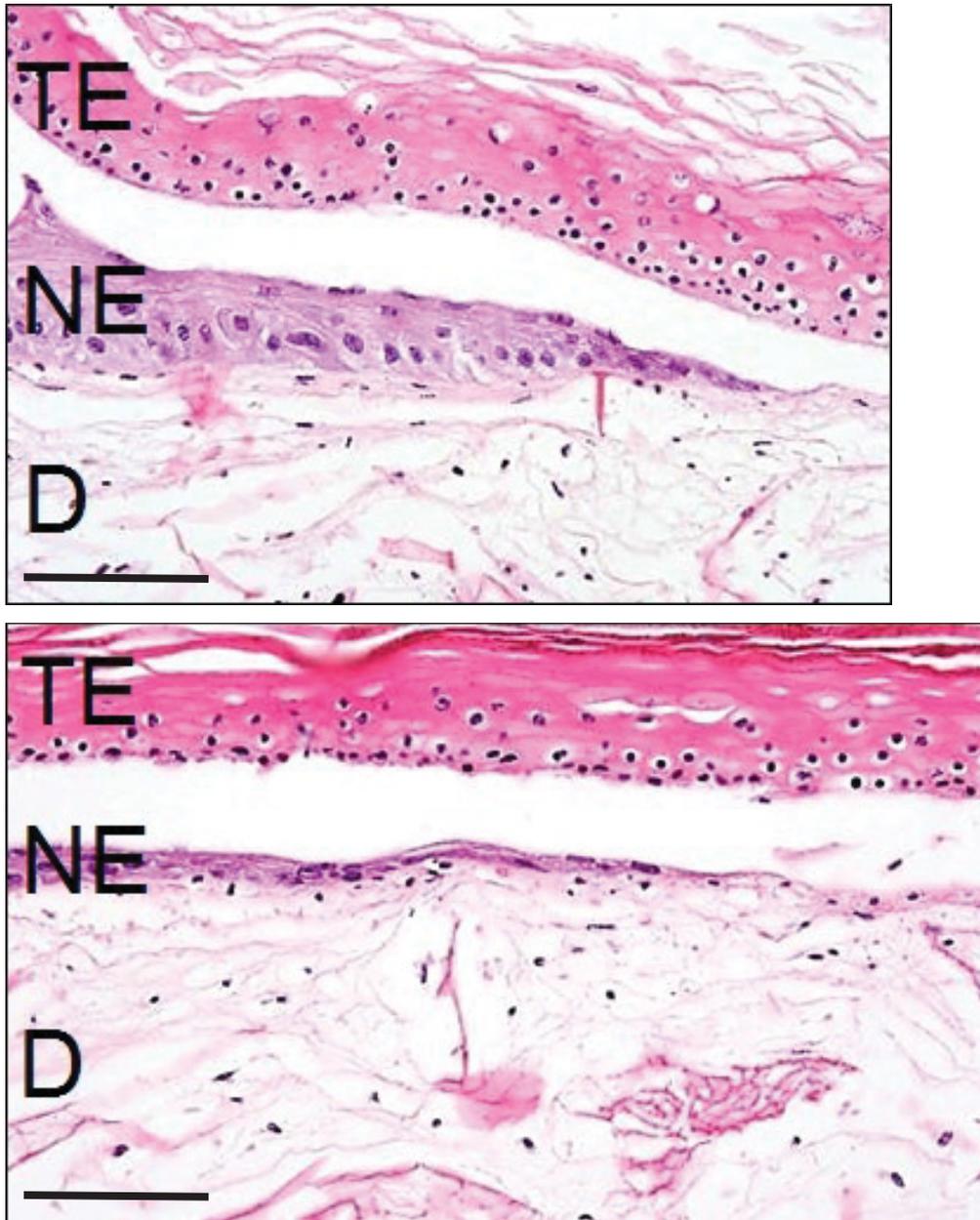


**Abb. 51**

**Die durch *Lucilia sericata* behandelten Vollhautmodelle wiesen eine verbesserte epidermale Wundheilung auf.** Die Vollhautmodelle wurden durch einen im flüssigen Stickstoff gekühlten Edelstahlstab verwundet. Sie blieben entweder unbehandelt oder wurden jeden Tag mit BSA (1 mg/ml) oder mit Extrakt (1mg/ml) topisch behandelt. Werte sind Mittelwerte [%] +/- Standardabweichung.

Neben den Unterschieden in der Wundheilungsgeschwindigkeit gab es noch Unterschiede, welche die Form der Neo-Epidermis betrafen (**Abb. 52**). In allen Versuchen zeigte die Neo-Epidermis von mit Extrakt behandelten Vollhautmodellen eine flache Form, die zumeist nur aus einer Zellschicht bestand.

Zudem erschienen die Zellen der Neo-Epidermis in histologischen Schnitten abgeflacht und verlängert. Die Neo-Epidermis von unbehandelten Modellen dagegen war mehrschichtig. Allein die Migrationsspitze bestand aus einer Zellschicht. Nur dort erschienen die Zellen abgeflacht und verlängert.



**Abb. 52**  
Die durch *Lucilia sericata* behandelten Vollhautmodelle wiesen eine veränderte Neo-Epidermis auf. Hämatoxylin-Eosin gefärbter Querschnitt des Phenion® „Full-Thickness Skin Models“ 4 Tage Woche nach Verwundung. Die Vollhautmodelle wurden durch einen im flüssigen Stickstoff gekühlten Edelstahlstab verwundet. Sie blieben entweder unbehandelt oder wurden jeden Tag mit Extrakt (1 mg/ml) ab Verwundung topisch behandelt. **TE**; Tote-Epidermis, **NE**; Neo-Epidermis, **D**; Dermis. **Balken**; 50 µm

Die bisherigen Experimente hatten wie die Monolayerversuche gezeigt, dass der Extrakt Einfluss auf das Verhalten von Keratinozyten während der Wundheilung hat. Zwar zeigte der Extrakt in den Monolayerversuchen keinen Einfluss auf Fibroblasten, in einem mehr *in vivo* nahen Testsystem wie dem Vollhautmodell, wäre ein davon abweichendes experimentelles Ergebnis allerdings nachzuvollziehen.

Zur Untersuchung der dermalen Regeneration nach Wundsetzung wurde folgendes experimentelles Design gewählt. Die verwundeten Modelle wurden fünfmal (Tag 1-5) mit dem Extrakt behandelt. Zur Analyse der Wundheilung wurden an Tag 1, 3, 5, 8 und 15 jeweils 2 Hautmodelle entnommen.

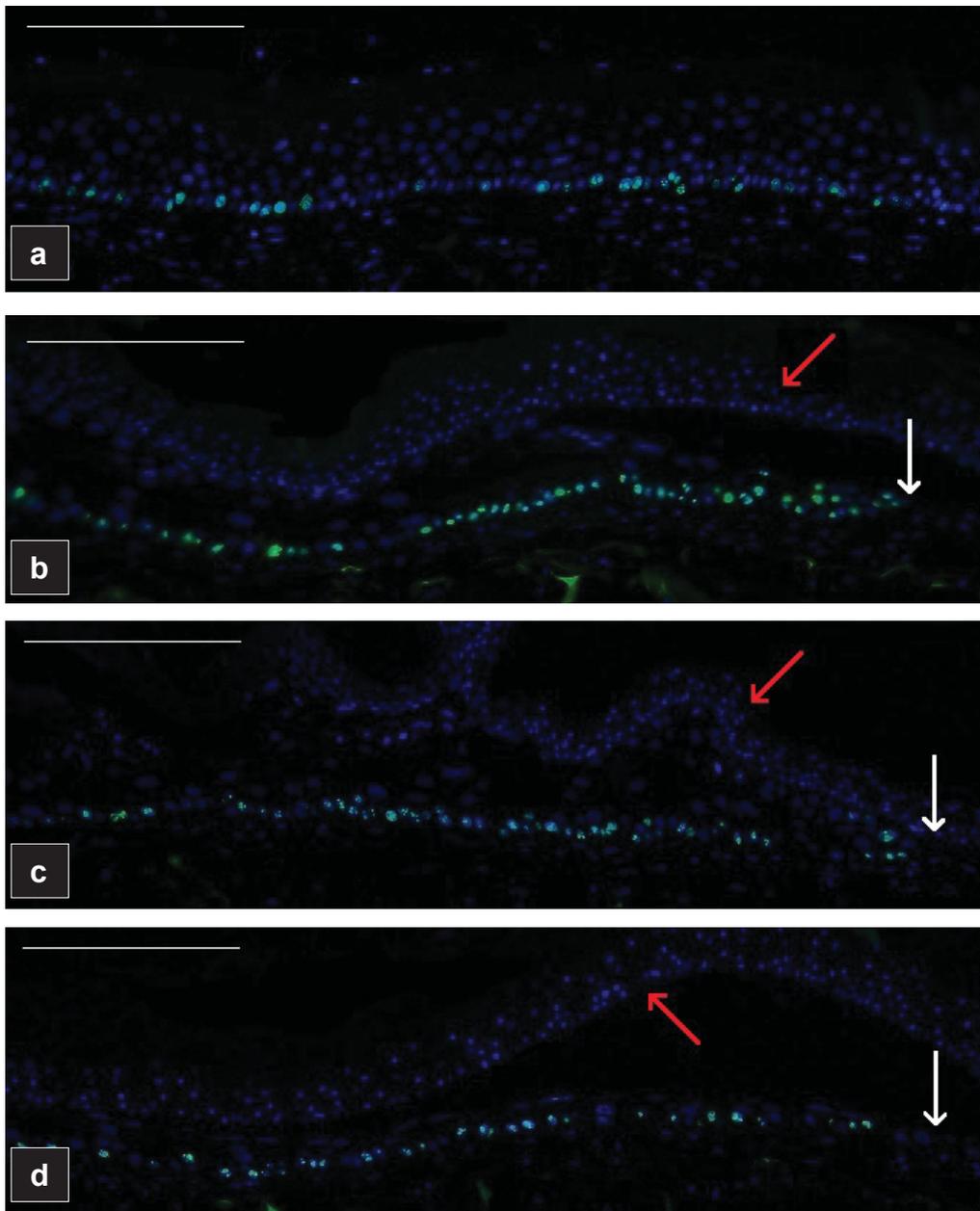
Die histologische Analyse zeigte, dass zwei Wochen nach der Verwundung vitale Fibroblasten in den Bereich der Wunde eingewandert waren. Eine signifikante dermale Regeneration oder gar der komplette Schluss der Wunde im Bereich der Dermis hätte allerdings länger als zwei Wochen in Anspruch genommen und somit den Nutzungszeitraum des Hautmodells überschritten. Deshalb wurde von einer weiteren Untersuchung der Dermis im Rahmen der vorgelegten Arbeit abgesehen.

#### **4.2.5 Immunhistochemischer Nachweis von Ki67**

Um die Wirkung des Extraktes auf die Keratinozyten eingehender zu beleuchten wurde die Proteinexpression von Ki67 immunhistochemisch untersucht. Dabei handelt es sich um ein Protein, das in den aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Die immunhistochemische Untersuchung sollte Aufschluss darüber geben, ob die raschere epidermale Wundheilung mit einer erhöhten Proliferation der beteiligten Keratinozyten einherging. Kerne von Zellen, die mit dem Anti-Ki67 Antikörper markiert wurden, erschienen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Querschnitten des Vollhautmodells grün. Die restlichen Kerne wurden mit DAPI gefärbt und erschienen blau.

Für den Ki67 Nachweis wurden Vollhautmodelle aus Versuchen wie zuvor im **Kapitel 4.2.4** verwendet. Als Kontrolle dienten Vollhautmodelle, die (a) nicht verwundet wurden und unbehandelt blieben, die (b) verwundet und mit dem

Lösungsmittel behandelt wurden oder die (c) verwundet und mit BSA, in der gleichen Konzentration wie der eingesetzte Extrakt behandelt wurden (**Abb. 53**).



**Abb. 53**

**Immunohistochemischer Nachweis von Ki67.** Die durch den Antikörper markierten Kerne sind grün. Nicht markierte Kerne sind blau. Querschnitt des Phenion® „Full-Thickness Skin Models“ 3 Tage nach Verwundung (ALI-Tag 15). Die Vollhautmodelle wurden durch einen im flüssigen Stickstoff gekühlten Edelstahlstab verwundet. Sie wurden über jeden Tag entweder nicht behandelt oder entweder mit BSA (1 mg/ml) oder mit Extrakt (1 mg/ml) jeden Tag ab Verwundung topisch behandelt. **a**; nicht verwundetes und unbehandeltes Vollhautmodell, **b**; verwundet und unbehandeltes Vollhautmodell, **c**; verwundetes und mit BSA behandeltes Vollhautmodell, **d**; verwundetes und mit Extrakt behandeltes Vollhautmodell. **Balken**, 200 µm; **weiser Pfeil**, Migrationsspitze; **roter Pfeil** tote Epidermis.

Auf dem ersten Blick sind auf **Abbildung 53** einige Unterschiede sichtbar. Das unverwundete Vollhautmodell (**Abb. 53 a**) weist eine geringere Ki67 Expression im Vergleich zu den verwundeten Vollhautmodellen (**Abb. 53 b-d**) auf. Zudem ist die Ki67 Färbung in den verwundeten und parallel mit BSA behandelten sowie den parallel unbehandelten Vollhautmodellen nicht nur in den basalen Keratinozyten sondern auch in der suprabasalen Schicht der Epidermis an der Migrationsspitze zu erkennen (weiser Pfeil). Die Expression in den mit Extrakt behandelten Modellen blieb hingegen auf die Keratinozyten der Basalschicht beschränkt. In den Bereichen der einschichtigen Neo-Epidermis war die Ki67 ebenfalls deutlich zu erkennen.

Zur Berechnung der Proliferation wurde auf einer bestimmten Strecke der histologischen Schnitte, die im Fall der verwundeten Vollhautmodelle an der Migrationsspitze anfang und dann in Richtung Vollhautmodellrand verlief, die Relation der Ki67-markierten Zellen zur Gesamtzellzahl berechnet.

Dabei wiesen verwundete Modelle, die unbehandelt blieben oder mit BSA behandelt worden waren, im Durchschnitt eine etwa 25% höhere Ki67 Expression als unverwundete, unbehandelte Vollhautmodelle auf. Verwundete und mit Extrakt behandelte Vollhautmodelle wiesen im Durchschnitt eine etwa 18% höhere Ki67 Expression als unverwundete Vollhautmodelle auf und lagen damit etwas unter den eben beschriebenen Werten. Der Unterschied kann aufgrund der geringen Abweichung und des qualitativen Charakters der Methode nicht als relevant bezeichnet werden.

In dieser ersten umfassenden Analyse des *Lucilia sericata* Extraktes weisen sowohl die Ergebnisse der Monolayer-Versuche als auch die Ergebnisse der Wundheilungsversuche am Phenion® „Full-Thickness Skin Model“ auf einen möglichen Einfluss der Extrakte auf die kutane Wundheilung hin.

## 5 Diskussion

Die Wundheilung ist ein mehrstufiger Prozess, der verschiedene Zelltypen einschließt und einer feinen Regulation unterliegt. Störungen in einer seiner Teilstufen, wie z.B. der Inflammation oder der Granulation, können den Heilungsprozess erheblich verzögern oder ihn zum Erliegen bringen (chronische Wunden). Die Behandlung und Pflege solcher schwer heilenden oder chronischen Wunden hat große soziale und ökonomische Auswirkungen [60].

Den lebenden Larven der Goldfliege *Lucilia sericata* wird seit Jahrzehnten eine Wirkung bei der Therapie von schwer heilenden Wunden zugeschrieben. Eine systematische Erforschung des Sachverhaltes begann zu Beginn des letzten Jahrhunderts, wurde jedoch durch die aufkommende Verwendung von Antibiotika nicht weitergeführt. Durch die Zunahme multiresistenter Bakterienstämme wuchs das Interesse an *Lucilia sericata* zu Beginn dieses Jahrhunderts allerdings wieder an, so dass heute vielerorts *Lucilia sericata* Fliegenlarven zur Behandlung von chronischen Wunden eingesetzt werden. Die Fliegenlarven bewirken eine Nekrosektomie sowie über die antimikrobielle Wirksamkeit, vorzugsweise gegenüber grampositiven Bakterien, eine Verringerung der bakteriellen Kolonisation der Wunden [61].

Es gibt jedoch auch Limitationen des Einsatzes von *Lucilia sericata* Fliegenlarven. Auf Grund der begrenzten Lebensdauer der Fliegenlarven müssen wiederholt häufige Verbandswechsel stattfinden. Entsprechend muss die Logistik, bestehend aus Bestellung und Lieferung der Fliegenlarven, abgestimmt sein [62]. Aber auch Schmerzen und potentielle Infektionen durch nicht sterile Fliegenlarven gehören zu den Problemen der „Madenherapie“ [63].

Diese Nachteile könnten zum Teil durch die Verwendung isolierter Bestandteile der Fliegenlarven ausgeglichen werden (**Tabelle 1, Seite 18**)

Hier setzt die vorliegende Arbeit an. Ziel war es, eine erste systematische Untersuchung an einem neuen Ganzkörperextrakt von *Lucilia sericata* Larven durchzuführen und Hinweise auf die eventuelle Wirkweise des Extraktes zu

sammeln. Solche Hinweise könnten für die Entwicklung von Medikamentationen als wesentlich bewertet werden.

Die Bearbeitung des Themas konzentrierte sich auf Fibroblasten und Keratinozyten, die die überwiegende Zahl an Hautzellen ausmachen. Dazu wurden zwei *in vitro* Testsysteme eingesetzt. Jeweils eine zweidimensionale (2D) Monolayerkultur, bei der zwei Zelltypen verwendet wurden und ein dreidimensionales (3D) Vollhautmodell-System, das beide Zelltypen vereinte.

Die Kombination beider Systeme bringt sehr viele Vorteile mit sich. Die große Verfügbarkeit von Zellen im Monolayersystem kann zum einen eine große Anzahl von Ansätzen (verschiedene Extraktkonzentrationen und Kontrollen) ermöglichen, die in einem organotypischen Vollhautmodell mit enormen Kosten und logistischem Aufwand verbunden wären. Andererseits ermöglicht ein Vollhautmodell aufgrund seiner organotypischen dreidimensionalen Struktur eine bessere Annäherung an die *in vivo* Wundheilung.

In einer ersten Phase der Untersuchungen wurden Monolayerkulturen von Fibroblasten und Keratinozyten verwendet, um gezielt nach Hinweisen bezüglich einer wundheilungsfördernden Wirkung zu suchen. Dazu wurde der komplexe Vorgang der Wundheilung in Einzelphasen gegliedert. Insgesamt wurden Zellen von vier Biopsien untersucht, um Spender-abhängige Effekte ausschließen zu können.

Zunächst musste jedoch geklärt werden, ob der Extrakt negative Einflüsse auf den generellen Status der Zellen ausübte. Zu diesem Zweck wurde die Vitalität der Zellen, anhand der mitochondrialen Aktivität untersucht. Einschließlich der maximal eingesetzten Konzentration von 500 µg/ml konnten keine signifikanten Änderungen der mitochondrialen Aktivität, nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden, in Fibroblasten oder Keratinozyten beobachtet werden. Der Extrakt konnte demnach als nicht-zytotoxisch eingestuft werden. Diese Befunde gleichen früheren Untersuchungen, die sich allerdings nicht mit dem Extrakt sondern mit den Produkten der Larvenssekretion bzw. -exkretion beschäftigt haben [22,64].

Nachdem sich die Extrakte als unbedenklich bezüglich der Vitalität gezeigt haben, wurden die Extrakte in Assays untersucht, die einzelne Phasen der Wundheilung

repräsentieren. Dabei wurden die gleichen Konzentrations- und Kultivierungsbedingungen gewählt.

Zunächst wurde die Zellproliferation untersucht. Der Extrakt rief in keinem der untersuchten Zelltypen eine proliferationsmodulierende Wirkung hervor. Zwar konnte Prete 1997 [20] einen positiven proliferativen Effekt der Hämolymphe und von Produkten der Larvenssekretion bzw. -exkretion von *Phaenicia sericata* (Synonym für *Lucilia sericata*), in Fibroblasten feststellen, allerdings zeigten verschiedene spätere Untersuchungen mit Larvenssekreten bzw. -exkreten keine pro-proliferativen Effekte bei Fibroblasten oder Keratinozyten [22,23,64]. Darüber hinaus zeigte eine neuere Untersuchung von 3-Guanidinopropionsäure und Histidin zwei Bestandteilen von Larvenssekreten bzw. -exkreten, einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von Fibroblasten und einen pro-proliferativen Effekt auf Endothelzellen [26].

Da die Zellproliferation unbeeinflusst blieb, wurde die Adhäsion der Zellen als weiterer Teilprozess der Wundheilung untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen wurden bereits in den vorangegangenen Experimenten zur Vitalität als unbedenklich charakterisiert. Die gleichen Konzentrationen, Inkubationszeiten und Zellspender wurden auch im folgenden Adhäsions-Assay eingesetzt. Nachdem die Zellen für 48 Stunden mit dem Extrakt behandelt wurden, wurde die Adhäsion an Fibronectin sowie an Kollagen Typ I und IV bestimmt. Der Ansatz umfasste somit die Mehrzahl der Bestandteile der extrazellulären Matrix, die für den Prozess der Wundheilung als maßgeblich beschrieben wurden [133,134].

In Experimenten mit Fibroblasten von unterschiedlichen Zellspendern konnten keine signifikanten Effekte auf die Adhäsion beobachtet werden. Dies traf sowohl auf Ansätze zu, in denen die Zellen in Minimalmedium kultiviert wurden, als auch auf Ansätze mit Kompletmedium, die alle unterstützenden Zusätze enthielt. Dieser Ansatz wurde gewählt, um zu überprüfen, ob die Zellen durch das Minimalmedium nur unzureichend versorgt waren und nicht mehr in der Lage waren, auf die Extrakte zu reagieren.

Im Gegensatz zu den Fibroblasten wurde die Adhäsionsbereitschaft von Keratinozyten nach Extraktbehandlung positiv beeinflusst. Bei einer

Extraktkonzentration von 500 µg/ml wurde eine erhöhte Adhäsion der Zellen von durchschnittlich 10% an Kollagen Typ I und IV beobachtet. Wegen der nicht geringen Standardabweichungen wurde dieser Effekt jedoch nicht als biologisch relevant betrachtet. Die gleiche Extraktkonzentration induzierte allerdings eine Adhäsionserhöhung an Fibronectin um durchschnittlich 30%. Die Unterschiede zwischen den mit Extrakt behandelten und den unbehandelten Zellen waren statistisch signifikant ( $P < 0,01$ ) und wurden aufgrund der Deutlichkeit auch biologisch relevant eingestuft. Der Adhäsionserhöhung konnte zudem eine gewisse Dosisabhängigkeit zugesprochen werden, da die Induktion bereits bei einer Extraktkonzentration von 100 µg/ml zu erkennen war, wenn auch noch nicht signifikant. Die Effekte ließen sich zudem mit unterschiedlichen Spendern reproduzieren und wiesen somit auf einen allgemeingültigen Effekt hin. Abschließend wurden Keratinozyten nicht nur mit dem Extrakt behandelt, sondern parallel mit derselben Konzentration an BSA, um zu kontrollieren, ob es sich um einen unspezifischen Effekt, bedingt durch eine hohe Proteinkonzentration, handelte. Da 500 µg/ml BSA keinen Effekt auf die Keratinozyten hatte, konnte die Induktion der Adhäsion dem Extrakt zugeschrieben werden.

Die Adhäsion von Keratinozyten auf Kollagen des Typs I und IV sowie an Fibronectin wird durch Integrine vermittelt. Es handelt sich um die funktionellen Integrindimere  $\alpha_5\beta_1$  (wichtigster Kontakt zu Fibronectin auf der Zelloberfläche) und  $\alpha_2\beta_1$  (vermittelt Kontakt zu Kollagenen) [98].

Um zu überprüfen, welche Rolle die Integrine bei der erhöhten Adhäsion von Keratinozyten nach Extraktbehandlung an die EZM Komponenten haben, wurde die Proteinexpression von Integrin- $\beta_1$  untersucht. Dieses Monomer ist Bestandteil aller aktiven Dimere, die eine Rolle bei der Adhäsion von Keratinozyten an die oben genannten Substrate spielen. Für diese Untersuchungen wurden die gleichen Keratinozytenspender sowie die gleichen Versuchsbedingungen der Adhäsionsversuche verwendet.

Die Western Blots zeigten zwei Banden. Die obere Bande repräsentierte die maturierte Form des Integrin- $\beta_1$ , das glykosyliert eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-PAGE aufwies als das nicht glykosylierte unreife Protein. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen, exprimierten mit Extrakt behandelte Keratinozyten im Durchschnitt 20% mehr reifes Integrin- $\beta_1$ . Bei der

Untersuchung des nicht-glykosylierten unreifen Proteins, das durch die untere Bande repräsentiert wurde, konnte sogar eine Verdopplung der Proteinexpression nach Extraktbehandlung beobachtet werden. Nachdem diese Ergebnisse eine Zunahme des Gesamtproteins nahe legten, wurde im Weiteren untersucht, ob die Extraktbehandlung ebenfalls zu einer verstärkten Aktivierung des Integrin- $\beta_1$  führte. Erste Hinweise dazu lieferte die Zunahme der glykosylierten Form. Diese post-translationale Modifikation wird im Zytoplasma der Zelle vorgenommen, bevor das Monomer in die Zellmembran transferiert wird, um an der Zelloberfläche präsentiert zu werden und in Funktion zu treten [93,94].

Für weitere Analysen sind Antikörper eingesetzt worden, deren jeweiliges Epitop erst nach Aktivierung des Integrins für den Antikörper zugänglich wird. Die Aktivierung geht mit einer Konformationsänderung einher, bei der das Integrin von der inaktiven, gebeugten Form in die aktive, gestreckte Form überwechselt [96]. Zum einen handelte es sich um einen Antikörper, der die substratunabhängige Hybrid-Domain erkennt, die unterhalb des Integrin Kopfes lokalisiert ist [97], zum anderen wurde ein Antikörper verwendet, der die Kopfregion des Integrins, die so genannte „Ligand Induced Binding Site“ (LIBS) [95], nach Bindung an spezifisches Substrat erkennt. Nach Extraktbehandlung von Keratinozyten konnte durch beide Antikörper deutlich mehr Protein (30-50%) im Western-Blot visualisiert werden.

Alle drei Ansätze lieferten somit Hinweise, dass nicht nur die Gesamtmenge an Integrin- $\beta_1$  durch den Larvenextrakt erhöht werden kann, sondern auch deren Aktivität. Die Einbeziehung der Adhäsionsversuche in die Analyse, die mit dem gleichen experimentellen Design durchgeführt wurden, lässt vermuten, dass durch die Aktivierung des Integrin- $\beta_1$  die Adhäsionsbereitschaft an die spezifischen Substrate (Fibronectin und Kollagene I und IV) erhöht wurde.

Einen weiteren zentralen Prozess im Rahmen der Wundheilung stellt die Migration dar. Die Migrationsgeschwindigkeit von Zellen kann in 2D Kulturen durch den sog. „*in vitro* scratch assay“ untersucht werden [65]. Hierzu werden Zellen aus 2D-Monolayerkulturen gradlinig abgeschabt. So werden zellfreie Areale (Wunden) geschaffen, die danach durch Zellmigration wieder geschlossen werden. Diese Testmethode weist allerdings Limitationen hinsichtlich ihrer Standardisierbarkeit auf. So weisen die Wunden unregelmäßige Ränder auf,

welche die Vermessung der Migrationsgeschwindigkeit erschweren und dadurch die Reproduzierbarkeit der Methode herabsetzen. Zudem werden Zellen bei der Wundsetzung verletzt, die Chemokine und Wachstumsfaktoren freisetzen, welche die Migration der Zellen beeinflussen können und somit die eigentliche Untersuchung verfälschen.

Aus diesem Grund wurden die folgenden Untersuchungen mit dem *in vitro* Wundheilungsassay (Fa. Ibidi®) durchgeführt. Hierzu werden die Zellen in Kavitäten eines speziell entwickelten Inserts kultiviert, nach dessen Entfernen sie durch einen vordefinierten Abstand voneinander getrennt sind. Dabei entstehen keine unregelmäßigen Ränder und keine Zellverletzungen. Dadurch wurde eine hoch reproduzierbare Wundsetzung ermöglicht, ohne die Zellen zu beeinträchtigen. Aufgrund der geringen Größe des Inserts und der dadurch verringerten Kultivierungsfläche musste die Inkubationszeit des Extraktes auf maximal 24 Stunden reduziert werden.

Mit diesem optimierten experimentellen Setup konnte kein signifikanter Einfluss des Extraktes auf die Migration von Fibroblasten oder von Keratinozyten auf nicht beschichteten Oberflächen beobachtet werden.

Auf Fibronectin jedoch erniedrigte sich die Migrationsgeschwindigkeit von Keratinozyten durchschnittlich um 25% gegenüber unbehandelten Zellen.

Dieses Ergebnis fügt sich nahtlos in die bisherigen Befunde ein: Voraussetzung für die Migration von adhären Zellen ist eine fein regulierte Adhäsion an die umgebende EZM, die bei den vorliegenden Untersuchungen von Fibronectin sowie Kollagen Typ I und IV repräsentiert wurde. Fibronectin ist Bestandteil der provisorischen Matrix, Kollagen Typ I und IV sind Bestandteile der Dermis. Keratinozyten kommen mit allen drei Substraten in Kontakt.

Nachdem eine Wunde zunächst zügig durch ein Fibringerinnsel geschlossen wird, migrieren Keratinozyten auf einer Fibronectinschicht, um den Wundbereich abzudecken [99]. Anschließend migrieren die Keratinozyten während der Re-Epithelisierung auf Fibronectin und Kollagen. Für beide Prozesse müssen zu Beginn der Migration Zell-Zell und Zell-EZM Kontakte gelockert werden, damit sich Zellen, die nun weniger adhären sind, aus dem Zellverband lösen können. Befindet sich die Zelle am Zielort wird die Adhäsion wieder erhöht. Eine erhöhte Adhäsion kann entweder durch eine erhöhte Menge an Substrat oder eine erhöhte Expression von spezifischen Integrinen erreicht werden. Eine andere

Möglichkeit erfolgt ohne induzierte Proteinexpression durch eine erhöhte Affinität des Integrins an das Substrat [52,54,66].

Vergleichbares konnte im Rahmen dieser Arbeit nachvollzogen werden. Durch die Verwundung werden Bestandteile der EZM, insbesondere Kollagen, exponiert. Keratinozyten migrieren über diese Kollagenschicht, um den Wundbereich abzudecken. Dazu müssen Keratinozyten zunächst die Adhäsion an Kollagen erhöhen, die durch  $\beta_1$  Integrine vermittelt wird. Die Befunde, die im Rahmen dieser Arbeit gesammelt wurden, lassen sich gut in diesen Sachverhalt integrieren. Es konnten Evidenzen gesammelt werden, dass die erhöhte Adhäsionsbereitschaft, durch eine verstärkte Integrin Proteinexpression vermittelt wird. Die physiologische Relevanz der erhöhten Gesamtproteinmenge zeigte sich in weiterführenden Untersuchungen, die auch eine Zunahme der Integrin Aktivität nahe legten. Neben einer erhöhten Aktivität von Integrin- $\beta_1$ , induzierte der Extrakt darüber hinaus die Adhäsion der beteiligten Zellen an Fibronectin, das Substrat das über Integrin- $\beta_1$  mit Zellen, in diesem Fall Keratinozyten, in Kontakt steht.

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass sich durch Extrakteinfluss nicht nur die Geschwindigkeit sondern auch das Muster der Migration verändert hat. Die Migration von unbehandelten Keratinozyten war durch eine Vielzahl an frei migrierende Zellen charakterisiert, die bei den behandelten Zellen deutlich herabgesetzt war. Die Zellen migrierten vielmehr im Verband. Während des Migrierens im Zellverband werden die Zell-Zell Verbindungen verstärkt aufrechterhalten. Auch bei diesem Prozess spielen  $\beta_1$ -Integrine eine wichtige Rolle [92]. Sie halten die Zell-Zell Adhäsion aufrecht und vermitteln die Kooperation der Zellen für die gemeinsame Migration. Die Einzelzellmigration wird gleichzeitig herabgesetzt [55]. Die Befunde zur verstärkten Adhäsion der Keratinozyten könnten sich ebenfalls durch eine Beeinflussung des Integrin  $\beta_1$  Monomers durch den Extrakt deuten lassen.

Abschließend konnten die Monolayerversuche einen klaren Einfluss der *Lucilia sericata* Extrakte auf wundheilungsrelevante Prozesse belegen. Mit der Verstärkung der Adhäsion und der Reduzierung der Migration könnten dem Extrakt die Wunde konsolidierende Eigenschaften zugesprochen werden.

Nachdem die Experimente mit Monolayerkulturen klare Effekte der *Lucilia sericata* Extrakte auf wundheilungsrelevante Prozesse identifiziert hatten, sollte die Relevanz der Befunde mit einem 3D Vollhautmodell verifiziert werden. Hierzu wurde das Phenion® Vollhautmodell ausgewählt, eines der wenigen kommerziell erhältlichen Vollhautmodelle, das im Gegensatz zu den Geweben anderer Anbieter nicht auf einem Kollagengel fußt und eine größere Vielzahl an charakteristischen Markern exprimiert [67,68].

Zunächst musste eine geeignete Verwundungs- und Extraktapplikationsmethode entwickelt werden.

Es stellte sich heraus, dass Inzisions-, Exzisions-, Verbrennungs- und Verbrühungswunden nicht geeignete Bedingungen zur Verfügung stellen konnten, um die Extrakte vergleichend zu untersuchen.

Da die Entfernung zwischen den Wundrändern bei Inzisionswunden zu gering war, heilten die Wunden zu schnell, um Raum bzw. Zeit für eine mögliche verbesserte Wundheilung durch den Extrakt darstellen zu können [105]. Exzisionswunden brauchten ca. 3 Wochen für eine vollständige Bedeckung der Wunde und beanspruchten somit eine Woche länger als die empfohlene Kultivierungszeit des Vollhautmodells. Somit schied auch diese Verwundungsmethode aus. Die Setzung einer Verbrennungswunde beeinträchtigte zu große Teile des Hautmodells, so dass weder eine Wundheilung innerhalb von zwei Wochen noch die topische Applikation des Extraktes ermöglicht werden konnte. Verbrühungswunden erwiesen sich als nicht standardisierbar und genügten somit ebenfalls nicht den Bedingungen für die Untersuchungen.

Anders lagen die Verhältnisse jedoch bei Verwundungen durch Kälteeinwirkung. Im Gegensatz zu den anderen Verwundungsmethoden konnten standardisierte Wunden gesetzt werden, die die Dermis und Epidermis schädigten und somit eine genügend große Wunde erzeugten, die mehrere Tage benötigte, um geschlossen zu werden. Des Weiteren verbessert das Vorhandensein der toten Epidermis die Applikation der Extrakte, da das sofortige Versickern im Medium verzögert wurde.

Es zeigte sich bei der Untersuchung der Kältewunden, dass der Wundheilungsverlauf hohe Übereinstimmungen mit vorhandenen *in vivo* und *in vitro* Daten aus der Literatur [87,89] aufwies. Die Neo-Epidermis zeigte z.B. jene

charakteristische Keilform, die mit einer graduierten Abflachung und Verlängerung der Keratinozyten, in Richtung der Neo-Epidermis Spitze einher geht und vielfach beschrieben ist [82-84,100]. Auch das Ablösen der Epidermis und die anschließende Blasenbildung konnte beobachtet werden [100].

Auch wenn die anderen Wundheilungsmethoden aus den oben beschriebenen Gründen für eine standardisierte Studie der beschriebenen Art nicht geeignet waren, so wiesen z.B. durch Hitzeeinwirkung verursachte Wunden ebenfalls abgerundeten Spitzen an der Neo-Epidermis wie bei entsprechenden *in vitro* und *in vivo* Wunden auf [85,86,88].

Man kann insgesamt folgern, dass die epidermale Wundheilung des Phenion® Full-Thickness Skin Model durchaus mit anderen dreidimensionalen *in vitro* Wundheilungsmodellen sowie *in vivo* vergleichbar ist und somit geeignet ist, um Wundheilungsprozesse zu untersuchen.

Mit diesem Testsystem bestehend aus Vollhautmodell und Kälteverwundung konnte eine deutliche Wirkung des Extraktes bereits nach 2 Tagen festgestellt werden, die sich in den folgenden Untersuchungstagen intensivierte. Dazu wurden Vollhautmodelle mit einem im flüssigen-N<sub>2</sub> gekühlten Edelstahlstab verwundet und dann mit Extrakt oder bei den relevanten Kontrollen (H<sub>2</sub>O; Lösungsmittelkontrolle, BSA; Proteinkontrolle) entsprechend behandelt. Weitere Modelle blieben zur Kontrolle unbehandelt. Die Modelle wurden über einen Zeitraum von 8 Tagen untersucht. Eine Extraktkonzentration von 1 mg/ml induzierte eine im Durchschnitt 15% schnellere epidermale Regeneration gegenüber unbehandelten Modellen. Der beobachtete Effekt ist nicht lösungsmittelabhängig. Es handelt sich auch nicht um einen unspezifischen durch die hohe Proteinkonzentration induzierten Effekt, da das biologisch nicht relevante BSA in der gleichen Konzentration keinen Effekt aufwies.

Im Einzelnen wurde wie in den Monolayerversuchen die Wirkung des Extraktes auf die Proliferation untersucht. Der Ki67 Nachweis lieferte den Hinweis, dass der Extrakt keinen Einfluss auf das proliferative Verhalten der Keratinozyten ausübt. Der Nachweis wurde am 3. Tag nach Verwundung durchgeführt, der gemäß Literatur der Zeitpunkt ist, an dem der proliferative Schub der basalen Keratinozyten seinen Höhepunkt erreicht [83,90]. Die so entstandenen Zellen

migrieren dann in Richtung Wundmitte. Es konnte gezeigt werden, dass verwundete Vollhautmodelle eine 18-25% höhere Proliferation im Vergleich zu unverwundeten Vollhautmodelle aufwiesen. Eine Reaktion, die im Rahmen der Wundheilung *in vivo* und *in vitro* als physiologisch zu bewerten ist. Allerdings konnte der Effekt durch den Extrakt nicht weiter beeinflusst werden und bestätigt damit die Monolayerversuche [84,101].

Der Einfluss der Extrakte zeigte sich wie in den Monolayerversuchen bei Prozessen, die mit Migration und Adhäsion verknüpft sind. Ab dem vierten Versuchstag war die Neo-Epidermis der mit Extrakt behandelten Modelle deutlich größer als die der unbehandelten (15%). Da ein Tag zuvor keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zu erkennen waren, kann man annehmen, dass die längere Neo-Epidermis nach Extraktbehandlung durch eine schnelle epitheliale Migration entstanden ist. Das wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die Neo-Epidermis bei Vollhautmodellen, die mit Extrakt behandelt wurden, nur einschichtig ist im Vergleich zu den Kontrollen (unbehandelt, mit Lösungsmittel oder BSA behandelt). Hier erscheinen fast alle vorhandenen Keratinozyten abgeflacht und verlängert, was ein typisches Merkmal migrierender Keratinozyten ist [13,104].

Die Wirkung der Extrakte in den Vollhautmodellen weist also auf eine schnellere Re-Epithelisierung hin, die durch eine verstärkte Migration vermittelt zu sein scheint. Bereits in den Monolayerversuchen konnte eine Beeinflussung der Migration und darüber hinaus der Adhäsion nachgewiesen werden. Bei genauer Betrachtung ergänzen sich die Befunde und liefern Hinweise auf eine positive Wirkung des Extraktes für den Heilungsprozess von chronischen Wunden:

In den Monolayerversuchen konnte gezeigt werden, dass der Extrakt die Bindung von Keratinozyten an Fibronectin über die Beeinflussung von Integrin- $\beta_1$  induziert. In den Monolayerversuchen wurde mit 19,2  $\mu\text{g/ml}$  (entspricht 1  $\mu\text{g}$  Fibronectin/ $\text{cm}^2$ ), eine hohe Fibronectin Konzentration gewählt. Dadurch konnte der Extrakt durch den Einfluss auf die Integrinmonomere eine sehr starke Adhäsion und damit eine Herabsetzung der Migration bewirken. Palecek *et al.* zeigten bereits 1999 [54] bei parallelen Untersuchungen zur Adhäsion und

Migration, dass eine übermäßige Adhäsion zu einer Herabsetzung der Migration führen kann.

Fibronectin konnte neben Kollagen I, Kollagen IV im Vollhautmodell nachgewiesen werden [67,68]. Durch die Wundsetzung und die Freilegung der EZM kamen die Keratinozyten während der Re-Epithelisierung mit Bestandteilen der dermoepidermalen Junctionszone und somit auch mit Fibronectin in Kontakt. Es kann angenommen werden, dass es sich dabei nicht um einen gesättigten Substratuntergrund wie in der Monolayerkultur handelte. Darüber hinaus ist zu vermuten, dass die Fibronectinmoleküle in einer flachen Zellkulturflasche leichter für die Integrine der Keratinozyten zugänglich waren, als das Fibronectin im Vollhautmodell, das ähnlich der *in vivo* Situation dreidimensional ausgerichtet ist. Dadurch ist die Adhäsion der Keratinozyten weniger stark ausgeprägt. Der Einfluss des Extraktes hatte vielmehr eine modulierende Wirkung auf die Adhäsion, die zu einer verstärkten Migration geführt hat. Eine ausreichende Adhäsion ist zwar Voraussetzung für die Migration, kann aber regulatorisch auf die Migrationsgeschwindigkeit wirken. Die Adhäsionsstärke nimmt mit erhöhter Ligandkonzentration, Integrinexpression und Integrinaffinität proportional zu [53]. Bei einer niedrigeren Adhäsion also können die vorderen Zellen genug stabile Verbindungen zum Substrat ausbilden, um so ausreichend hohe Zugkräfte für die Migration aufzubauen, während bei einer erhöhten Adhäsion Verbindungen am hinteren Ende sehr stark wären und derer langsames Ablösen die Migrationsgeschwindigkeit absenken würde (s.a. **Abb. 9 Seite 23**) [52,53].

Da es sich bei dem untersuchten Larvenextrakt der Goldfliege *Lucilia sericata* um ein Extrakt der gesamten Larve handelt, könnte angenommen werden, dass der Extrakt weitere Wirkstoffe beinhaltet, welche die Wundheilung beeinflussen. Folgende Ansätze könnten für weiterfolgenden Untersuchungen in Betracht gezogen werden:

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit haben sich auf die Schlüsselvorgänge (Proliferation, Adhäsion, Migration) von Fibroblasten und Keratinozyten während der Wundheilung konzentriert. Als weiterer Aspekt könnte die Kommunikation zwischen Epidermis und Dermis in Betracht gezogen werden. So wurde bisher gezeigt, dass aus Keratinozyten sezernierte Proteine, die

Ausschüttung von Wachstumsfaktoren in Fibroblasten stimulieren, die wiederum die Proliferation von Keratinozyten positiv beeinflussen [108]. Der Extrakt könnte hier zusätzlich einen Einfluss auf die Kommunikation von Fibroblasten und Keratinozyten gehabt haben. Die Möglichkeit einer Modulation auf die Expression von z.B. Wachstumsfaktoren (z.B. KGF) oder Zytokinen (z.B. IL1a, IL6) von Fibroblasten oder Keratinozyten, könnte ein Gegenstand weiterer Untersuchungen werden [106,107]. Aber auch die Einflüsse des starken Bestands an Bakterien müssten näher untersucht werden, wenn z.B. „Nicht-heilen“ festgestellt wird.

Die zentrale Rolle von Zell-Matrix Interaktionen für die Wundheilung wurden im Rahmen dieser Arbeit wiederholt angesprochen. Den Exkretions- bzw. Sekretionsprodukten von *Lucilia sericata* wurde mehrfach die Modulation der extrazellulären Matrix zugesprochen [21-24]. Horobin *et al.* 2003 [22] haben in Untersuchungen von *Lucilia sericata* Larven bzw. deren Sekretions bzw. Exkretionsprodukte eine Beeinflussung der Adhäsion von Monolayerkulturen durch Veränderung des zur Adhäsion zur Verfügung stehenden Substrats beobachtet. Auf mit Extrakt vorbehandelten Fibronectin oder Kollagen Typ I zeigten Fibroblasten eine verminderte Adhäsion und Ausbreitung. Horobin *et al.* 2006 [112] wiesen zudem einen Fibronectinabbau in einem dreidimensionalen Model durch Exkretions- bzw. Sekretionsprodukte von *Lucilia sericata* nach. Das Extrakt könnte auch hier einen modulierenden Effekt ausgeübt haben, indem es Teile der EZM enzymatisch abgebaut und somit die Zell-Matrix Verbindungen verbessert hat, was zur Adhäsion und Migration sowie Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren führte [113,114].

Zusammenfassend konnten in dieser ersten systematischen Untersuchung sowohl in einem zweidimensionalen als auch in einem dreidimensionalen *in vivo* nahem Testsystem klare Hinweise gesammelt werden, die einen positiven Einfluss von *Lucilia sericata* Extrakten auf die Wundheilung nahelegen. Die im Rahmen dieser Arbeit gelieferten Evidenzen unterstützten bisherige Befunde zu Extrakten von *Lucilia sericata* Larven und könnten zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beitragen.

## 6 Zusammenfassung

Der mehrphasige Prozess der Wundheilung ist komplex und umfasst unterschiedlichste Arten von Zellen. Der fein regulierte Ablauf kann auf verschiedenste Weise gestört werden. Die daraus resultierenden schwer heilenden und chronischen Wunden bedeuten für den Patienten eine deutliche Herabsetzung der Lebensqualität und sind nur sehr schwierig und mit deutlichem Kostenaufwand zu therapieren. Ein viel versprechender Ansatz ist die Verwendung von lebenden Fliegenlarven. Darüber hinaus mehren sich die Hinweise, dass durch Bestandteile dieser Larven die Nachteile der Lebendmadentherapie ausgeglichen und gleichzeitig einige der wundheilenden Effekte dargestellt werden können.

Im Rahmen diese Arbeit sollte zum ersten Mal systematisch überprüft werden, ob ein Ganzkörperextrakt aus *Lucilia sericata* Larven einen positiven Einfluss auf die Wundheilung ausüben kann.

Die Untersuchungen wurden an den Zellen durchgeführt, die den Hauptbestandteil der Haut bilden: Keratinozyten und Fibroblasten. Sie wurden zum einen in Monolayerkulturen propagiert, nachdem sie zuvor aus Biopsien isoliert worden waren. Zum anderen wurden sie in Form eines dreidimensionalen Vollhautmodells kultiviert.

Um die mögliche Wirkung des Extraktes zu spezifizieren, wurde in einer ersten Phase die Wundheilung in Einzelprozesse aufgeschlüsselt (Proliferation, Adhäsion, Migration) und ergänzt durch Untersuchungen zum Einfluss des Extraktes auf die Vitalität. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Extrakt auch in hohen Konzentrationen keine toxischen Effekte weder auf Fibroblasten noch auf Keratinozyten auswies. Der Extrakt hatte allerdings keine relevanten Effekte auf die Proliferation von Fibroblasten und Keratinozyten. Die Adhäsion und Migration von Fibroblasten wurde ebenfalls nicht maßgeblich durch den Extrakt beeinflusst.

Es konnten jedoch signifikante, biologisch relevante Effekte auf die Adhäsion und Migration von Keratinozyten beobachtet werden. Der Extrakt erhöhte die Adhäsion dieser Zellen an Fibronectin, ein wesentlicher Bestandteil der

extrazellulären Matrix. Weitere Untersuchungen legten nahe, dass dieser Effekt durch eine, durch den Extrakt induzierte, erhöhte Integrin- $\beta_1$  Expression hervorgerufen sein könnte, da zudem nachgewiesen konnte, dass die Aktivität des Integrins- $\beta_1$  zunahm.

In einer zweiten Phase wurden die Befunde an einem organotypischen Vollhautmodell, dem Phenion<sup>®</sup> Full-Thickness Skin Model, verifiziert. Zunächst wurde eine Methode zur Setzung einer reproduzierbaren und ausreichend großen Wunde etabliert. Es zeigte sich, dass das Vollhautmodell bestimmende Charakteristika der Wundheilung *in vivo* abbilden konnte.

Mit diesem Testsystem konnte gezeigt werden, dass der Extrakt dosis- und zeitabhängig die Wundheilung zu unterstützen vermag. Die beobachtete Stimulation der Re-Epithelisation durch die Keratinozyten scheint nicht durch eine Induktion der Proliferation zustande gekommen zu sein.

Die Ergebnisse der Monolayer-Versuche könnten erste Erklärungen für diesen Befund liefern. Durch eine Stimulation der Integrin- $\beta_1$  Expression wurde die Adhäsion an die umgebende EZM erhöht und so die Migration und Re-Epithelisation stimuliert. Durch die lockere und daher nicht so dichte Fibronectin-Matrix im Vollhautmodell konnte eine zu starke Adhäsion vermieden werden, die, wie z.B. bei den Monolayern, zu einer herabgesetzten Migration geführt hätte.

Chronische Wunden sind unter anderem durch einen gestörten EZM Aufbau charakterisiert (u.a. wenig oder zerstörtes Fibronectin). Keratinozyten aus chronischen Wunden exprimieren nur wenig Integrin  $\alpha_5\beta_1$ , das als Hauptverbindung zum Fibronectin dient. So sind sie durch gestörte Zell-EZM Bindungen und in Folge dessen, durch gestörte Re-epithelisation ausgezeichnet. Die ersten Befunde liefern Hinweise, dass der Extrakt hierbei helfend eingreifen könnte, indem er die Adhäsion an das Fibronectin erhöht und dadurch die Re-Epithelisation unterstützt.

Zusammenfassend konnten in dieser ersten systematischen Untersuchung Hinweise für einen positiven Einfluss von *Lucilia sericata* Extrakten auf die Wundheilung gesammelt werden. Sie unterstützten die bisherigen Befunde zu Extrakten von *Lucilia sericata* Larven und könnten zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beitragen.

## 7 Abstract

The complex multiphase process of wound healing includes many different types of cells. In wound healing, the finely regulated events can be disturbed in different ways. The resulting slow healing and chronic wounds mean a significant reduction in quality of life for the patient. Their treatment is difficult and generates high financial tasks. One established therapy approach is the use of living maggots. Related to this approach, there is growing evidence, that components of these larvae could compensate some of the disadvantages of the live maggot therapy, while the beneficial wound healing effects are retained.

In the context of this initial work, it was systematically examined whether a whole body extract of *Lucilia sericata* larvae can have a positive effect on wound healing. The studies were performed on keratinocytes and fibroblasts, the predominant cell types of epidermis and dermis. These have been either propagated in monolayer cultures after isolation from biopsies or secondly, they were cultured in the form of a three-dimensional full-thickness skin model.

To identify a possible effect of the extract, wound healing was subdivided in separate processes (proliferation, adhesion, migration) in a first phase, supplemented by studies of a possible influence upon cell-vitality. It could be shown, that the maggot extract revealed -even at high concentrations- no toxic effects either on fibroblasts nor on keratinocytes. Additionally, the extract generated no relevant effect on the proliferation of fibroblasts and keratinocytes. The adhesion and migration of fibroblasts was also not significantly affected by the extract.

In contrast, significant biologically relevant effects were observed in the adhesion and migration of keratinocytes. The extract increased the adhesion to fibronectin, an essential component of the extracellular matrix (ECM). Further studies suggested that this effect could be caused through an extract-induced increase in integrin- $\beta_1$  expression, additionally accompanied by an increased activity of the integrin- $\beta_1$ .

In a second phase, the results were verified on an organotypic full-thickness skin model, the Phenion<sup>®</sup> Full-Thickness Skin Model. Initially, a method of setting a reproducible and sufficiently large wound was established. It turned out, that the

---

full-thickness skin model can imitate important characteristics of wound healing *in vivo*.

Use of this assay system has shown that the maggot extract is able to support the healing process in a dose- and time-dependent manner. The observed stimulation of re-epithelization by the keratinocytes appears not to be achieved through an induction of cell-proliferation.

The results of the monolayer experiments could provide the first explanation for these findings. Through stimulation of the integrin- $\beta_1$  expression, the adhesion to the surrounding extracellular matrix is increased and leads to an enhanced migration and re-epithelization. By the slight and not so tight fibronectin matrix of the full-thickness skin model, too strong adhesion is avoided, which leads -as in the monolayers- to a reduced migration.

Chronic wounds, among other things, are characterized by an impaired ECM structure (including few or destroyed fibronectin). Keratinocytes from chronic wounds express few or no integrin  $\alpha_5\beta_1$ , which serves as the main connection to the fibronectin. They are characterized by impaired cell-ECM bonds, and consequently, by impaired re-epithelization. The first findings provide evidence that the extract can increase adhesion to fibronectin, thereby supporting the re-epithelization.

In this first systematic study, evidence for a positive effect of *Lucilia sericata* extracts on wound healing have been collected. They support the previous findings on extracts from *Lucilia sericata* larvae and contribute to the development of new therapeutic approaches.

---

## 7 Literaturliste

- 1 Kanitakis J (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 12: 390-399
- 2 Sobotta J, Hammersen F (1985). *Histologie - Farbatlas der Mikroskopischen Anatomie.* Urban & Schwarzenberg. München, Wien, Baltimore. 3. Auflage
- 3 Fritsch P (1998). *Dermatologie und Venerologie - Lehrbuch und Atlas.* Springer. Berlin, Heidelberg. 1. Auflage
- 4 Laurie GW, Leblond CP, Martin GR (1982). Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J Cell Biol.* 95: 340-344.
- 5 Burgeson RE, Christiano AM (1997). The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol.* 9: 651-658.
- 6 Marinkovich MP, Keene DR, Rimberg CS, Burgeson RE (1993). Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev Dyn.* 197: 255-267.
- 7 Smola H, Eming S, Hess S, Werner S, Krieg T (2001). Wundheilung und Wundheilungsstörungen. *Moderne Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie.* Deutsches Ärzteblatt. 98 A: 2802- 2809.
- 8 Martin P (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 276: 75-81.
- 9 Singer AJ, Clark RA (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 341: 738-746.
- 10 Usui ML, Underwood RA, Mansbridge JN, Muffley LA, Carter WG, Olerud JE (2005). Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization. *Wound Repair Regen.* 13: 468-479.
- 11 Clark RA (2001). Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 936: 355-

---

367.

- 12 Larjava H, Salo T, Haapasalmi K, Kramer RH, Heino J (1993). Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest.* 92: 1425-1435.
- 13 Usui ML, Mansbridge JN, Carter WG, Fujita M, Olerud JE (2008). Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J Histochem Cytochem.* 56: 687-696.
- 14 Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci.* 97: 2892-2923.
- 15 Schultz GS, Wysocki A (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen.* 17: 153-162.
- 16 Wollina U, Liebold K, Schmidt WD, Hartmann M, Fassler D (2002). Biosurgery supports granulation and debridement in chronic wounds--clinical data and remittance spectroscopy measurement. *Int J Dermatol.* 41: 635-639.
- 17 Nigam Y, Dudley E, Bexfield A, Bond AE, Evans J, James J (2010). The Physiology of Wound Healing by the Medicinal Maggot, *Lucilia sericata*. *Adv. Insect Physiol.* Volume 39.
- 18 Robinson W (1935). Stimulation of healing in non-healing wound by allantoin occurring in maggot secretions and of wide biological distribution *J. Bone Joint Surg.* 267-271.
- 19 Robinson W, Baker FC (1939). The enzyme urease and the occurrence of ammonia in maggot-infected wounds. *J Parasitol.* 25: 149-155.
- 20 Prete PE (1997). Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci.* 60: 505-510.
- 21 Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, Hall M, Church JC, Pritchard DI (2003). Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *Br J Dermatol.* 148: 14-23.

- 22 Horobin AJ, Shakesheff KM, Woodrow S, Robinson C, Pritchard DI (2003). Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components. *Br J Dermatol.* 148: 923-933.
- 23 Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI (2005). Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon the migration of human dermal fibroblasts over a fibronectin-coated surface. *Wound Repair Regen.* 13: 422-433.
- 24 van der Plas MJ, van der Does AM, Baldry M, Dogterom-Ballering HC, van Gulpen C, van Dissel JT, Nibbering PH, Jukema GN (2007). Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *Microbes Infect.* 9: 507-514.
- 25 Pecivova J, Macickova T, Takac P, Kovacsova M, Cupanikova D, Kozanek M (2008). Effect of the extract from salivary glands of *Lucilia sericata* on human neutrophils. *Neuro Endocrinol Lett.* 29: 794-797.
- 26 Bexfield A, Bond AE, Morgan C, Wagstaff J, Newton RP, Ratcliffe NA, Dudley E, Nigam Y (2010). Amino acid derivatives from *Lucilia sericata* excretions/secretions may contribute to the beneficial effects of maggot therapy via increased angiogenesis. *Br J Dermatol.* 162: 554-562.
- 27 Cerovsky V, Zdarek J, Fucik V, Monincova L, Voburka Z, Bem R (2010). Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci.* 67: 455-466.
- 28 Telford G, Brown AP, Kind A, English JS, Pritchard DI (2010). Maggot chymotrypsin I from *Lucilia sericata* is resistant to endogenous wound protease inhibitors. *Br J Dermatol.* 164: 192-196.
- 29 Zhang Z, Wang S, Diao Y, Zhang J, Lv D (2010). Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. *Lipids Health Dis.* 9: 24.
- 30 Kirfel G, Herzog V (2004). Migration of epidermal keratinocytes: mechanisms, regulation, and biological significance. *Protoplasma.* 223: 67-78.
- 31 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1994). *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science. New York. 3. Edition

- 32 Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F (1993). Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol.* 101: 64-68.
- 33 Grinnell F, Ho CH, Wysocki A (1992). Degradation of fibronectin and vitronectin in chronic wound fluid: analysis by cell blotting, immunoblotting, and cell adhesion assays. *J Invest Dermatol.* 98: 410-416.
- 34 Ongenaes KC, Phillips TJ, Park HY (2000). Level of fibronectin mRNA is markedly increased in human chronic wounds. *Dermatol Surg.* 26: 447-451.
- 35 Weil GC, Simon RJ, Sweadner WR (1933). A biological, bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *Am J Surg.* 19: 36-48.
- 36 Whitaker IS, Twine C, Whitaker MJ, Welck M, Brown CS, Shandall A (2007). Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgrad Med J.* 83: 409-413.
- 37 Wollina U, Liebold K, Schmidt WD, Hartmann M, Fassler D (2002). Biosurgery supports granulation and debridement in chronic wounds--clinical data and remittance spectroscopy measurement. *Int J Dermatol.* 41: 635-639.
- 38 Snyder R (2009). Maggot therapy in clinical practice. *Podiatry Management.* 28: 135-138.
- 39 Harburger DS, Calderwood DA (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 122: 159-163.
- 40 Byron A, Humphries JD, Askari JA, Craig SE, Mould AP, Humphries MJ (2009). Anti-integrin monoclonal antibodies. *J Cell Sci.* 122: 4009-4011.
- 41 Margadant C, Charafeddine RA, Sonnenberg A (2010). Unique and redundant functions of integrins in the epidermis. *FASEB J.* 24: 4133-4152.
- 42 Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* 101: 47-56.

- 43 Kreidberg JA (2000). Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr Opin Cell Biol.* 12: 548-553.
- 44 Decline F, Rousselle P (2001). Keratinocyte migration requires alpha2beta1 integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma2 chain. *J Cell Sci.* 114: 811-823.
- 45 Takagi J, Strokovich K, Springer TA, Walz T (2003). Structure of integrin alpha5beta1 in complex with fibronectin. *EMBO J.* 22: 4607-4615.
- 46 Mercurio AM, Rabinovitz I, Shaw LM (2001). The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 13: 541-545.
- 47 Kim JP, Zhang K, Chen JD, Kramer RH, Woodley DT (1994). Vitronectin-driven human keratinocyte locomotion is mediated by the alpha v beta 5 integrin receptor. *J Biol Chem.* 269: 26926-26932.
- 48 Thomas GJ, Poomsawat S, Lewis MP, Hart IR, Speight PM, Marshall JF (2001). alpha v beta 6 Integrin upregulates matrix metalloproteinase 9 and promotes migration of normal oral keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 116: 898-904.
- 49 Ortonne JP, Loning T, Schmitt D, Thivolet J (1981). Immunomorphological and ultrastructural aspects of keratinocyte migration in epidermal wound healing. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 392: 217-230.
- 50 Krawczyk WS, Wilgram GF (1973). Hemidesmosome and desmosome morphogenesis during epidermal wound healing. *J Ultrastruct Res.* 45: 93-101.
- 51 Small JV, Vignat E (2004). Cell Migration. *Encyclopedia of Biological Chemistry.* Elsevier. Amsterdam, Boston. Volume 1.
- 52 Palecek SP, Cox EA, Huttenlocher A, Lauffenburger DA, Horwitz AF (1999). Integrin Adhesion in Cell Migration. *Advances in Molecular and Cell Biology.* Elsevier. Volume 28.
- 53 Palecek SP, Huttenlocher A, Horwitz AF, Lauffenburger DA (1998). Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J Cell Sci.* 111: 929-940.

- 54 Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*. 385: 537-540.
- 55 Gilcrease MZ (2007). Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett*. 247: 1-25.
- 56 Kirfel G, Rigort A, Borm B, Schulte C, Herzog V (2003). Structural and compositional analysis of the keratinocyte migration track. *Cell Motil Cytoskeleton*. 55: 1-13.
- 57 Friedl P (2004). Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 16: 14-23.
- 58 Friedl P, Noble PB, Walton PA, Laird DW, Chauvin PJ, Tabah RJ, Black M, Zanker KS (1995). Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro. *Cancer Res*. 55: 4557-4560.
- 59 Friedl P, Wolf K (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 3: 362-374.
- 60 Werdin F, Tennenhaus M, Schaller HE, Rennekampff HO (2009). Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Eplasty*. 9: e19.
- 61 Nenoff P, Herrmann A, Christina G, Herrmann J, Simon JC (2010). Biochirurgisches Débridement mittels *Lucilia sericata*-Maden – ein Update. *Wien Med Wochenschr*.
- 62 Chan, D.C., et al., Maggot debridement therapy in chronic wound care. *Hong Kong Med J*, 2007. 13(5): p. 382-6.
- 63 Gupta A (2008). A review of the use of maggots in wound therapy. *Ann Plast Surg*. 60: 224-227.
- 64 Smith AG, Powis RA, Pritchard DI, Britland ST (2006). Greenbottle (*Lucilia sericata*) larval secretions delivered from a prototype hydrogel wound dressing accelerate the closure of model wounds. *Biotechnol Prog*. 22: 1690-1696.

- 65 Liang CC, Park AY, Guan JL (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2: 329-333.
- 66 Huttenlocher A, Horwitz AR (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3: a005074.
- 67 Mewes KR, Raus M, Bernd A, Zöller NN, Sättler A, Graf R (2007). Elastin expression in a newly developed full-thickness skin equivalent. *Skin Pharmacol Physiol.* 20: 85-95.
- 68 Mewes KR, Bock A, Raus M, Goerg K, Prießner A, De Wever B, Zöller NN, Bernd A (2006). A full thickness skin equivalent for efficacy, toxicity and penetration studies. *INVITTOX.*
- 69 Zöller NN, Kippenberger S, Thaci D, Mewes K, Spiegel M, Sättler A, Schultz M, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Bernd A (2008). Evaluation of beneficial and adverse effects of glucocorticoids on a newly developed full-thickness skin model. *Toxicol In Vitro.* 22: 747-759.
- 70 Meloni M, Farina A, de Servi B (2010). Molecular modifications of dermal and epidermal biomarkers following UVA exposures on reconstructed full-thickness human skin. *Photochem Photobiol Sci.* 9: 439-447.
- 71 Jackh C, Blatz V, Fabian E, Guth K, van Ravenzwaay B, Reisinger K, Landsiedel R (2011). Characterization of enzyme activities of Cytochrome P450 enzymes, Flavin-dependent monooxygenases, N-acetyltransferases and UDP-glucuronyltransferases in human reconstructed epidermis and full-thickness skin models. *Toxicol In Vitro.* 25: 1209-1214.
- 72 Ackermann K, Borgia SL, Korting HC, Mewes KR, Schafer-Korting M (2010). The Phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing. *Skin Pharmacol Physiol.* 23: 105-112.
- 73 Steigleder GK, Jorda V (1971). Parakeratotic granules. A study using prolonged staining and burnt techniques with Sudan black in normal and psoriatic skin. *Arch Klin Exp Dermatol.* 239: 414-425.
- 74 O'Toole EA (2001). Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin Exp Dermatol.* 26: 525-530.
- 75 Kirfel G, Borm B, Rigort A, Herzog V (2002). The secretory beta-amyloid precursor protein is a motogen for human epidermal keratinocytes. *Eur J*

---

Cell Biol. 81: 664-676.

- 76 Kim JP, Zhang K, Chen JD, Wynn KC, Kramer RH, Woodley DT (1992). Mechanism of human keratinocyte migration on fibronectin: unique roles of RGD site and integrins. *J Cell Physiol.* 151: 443-450.
- 77 Luque A, Gomez M, Puzon W, Takada Y, Sanchez-Madrid F, Cabanas C (1996). Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain. *J Biol Chem.* 271: 11067-11075.
- 78 Wilkins JA, Li A, Ni H, Stupack DG, Shen C (1996). Control of beta1 integrin function. Localization of stimulatory epitopes. *J Biol Chem.* 271: 3046-3051.
- 79 Gestmann F, Förster M, Mehlhorn H, Sievert K, Messler S, Neuhausen N, Petersdorf S, Pfeffer K (2012). Flies as Vectors of Microorganisms Potentially Inducing Severe Diseases in Humans and Animals. *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases.* Springer. Berlin Heidelberg. Volume 3.
- 80 Eming SA, Krieg T, Davidson JM (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 127: 514-525.
- 81 Zambruno G, Marchisio PC, Marconi A, Vaschieri C, Melchiori A, Giannetti A, De Luca M (1995). Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J Cell Biol.* 129: 853-865.
- 82 Egles C, Huet HA, Dogan F, Cho S, Dong S, Smith A, Knight EB, McLachlan KR, Garlick JA (2010). Integrin-blocking antibodies delay keratinocyte re-epithelialization in a human three-dimensional wound healing model. *PLoS One.* 5: e10528.
- 83 Falanga V, Isaacs C, Paquette D, Downing G, Koultab N, Butmarc J, Badiavas E, Hardin-Young J (2002). Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. *J Invest Dermatol.* 119: 653-660.
- 84 Garlick JA, Taichman LB (1994). Effect of TGF-beta 1 on re-epithelialization of human keratinocytes in vitro: an organotypic model. *J Invest Dermatol.* 103: 554-559.

- 85 Coolen NA, Vlig M, van den Bogaerd AJ, Middelkoop E, Ulrich MM (2008). Development of an in vitro burn wound model. *Wound Repair Regen.* 16: 559-567.
- 86 Topping G, Malda J, Dawson R, Upton Z (2006). Development and characterisation of human skin equivalents and their potential application as a burn wound model. *Primary Intention.* 14: 14-21.
- 87 Breetveld M, Richters CD, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S (2006). Comparison of wound closure after burn and cold injury in human skin equivalents. *J Invest Dermatol.* 126: 1918-1921.
- 88 Ehrlich HP, Hembry RM (1984). A comparative study of fibroblasts in healing freeze and burn injuries in rats. *Am J Pathol.* 117: 218-224.
- 89 Capon F, Cambie-Vanderschelden MP, Salmon-Ehr V, Birembaut P, Kalis B, Maquart FX (1998). A comparative study of cryogenic lesions in organ-cultured human skin and in reconstituted human skin equivalent. *Cryobiology.* 36: 174-183.
- 90 Odland G, Ross R (1968). Human wound repair. I. Epidermal regeneration. *J Cell Biol.* 39: 135-151.
- 91 Purwar R, Kraus M, Werfel T, Wittmann M (2008). Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: a possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *J Invest Dermatol.* 128: 59-66.
- 92 Larjava H, Peltonen J, Akiyama SK, Yamada SS, Gralnick HR, Uitto J, Yamada KM (1990). Novel function for beta 1 integrins in keratinocyte cell-cell interactions. *J Cell Biol.* 110: 803-815.
- 93 Guo M, Kim LT, Akiyama SK, Gralnick HR, Yamada KM, Grinnell F (1991). Altered processing of integrin receptors during keratinocyte activation. *Exp Cell Res.* 195: 315-322.
- 94 Hotchin NA, Watt FM (1992). Transcriptional and post-translational regulation of beta 1 integrin expression during keratinocyte terminal differentiation. *J Biol Chem.* 267: 14852-14858.
- 95 Frelinger AL, 3rd, Du XP, Plow EF, Ginsberg MH (1991). Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *J Biol*

- Chem. 266: 17106-17111.
- 96 Oinuma I, Katoh H, Negishi M (2006). Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated R-Ras GAP activity inhibits cell migration by regulating beta(1) integrin activity. *J Cell Biol.* 173: 601-613.
- 97 Du J, Chen X, Liang X, Zhang G, Xu J, He L, Zhan Q, Feng XQ, Chien S, Yang C (2011). Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 9466-9471.
- 98 Peltonen J, Larjava H, Jaakkola S, Gralnick H, Akiyama SK, Yamada SS, Yamada KM, Uitto J (1989). Localization of integrin receptors for fibronectin, collagen, and laminin in human skin. Variable expression in basal and squamous cell carcinomas. *J Clin Invest.* 84: 1916-1923.
- 99 Grinnell F (1982). Fibronectin and wound healing. *Am J Dermatopathol.* 4: 185-188.
- 100 Li AK, Ehrlich HP, Trelstad RL, Koroly MJ, Schattenkerk ME, Malt RA (1980). Differences in healing of skin wounds caused by burn and freeze injuries. *Ann Surg.* 191: 244-248.
- 101 Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S (1999). The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol.* 113: 1090-1098.
- 102 Patel GK, Wilson CH, Harding KG, Finlay AY, Bowden PE (2006). Numerous keratinocyte subtypes involved in wound re-epithelialization. *J Invest Dermatol.* 126: 497-502.
- 103 Novokhatny V, Medved L, Lijnen HR, Ingham K (1995). Tissue-type plasminogen activator (tPA) interacts with urokinase-type plasminogen activator (uPA) via tPA's lysine binding site. An explanation of the poor fibrin affinity of recombinant tPA/uPA chimeric molecules. *J Biol Chem.* 270: 8680-8685.
- 104 Schäfer C, Borm B, Born S, Mohl C, Eibl EM, Hoffmann B (2009). One step ahead: role of filopodia in adhesion formation during cell migration of keratinocytes. *Exp Cell Res.* 315: 1212-1224.
- 105 Strodbeck F (2001). *Physiology of Wound Healing. Newborn and Infant*

- Nursing Reviews. 1: 43-52.
- 106 Pova G, Diniz LM (2011). Growth hormone system: skin interactions. *An Bras Dermatol.* 86: 1159-1165.
- 107 Maas-Szabowski N, Shimotoyodome A, Fusenig NE (1999). Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci.* 112 (Pt 12): 1843-1853.
- 108 Werner S, Krieg T, Smola H (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 127: 998-1008.
- 109 Eckes B, Nischt R, Krieg T (2010). Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 3: 4.
- 110 Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M (2000). Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell.* 6: 743-750.
- 111 Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E (1990). Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature.* 346: 281-284.
- 112 Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI (2006). Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. *J Invest Dermatol.* 126: 1410-1418.
- 113 Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE (2003). The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci.* 116: 3269-3276.
- 114 Biname F, Lassus P, Hibner U (2008). Transforming growth factor beta controls the directional migration of hepatocyte cohorts by modulating their adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell.* 19: 945-956.
- 115 Hurkmans JF, Bodde HE, Van Driel LM, Van Doorne H, Junginger HE (1985). Skin irritation caused by transdermal drug delivery systems during long-term (5 days) application. *Br J Dermatol.* 112: 461-467.
- 116 Godin B, Touitou E (2007). Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv Drug Deliv Rev.* 59:

- 1152-1161.
- 117 Grinnell F (1994). Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol.* 124: 401-404.
- 118 Hinz B (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 127: 526-537.
- 119 Montesano R, Orci L (1988). Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 4894-4897.
- 120 Al-Jamal R, Harrison DJ (2008). Beta1 integrin in tissue remodelling and repair: from phenomena to concepts. *Pharmacol Ther.* 120: 81-101.
- 121 Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 349-363.
- 122 Grinnell F, Zhu M (1996). Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. *J Invest Dermatol.* 106: 335-341.
- 123 Weiss SJ (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 320: 365-376.
- 124 Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P (2010). Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol.* 163: 257-268.
- 125 Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, Augustin HG, Eming SA, Schubert U, Linn T, Nawroth PP, Hussain M, Hammes HP, Herrmann M, Preissner KT, Chavakis T (2006). The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood.* 107: 2720-2727.
- 126 Widgerow AD (2012). Chronic wounds - is cellular 'reception' at fault? Examining integrins and intracellular signalling. *Int Wound J.*
- 127 Giancotti FG, Ruoslahti E (1999). Integrin signaling. *Science.* 285: 1028-1032.

- 128 Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 116: 4605-4613.
- 129 Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol.* 153: 1175-1186.
- 130 Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans.* 32: 416-420.
- 131 Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302: 1704-1709.
- 132 Schober M, Raghavan S, Nikolova M, Polak L, Pasolli HA, Beggs HE, Reichardt LF, Fuchs E (2007). Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol.* 176: 667-680.
- 133 Donaldson DJ, Mahan JT (1988). Keratinocyte migration and the extracellular matrix. *J Invest Dermatol.* 90: 623-628.
- 134 Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T (2000). Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol.* 19: 325-332.

---

## 8 Lebenslauf

<b>Name</b>	Emmanouil Bournelis
Geb.-Datum	13.01.1970
Geb.-Ort	Heraklion (Kreta) / Griechenland
Familienstand	verheiratet, drei Kinder
Staatsangehörigkeit	griechisch

### Bildungsweg

1975-1981	Grundschule in Heraklion
1981-1984	Gymnasium in Heraklion
1984-1987	Allgemeines Lyzeum in Heraklion
07/1987	Apolyterion (Abitur) und Allgemeine Prüfungen in den propädeutischen Fächern (Leistungsfächer): Neugriechisch, Physik, Chemie, Biologie.
09/1987-07/1988	Ausbildung in der deutschen Sprache am Internationalen Studienzentrum Heidelberg
10/1989-12/1998	Studium der Biologie an der Justus-Liebig Universität Gießen; Abschluss: Diplom
10/2008-10/2012	Promotionsstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

## **10 Selbstständigkeitserklärung**

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenhändig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Emmanouil Bournelis