

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

*In vitro* Untersuchung der zellulären Wirkung hypobarer Drucktherapie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
vorgelegt von

Florian Löcherbach

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachterin/Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachterin/Zweitgutachter: PD Dr. med. Andreas Krieg

*Beim Erforschen und Versuchen  
hört man auch die Frömmsten fluchen.*

Prof. Dr. Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger (\*1939)

## Zusammenfassung

Die Vakuumtherapie (VAC<sup>®</sup>-Therapie oder „Negative pressure wound therapy“; NPWT) ist eine im modernen klinischen Alltag etablierte Behandlungsmethode bei verschiedensten Verletzungsmustern: Von akuten traumatischen Wunden, über infizierte oder dehiszente Wunden und Verbrennungswunden bis hin zum offenen Abdomen. Trotz des weitgehend unumstrittenen Nutzens der Therapie für den Patienten ist ihre Wirkungsweise und ihr Einsatz in großen Zügen nicht evidenzbasiert. Gerade im Bereich der molekularen Mechanismen und der Wirkung der Therapie auf zellulärer Ebene erscheint die wissenschaftliche Datenlage lückenhaft. Inhalt dieser Arbeit ist es, einige der postulierten molekularen Effekte der Vakuumtherapie in einem eigens hierfür etablierten *in vitro* Modell, in welchem einzelne Zelllinien isoliert eingebracht werden können, näher zu beleuchten und weiter zu untersuchen. So konnten wir zeigen, dass die Unterdrucktherapie in der Lage ist, die lokale Gewebepерfusion durch Anregung der Neoangiogenese zu steigern. Einen Einfluss auf die Zellproliferation verschiedener Zelltypen konnten wir hingegen nicht nachweisen. Die in verschiedenen Veröffentlichungen postulierte Modulation der Zytokinexpression konnten wir in unserem Modell für zytokinaktivierte Fibroblasten, Monozyten und adipogene Stammzellen zeigen. Auf ruhende Zellen dieser Zelltypen scheint sie jedoch keinen Einfluss zu haben. Das Migrationsverhalten von Fibroblasten scheint ebenfalls nicht beeinflusst zu werden und die für die Wundadaptation bedeutende Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten während der Wundheilung scheint eher gehemmt als stimuliert zu werden. Die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen scheint dagegen aber durchaus positiv beeinflusst zu werden. Eine wesentliche Frage, die während dem experimentellen Teil dieser Arbeit jedoch aufkam, ist, in wie weit das von uns genutzte Modell, auch wenn es in allen Belangen dem aktuellen wissenschaftlichen Standard im Bereich der Grundlagenforschung zum Thema Vakuumtherapie entspricht, die tatsächlichen Verhältnisse in einer realen Wunde widerspiegeln kann. Verschiedene Effekte der Therapie konnten aufgrund des Versuchsaufbaus nicht berücksichtigt werden, sodass Folgearbeiten in diesem Themenbereich wohl auf komplexere *in vivo* Tiermodelle und klinische Studien zurückgreifen sollten.

## Abkürzungen

<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropes Hormon	<b>IL-10</b>	Interleukin-10
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat	<b>KCl</b>	Kalium-Chlorid
<b>ASC</b>	Adipose-derived stem cell	<b>MSC</b>	Mesenchymale Stammzelle
<b>Aza</b>	5'-Azacythidine	<b>NaCl</b>	Natrium-Chlorid
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin	<b>Na-deoxycholat</b>	Natrium-deoxycholat
<b>CaCl</b>	Calcium-Chlorid	<b>NEAA</b>	Non-Essential Amino Acid
<b>CD</b>	Cluster of differentiation	<b>NP-40</b>	Nonidet P-40
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>ECM</b>	Extrazelluläre Matrix	<b>PMA</b>	Phorbol-12-myristat-13-acetat
<b>EGR</b>	Early growth response	<b>PU</b>	Polyuretham
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	<b>PVA</b>	Polyvinylalkohol
<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum	<b>RIPA</b>	Radio-Immunoprecipitation Assay
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor	<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	<b>TBS-T</b>	Tris Buffer Saline + 0,1% Tween
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor	<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor- $\beta$
<b>HMGB</b>	High-mobility group box	<b>TMB</b>	Tetramethylbenzidin
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor- $\alpha$
<b>HUVEC</b>	Human umbilical vein endothelial cell	<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$	<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>IL-1</b>	Interleukin-1	<b>V.A.C.<sup>®</sup></b>	Vacuum assisted closure
<b>IL-4</b>	Interleukin-4	<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>IL-6</b>	Interleukin-6	<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin
<b>IL-8</b>	Interleukin-8		

# Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Vakuumtherapie.....	1
1.1.1	Geschichte der Vakuumtherapie.....	1
1.1.2	Die V.A.C. <sup>®</sup> -Therapie.....	1
1.1.3	Indikationen zur Vakuumtherapie.....	3
1.1.4	Wirkungsweise der Vakuumtherapie.....	4
1.2	Wundheilung.....	5
1.2.1	Fibroblasten.....	6
1.2.2	THP-1-Zellen.....	6
1.2.3	Mesenchymale Stammzellen.....	7
1.2.4	Jurkat T-Zellen.....	7
1.2.5	HUVECs.....	8
1.3	Zytokine.....	8
1.3.1	Interleukin-1 (IL-1).....	9
1.3.2	Interleukin-6 (IL-6).....	9
1.3.3	Interleukin-8 (IL-8).....	10
1.3.4	Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	10
1.3.5	Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ).....	11
1.3.6	Vascular endothelial growth factor (VEGF).....	11
2	Ziele der Arbeit.....	12
3	Material und Methoden.....	13
3.1	Material.....	13
3.1.1	Laborgeräte und Software.....	13
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	15
3.1.3	Chemikalien.....	16
3.1.4	Puffer, Medien und Lösungen.....	19

3.1.4.1	Zellkultur-Medien.....	19
3.1.4.2	Puffer und Lösungen .....	20
3.2	Methoden .....	22
3.2.1	Methoden der Zellkultur .....	22
3.2.1.1	verwendete Zellen .....	22
3.2.1.2	Routineprozeduren der Zellkultur .....	26
3.2.1.3	Inkubation der Versuchszellen im Unterdruck.....	28
3.2.2	Untersuchte Parameter .....	31
3.2.2.1	Vitalität.....	31
3.2.2.2	Proliferation.....	31
3.2.2.3	sekretorische Immunantwort .....	31
3.2.2.4	Differenzierung.....	32
3.2.2.5	Migration .....	33
3.2.2.6	Angiogenese .....	33
3.2.3	Methoden der Auswertung.....	33
3.2.3.1	CellTiter-Blue <sup>®</sup> Assay.....	33
3.2.3.2	ELISA.....	34
3.2.3.3	Western Blot.....	34
3.2.3.4	Propidiumiodid- und Hoechst-Färbung.....	38
3.2.3.5	Immunzytochemische Anfärbung ( $\alpha$ -SMA).....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Vitalität .....	39
4.2	Proliferation .....	39
4.3	sekretorische Immunantwort.....	44
4.4	Differenzierung.....	46
4.5	Migration .....	49
4.6	Angiogenese.....	51

5	Diskussion.....	54
5.1	Vitalität .....	54
5.2	Proliferation .....	55
5.3	sekretorische Immunantwort.....	57
5.4	Differenzierung.....	58
5.5	Migration .....	58
5.6	Angiogenese.....	59
5.7	Kritische Betrachtung .....	61
6	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	63

# **1 Einleitung**

## **1.1 Vakuumtherapie**

### **1.1.1 Geschichte der Vakuumtherapie**

Obwohl Fleischmann et al. (1) 1993 das erste Mal über ein Verfahren zur Therapie flächiger Wunden mittels einem Unterdruck ausgesetzten Schwämmen berichteten, ist die Idee der Anwendung von Unterdruck in der Medizin in Form des Schröpfens bereits erheblich älter. 300 v. Chr. erläuterte der Chinese Ge Hong bereits in seinem „Handbook of Prescriptions for Emergencies“ das Schröpfen zur Behandlung von Pusteln (2). Hierbei wird die Luft im Inneren sogenannter Schröpfgläser oder Schröpfköpfe erhitzt. Durch das unmittelbar nach der Erhitzung der Luft erfolgende Aufsetzen der Schröpfköpfe auf die Haut entsteht ein Unterdruck, welcher therapeutisch genutzt wird. Erstmalige Erwähnung in der „Modernen Medizin“ findet das Schröpfen wiederum 1841 durch Junaud (2).

Nachdem Argenta und Morykwas Mitte der 1990er Jahre die physiologischen Grundlagen der Unterdrucktherapie in klinischen und tierexperimentellen Studien weiter untersucht hatten (3,4), entwickelten sie in Zusammenarbeit mit der Firma KCI (Kinetic Concepts Inc., San Antonio, TX, USA) das erste von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassene System zur Unterdrucktherapie, welches seitdem kommerziell vertrieben wird. Es prägte sich nun der Begriff der „V.A.C.<sup>®</sup>-Therapie“ in den Sprachgebrauch ein, welcher eine dynamische Steuerung der Behandlungsparameter miteinschließt, wie es weder beim Schröpfen noch bei der von Fleischmann et al. (1) beschriebenen „Vakuumversiegelung“ möglich war.

Die verhältnismäßig einfache Anwendung dieses neuen Systems fand rasch reges Interesse und damit eine weite Verbreitung in vielen Fachdisziplinen. Dies führte zu einer Diskrepanz zwischen der breiten klinischen Anwendung des Systems und dem tatsächlichen Wissen über die physiologische Wirkweise des selben (5).

### **1.1.2 Die V.A.C.<sup>®</sup>-Therapie**

Grundsätzlich besteht der Verband im Rahmen der V.A.C.<sup>®</sup>-Therapie aus einem Polyurethan- (PU) oder Polyvinylalkohol- (PVA) Schwamm welcher in die zu behandelnde Wunde eingelegt wird, sowie einer durchsichtigen PU-Folie, welche anschließend den Verband luftdicht, aber wasserdampfdurchlässig, verschließt.

Die beiden Schwammsorten unterscheiden sich vor allem in ihrer Porengröße und –struktur. Der PU-Schwamm mit 400-600 µm großen Poren ermöglicht einen optimalen Abfluss von Exsudat, wie es beispielsweise bei ausgedehnten bakteriellen Kontaminationen nötig ist. Darüber hinaus wirkt er stark granulationsfördernd und debridierend. Er wächst in die Wunde ein und macht von daher einen Verbandwechsel alle 2-3 Tage nötig. Der PVA-Schwamm hingegen verfügt mit seinen nur 250 µm großen Poren über weniger granulationsfördernde Eigenschaften. Er wächst nicht in das Gewebe ein und kann somit bis zu 7 Tage auf einer Wunde belassen werden. Diese Umstände sorgen dafür, dass er vor allem in der plastischen Chirurgie, beispielsweise für die Fixation von Spalthauttransplantaten, welche einen möglichst gleichmäßigen Druck auf das Transplantat benötigen, verwendet wird (2). In der folgenden Abb. 1 sind die beiden Schwammsorten einmal exemplarisch zu sehen:



**Abb. 1: Angelegter VAC®-Verband.** links: PU-Schwamm zur temporären Weichteildeckung nach einer komplizierten Humerusfraktur mit ausgeprägtem Weichteildefekt; rechts: PVA-Schwamm zur Fixation eines Meshgrafts nach Platzbauch.

Eine kurze Richtlinie, wann nun welche Schwammsorte anzuwenden ist, geben Wild et al. (6) in Form der folgenden Tabelle 1:

<b>Polyurethanschwamm (schwarz)</b>	<b>Polyvinylalkoholschwamm (weiß)</b>
Fibrinanteil über 35%	Granulationsgewebeanteil über 65%
Flockiges, trübes Sekret	Seröses Sekret
Infizierte Wunde	Chirurgisch gesetzte Wunde

**Tabelle 1: Auswahlkriterien für die unterschiedlichen Schwammsorten (6)**

Ist der richtige Schwamm gewählt, wird dieser möglichst passgenau für die zu behandelnde Wunde zurechtgeschnitten. Er sollte weder über die Wundränder hinausgehen, noch Wundflächen freilassen. Der Einlage des Schwammes in die Wunde

geht in der Regel ein ausführliches *Debridement* voraus (7). Anschließend wird die Wunde samt eingelegtem Schwamm durch die PU-Folie luftdicht versiegelt und mittels *trac-pad connector* direkt mit der Vakuumpumpe verbunden, welche den gewünschten Unterdruck erzeugt.

Als klinischer Standard hat sich hierbei ein Unterdruck von -125 mmHg durchgesetzt, wobei in der Zusammenschau der Literatur davon ausgegangen wird, dass eine effektive therapeutische Wirkung in Druckbereichen zwischen -40mmHg und -150mmHg vorliegt (8). Ob dieser Druck jedoch besser kontinuierlich über den gewünschten Therapiezeitraum hinweg aufrechterhalten werden soll oder beispielsweise in 5-minütigen Zyklen mit 2-minütigen Pausen intermittierend appliziert werden sollte ist noch nicht endgültig geklärt und wird weiter diskutiert (9).

### **1.1.3 Indikationen zur Vakuumtherapie**

Das Anwendungsgebiet der Vakuumtherapie hat sich in den vergangenen Jahren rapide ausgeweitet. Über das klassische Einsatzgebiet bei chronisch nicht heilenden Wunden, wie beispielsweise einem *Ulcus cruris* (10), hinaus hat sie sich in klinischen Studien zu ihrer Anwendung bei den verschiedensten Krankheitsbildern bewährt und als vorteilhaft erwiesen. Hierzu zählen unter anderem: Verbrennungswunden (11), Diabetisches Fußsyndrom (12), offenes Abdomen (13), Fixierung von Hauttransplantaten (14) und sternale Wundinfekte (15).

Basierend auf einem Konsenspapier der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Wundheilung gibt die folgende Tabelle 2 einen kurzen Überblick über die Indikationen, sowie Kontraindikationen der Vakuumtherapie (16) (17):

<b>Indikationen</b>	<b>Kontraindikationen</b>
Akute oder traumatische Wunden	Karzinomwunden
Chronische Wunden	Gefäßanastomosen
Dehiszente Wunden	Freiliegende Gefäße
Wundkonditionierung	Blutungsneigung
Verbrennungswunden	Gerinnungsstörungen
Meshgraftfixation	
Ulcus cruris	
Diabetisches Fußsyndrom	
Temporäre Weichteildefektdeckung	
Infizierte Wunden nach chirurgischem Debridement / Abszessspaltung	
Offenes Abdomen	
Dekubitus	
Sternale Wundinfekte	

**Tabelle 2: Indikationen und Kontraindikationen der Vakuumtherapie**

#### **1.1.4 Wirkungsweise der Vakuumtherapie**

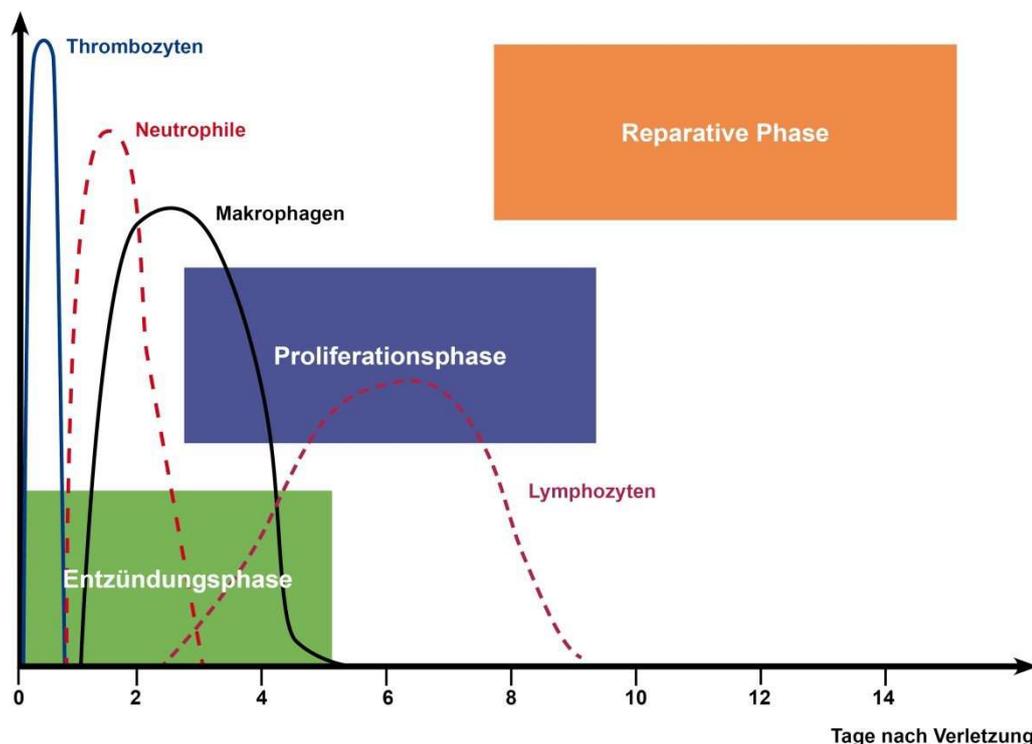
Wie im vorigen Abschnitt beschrieben haben diverse klinische Studien *in vivo* positive Effekte der Vakuumtherapie auf die Wundheilung bei verschiedensten Krankheitsbildern gezeigt. Im Allgemeinen werden diese Effekte auf folgende Mechanismen zurückgeführt (18):

- Steigerung der lokalen Durchblutung
- Reduktion des Wundödems
- gesteigerte Bildung von Granulationsgewebe
- gesteigerte Zellproliferation
- Reduktion von Wachstumsinhibitoren im Wundmilieu
- Reduktion der Keimbelastung in der Wunde / Schutz der Wunde vor weiterer Kontamination
- mechanische Annäherung der Wundränder

Im Bereich der Grundlagenforschung *in vitro* sieht dies jedoch weitestgehend anders aus. Sowohl Wackenfors et al. (19), als auch Kairinos et al. (20) beschreiben, dass hier die Datenlage rar ist und es bis heute nicht endgültig verstanden ist, wie hypobare Druckverhältnisse im Gewebe auf molekularer Ebene die Wundheilung beschleunigen. Einer der wissenschaftlichen Erklärungsansätze hierfür ist, dass der applizierte Unterdruck per Mikrodeformation die Zellen der Wundmatrix zur Proliferation anregt. Darüber hinaus legen einige experimentelle Daten die Vermutung nahe, dass Unterdrucktherapie die lokale Zytokin-Expression im Wundgebiet moduliert (9).

## 1.2 Wundheilung

Wie in Abb. 2 dargestellt wird der physiologische Wundheilungsprozess in 3 Phasen unterteilt, welche sich sowohl im räumlichen als auch im zeitlichen Ablauf überschneiden: Die Entzündungsphase, die Proliferationsphase und die Reporative Phase. Während diesem komplexen Prozess kommen den unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Funktionen zu. Die Funktionen der für diese Arbeit relevanten Zellen sind im Folgenden kurz charakterisiert.



**Abb. 2 Physiologische Phasen der Wundheilung.** Der physiologische Wundheilungsprozess wird in Entzündungsphase, Proliferationsphase und Reporative Phase unterteilt. Die 3 Phasen überschneiden sich zeitlich wie räumlich, was durch die Überlappung der verschiedenfarbigen Rechtecke dargestellt ist. Das Auftreten der verschiedenen Zelltypen ist durch die gestrichelten, bzw. durchgezogenen Linien innerhalb der Rechtecke abgebildet (21).

### **1.2.1 Fibroblasten**

Der physiologische Wundheilungsprozess läuft wie oben beschrieben stets nach dem gleichen Schema ab, dennoch gibt es unterschiedliche Formen der Wundheilung in Abhängigkeit von der zu Grunde liegenden Wunde. Man unterscheidet hier erneut 3 Formen der Wundheilung: Neben der epithelialen Wundheilung, bei welcher nur die Epidermis oberflächlich verletzt wurde und ein rasches Abheilen durch die Regeneration der Epithelzellen erfolgt, sowie der primären Wundheilung, bei welcher die Wundränder beispielsweise nach einem chirurgisch gesetzten Schnitt gut adaptiert sind und somit eine rasche Wundheilung ermöglichen, existiert die sekundäre Wundheilung. Diese Form der Wundheilung kommt zum Tragen, wenn nach einem ausgedehnten Substanzverlust die Wunde zunächst mit Granulationsgewebe aufgefüllt werden muss (22). Neben Leukozyten und Endothelzellen sind Fibroblasten bei dieser Wundheilungsform mit die ersten Zellen, die in das Wundgebiet einwandern. Sie beginnen mit der Synthese von Kollagen Typ I und Typ III und stellen so in Form der extrazellulären Matrix eine Art Gerüst her, welches die Grundlage des folgenden Wundverschlusses darstellt (23). Darüber hinaus sind sie durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren an der Angiogenese im Wundgebiet beteiligt (24) und führen durch ihre Differenzierung in Myofibroblasten zu einer weiteren Kontraktion der Wunde (25). Wie in Kapitel 1.1.3 zu lesen, sind die weitaus meisten Indikationen der Vakuumtherapie eben solche, die eine sekundäre Wundheilung erfordern.

### **1.2.2 THP-1-Zellen**

Neben Fibroblasten spielen auch Makrophagen und Monozyten eine zentrale Rolle in der Wundheilung. Sie setzen ca. 48 – 72 Stunden nach einer Verletzung den Prozess der Phagozytose im Bereich der Wunde fort, welcher ursprünglich von neutrophilen Granulozyten übernommen wurde. Im Rahmen der Phagozytose sorgen die Zellen vor allem in der Entzündungsphase der physiologischen Wundheilung dafür, dass Fremdmaterial, Bakterien, tote Zellen und beschädigte Extrazelluläre Matrix aus dem Wundgebiet entfernt werden. Die bei der Phagozytose entstehenden Spaltprodukte führen dabei ebenso zu einer Einwanderung von Fibroblasten in das Wundgebiet wie die weiteren chemotaktisch aktiven Substanzen, welche die Makrophagen und Monozyten sezernieren. Hier sind vor allem Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ),

tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und fibroblast growth factor (FGF) als wichtige Zytokine und Wachstumsfaktoren anzuführen (26, 27).

Als Modell für eben diese beiden Zell-Typen wurden in dieser Arbeit THP-1-Zellen genutzt. Hierbei handelt es sich um eine monozytäre Zelllinie, welche aus dem Blut eines 1-jährigen, an akuter monozytärer Leukämie erkrankten, Jungen isoliert wurden. Mittels Phorbolestern, wie beispielsweise Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), lassen sich die THP-1-Zellen in Makrophagen differenzieren (28) .

### **1.2.3 Mesenchymale Stammzellen**

Zunehmende Bedeutung im Bereich der Wundheilung wird in den letzten Jahren auch den mesenchymalen Stammzellen (MSCs) zugeschrieben. Sie sind in alle 3 Phasen der physiologischen Wundheilung auf regulatorischer Ebene eingebunden und sind vor allem auch mitverantwortlich dafür, dass die Wunde über die Entzündungsphase hinauskommt und nicht etwa in Form einer chronischen Wunde in dieser Phase verbleibt. Dies bewältigen sie, indem sie den Entzündungsprozess durch Reduktion proinflammatorisch wirksamer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), bei gleichzeitiger Sekretion anti-inflammatorisch wirksamer Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-4 (IL-4) eindämmen.

In der Proliferationsphase sind sie dann ähnlich den Monozyten und Makrophagen vor allem an der chemotaktischen Rekrutierung von Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und weiteren für den Wundverschluss wichtigen Zellen beteiligt (26).

In der abschließenden reparativen Phase verhindern die MSCs dann durch die Sekretion von Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Hepatocyte growth factor (HGF) eine überschießende Narbenbildung (29,30).

Für diese Arbeit wurden Adipose-derived stem cells (ASCs) aus dem Liposuktionsfett verschiedener Patienten als Beispiel für MSCs genutzt.

### **1.2.4 Jurkat T-Zellen**

Aus verschiedenen Tierversuchen ist bereits seit längerem bekannt, dass funktionell aktive T-Zellen einen wichtigen Beitrag zur Wundheilung leisten. Will man allerdings genau untersuchen wie dieser Beitrag aussieht, müssen zunächst die cytotoxischen CD8<sup>+</sup> Zellen von den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen unterschieden werden. Während die CD8<sup>+</sup> cytotoxischen T-Zellen inhibitorisch auf den Prozess der Wundheilung wirken, wirken die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen promotorisch auf ihn (31). Eine entscheidende Rolle im

Rahmen der Wundheilung spielt also die Balance zwischen T-Helferzellen und cytotoxischen T-Zellen (32). Im Verlauf des Wundheilungsprozesses verändert sich diese jedoch kontinuierlich. Zum Abschluss der Wundheilung hin fällt die Gesamtzahl der T-Zellpopulation im Wundbereich ab und die Balance verschiebt sich zugunsten der inhibitorisch wirkenden cytotoxischen T-Zellen. Es liegt also der Schluss nahe, dass diese Veränderung der T-Zell-Population im Wundgebiet vor allem eine überschießende Narbenbildung verhindern soll bzw. den Wundheilungsprozess abschließt. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass diese Erkenntnisse nicht nur im Tiermodell zutreffend sind, sondern anscheinend auch für den Wundheilungsprozess beim Menschen gelten (33).

Als weit verbreitetes T-Zell-Modell wurden in dieser Arbeit Jurkat-T-Zellen genutzt. Diese Zelllinie entstammt dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen, der an einer akuten lymphatischen Leukämie erkrankt war. Sie ist immunologisch als CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup> charakterisiert (34).

### **1.2.5 HUVECs**

Die Neoangiogenese ist vor allem in der proliferativen Phase der Wundheilung ein wichtiger Schritt, in welchem endotheliale Zellen Fibroblasten beim Aufbau und der Reperatur der extrazellulären Matrix unterstützen (35). Jede Art einer Störung der Gefäßneubildung trägt hingegen zu einer gestörten bzw. verzögerten Wundheilung bei. Klinische Studien weisen darauf hin, dass eine vakuumunterstützte Wundtherapie die Angiogenese fördern kann (36). Die Molekularen Mechanismen sind jedoch weiterhin unklar. Um in diesem Bereich weitere Daten zu generieren, wurden in dieser Arbeit Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) repräsentativ für den Zelltyp der für die Angiogenese verantwortlichen Endothelien genutzt.

## **1.3 Zytokine**

Im Gegensatz zu den Hormonen, welche ihre Wirkung überwiegend endokrin entfalten, stellen Zytokine Signalmoleküle dar, die vor allem autokrin, parakrin und juxtakrin wirken. Eine der gängigsten Einteilungen der Zytokine wird anhand ihrer biologischen Funktion vorgenommen: Man unterscheidet hierbei Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine. Für diese Arbeit von besonderem Interesse sind die Interleukine, sowie die Wachstumsfaktoren, welche ihre Hauptaufgabe in der

Regulation der Richtung, der Intensität und der Dauer einer Immunantwort bzw. Entzündungsreaktion finden, aber auch Proliferation, Differenzierung und Apoptoseverhalten der Zielzellen beeinflussen (37). Die für diese Arbeit relevanten Zytokine sind im Folgenden kurz beschrieben.

### **1.3.1 Interleukin-1 (IL-1)**

Interleukin-1 stellt ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin dar, welches neben Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  zu den endogenen Pyrogenen zählt. Darüber hinaus trägt Interleukin-1 entscheidend zur Leukodiapedese der Leukozyten aus dem Blutstrom hin zum Ort der Entzündungsreaktion bei. Es kommt in den beiden Isoformen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vor, die sich als reife Formen in ihrer biologischen Wirkweise jedoch kaum voneinander unterscheiden (37). Im Gegensatz zu IL-1 $\beta$  besitzt IL-1 $\alpha$  allerdings eine biologisch aktive Vorstufe, welche intrazellulär verbleibt und die Transkription beeinflusst (38). Wesentliche Produzenten des IL-1 sind Monozyten und Makrophagen, aber auch Fibroblasten und Endothelzellen sind zur Synthese von IL-1 im Stande. Die proinflammatorische Wirkung von IL-1 wirkt sich neueren Untersuchungen zur Folge jedoch auch negativ auf die Wundheilung aus. So konnten Mirza et al. (39) in einem Mäusemodell zeigen, dass die Blockade des IL-1 Signalweges dazu führt, dass verstärkt Makrophagen gebildet werden, welche einen Phänotypen zeigen, der die Wundheilung begünstigt. Somit ist davon auszugehen, dass eine Reduktion der IL-1 Konzentration im Wundmilieu die Wundheilung verbessert.

### **1.3.2 Interleukin-6 (IL-6)**

Wie Interleukin-1 ist auch Interleukin-6 ein proinflammatorisches Zytokin und endogenes Pyrogen, welches für eine effektive Immunantwort unabdingbar ist. Hauptbildner des IL-6 sind ebenfalls Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Während IL-1 jedoch ein sehr breites Spektrum an Zielzellen stimuliert, ist der IL-6-Rezeptor vor allem auf Zellen des Immunsystems membranständig exprimiert. Neben Monozyten und Makrophagen sind auch natürliche Killerzellen, sowie B- und T-Lymphozyten wesentliche Zielzellen des IL-6. Darüber hinaus induziert es die Bildung von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) in der Hypophyse und sorgt somit für eine gesteigerte Cortisol-Ausschüttung aus der Nebenniere (7). Um weitere Zellen zu erreichen kommt der Sekretion des löslichen IL-6-Rezeptors in das Wundmilieu eine entscheidende Rolle im Rahmen der Entzündungsreaktion zu. Es ist beschrieben, dass

die Sekretion des löslichen IL-6-Rezeptors zwar eine physiologische Reaktion auf Apoptose darstellt, allerdings bei einer überschießenden Reaktion auch zur Fibrosierung führen kann (40). Gerade bei Problemwunden, bei welchen die Vakuumtherapie vorrangig zum Einsatz kommt, kann es also ein wichtiger Therapieansatz sein, die IL-6 Konzentration im Wundmilieu gering zu halten.

### **1.3.3 Interleukin-8 (IL-8)**

Ein weiteres proinflammatorisch wirksames Zytokin ist Interleukin-8. Es wird zwar wie die bereits erwähnten Interleukine auch von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und diversen anderen Zellen synthetisiert, unterscheidet sich von diesen jedoch darin, dass es zusätzlich von neutrophilen Granulozyten gebildet wird und diese auch rekrutieren kann. Ein wesentlicher Effekt von Interleukin-8 auf die neutrophilen Granulozyten ist die Anregung der Zellen zum *Oxidative Burst*, also der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen der Phagozytose. Lan et al. (41) haben beschrieben, dass eben diese Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und die damit verbundenen erhöhten Konzentrationen an IL-8 und reaktiven Sauerstoffspezies im Wundbereich zu einer verzögerten Wundheilung führen können. Somit scheint auch hier die Reduktion von IL-8 im Wundmilieu ein Therapieansatz zu sein, welcher die Wundheilung verbessert.

### **1.3.4 Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Ein für die Initiation des Entzündungsprozesses bedeutendes Zytokin ist TNF- $\alpha$ . Es ist an der Entstehung von Fieber beteiligt und bringt die Synthese der Akute-Phase Proteine, sowie verschiedener anderer Entzündungsmediatoren in der Leber in Gang. Die Synthese von TNF- $\alpha$  erfolgt wie bei den bisher beschriebenen Zytokinen ebenfalls überwiegend in Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten. Neben den bisher beschriebenen Funktionen von TNF- $\alpha$  wird ihm eine wichtige Rolle in der Pathogenese von entzündlichen, infektiösen und malignen Prozessen im menschlichen Körper zugeschrieben (7). Auch hier haben Untersuchungen in den letzten Jahren gezeigt, dass gerade in Problemwunden, sowie bei älteren Patienten, erhöhte TNF- $\alpha$ -Spiegel auftreten. Verschiedene Therapieansätze, welche die lokale TNF- $\alpha$  Konzentration im Wundbereich verringern, werden somit als

aussichtsreich in der Verbesserung der Wundheilung betrachtet (42). Einer dieser Ansätze könnte wiederum die Unterdrucktherapie sein.

### **1.3.5 Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

TGF- $\beta$  ist ein weiteres Zytokin, welches die Wundheilung beeinflusst. TGF- $\beta$  wird von verschiedenen Zellen, u. a. Makrophagen und Fibroblasten, gebildet, kann aber auch im Rahmen der Wundheilung aus Speicherstätten in der zerstörten Extrazellulärmatrix freigesetzt werden. Es liegt in den 3 Isoformen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 vor, welche durchaus unterschiedliche Rollen im Rahmen des Wundverschlusses einnehmen. Während TGF- $\beta$ 1 beispielsweise als fibrosesteigernd und narbenbildend beschrieben wird, werden TGF- $\beta$ 3 Eigenschaften zugeschrieben, welche die Bildung von Narben verhindern. Wichtige positive Effekte von TGF- $\beta$ 1 für die Wundheilung sind die Steigerung der Synthese von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, eine gesteigerte Angiogenese und eine gesteigerte Fibroblastenproliferation bzw. Differenzierung in Myofibroblasten. Dennoch gibt es ebenfalls Studien, welche TGF- $\beta$ 1 einen negativen Effekt auf die Wundheilung zuschreiben. Es ist also davon auszugehen, dass die Wirkung von TGF- $\beta$  vor allem von dem komplexen Zusammenspiel verschiedener Mediatoren und Bedingungen im Bereich der Wunde abhängt (35).

### **1.3.6 Vascular endothelial growth factor (VEGF)**

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist der potenteste aktuell bekannte Stimulator der Endothelzellproliferation. Er ist vor allem für die Initiation der Neoangiogenese, also der Neubildung von Gefäßen, verantwortlich und wird als zentraler Vermittler dieses Prozesses angesehen. Neoangiogenese ist ein für die Wundheilung unerlässlicher Prozess, da über die neuen Blutgefäße die Wunde mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird und die Integrität des Gefäßsystems wiederhergestellt wird. Desweiteren verstärkt VEGF die Gefäßpermeabilität und Vasodilatation, sodass eine optimale Durchblutung des Wundgebietes gegeben ist. VEGF wird vor allem von Keratinozyten, Fibroblasten und Makrophagen synthetisiert und liegt in multiplen Isoformen vor. Seine Wirkung entfaltet VEGF über die beiden Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. Verschiedenste Studien konnten zeigen, dass eine verstärkte VEGF-Expression mit der Neoangiogenese während der Wundheilung assoziiert ist (29).

## 2 Ziele der Arbeit

Wie in Kapitel 1.1.4 bereits beschrieben, sind die molekularen Wirkmechanismen der Vakuumtherapie noch unvollständig geklärt. Die breite klinische Anwendung dieser Therapieform ist nur ungenügend mit wissenschaftlichen Erkenntnissen aus dem Bereich der Grundlagenforschung untermauert. So sehen verschiedene Forschungsgruppen, wie beispielsweise auch Glass und Nanchahal (9), in der weiteren Aufklärung der molekularen Auswirkungen der Vakuumtherapie den Schlüssel zur weiteren Optimierung und effizienteren Nutzung dieses Therapieansatzes.

In diesem Zusammenhang ist es das Ziel dieser Arbeit folgende Fragen im *in vitro* Modell zu beantworten:

1. Wirken sich hypobare Bedingungen negativ auf das Überleben dermalen Fibroblasten, Monozyten, T-Lymphozyten, HUVECs und ASCs in Zellkultur aus?
2. Wie wirken sich hypobare Bedingungen auf das Proliferationsverhalten von dermalen Fibroblasten, Monozyten, T-Lymphozyten, HUVECs und ASCs in Zellkultur aus?
3. Begünstigen hypobare Bedingungen die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten?
4. Beeinflussen hypobare Bedingungen die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen?
5. Wird die sekretorische Immunantwort von Fibroblasten, Monozyten und ASCs durch hypobare Bedingungen verändert?
6. Wie wirken sich hypobare Bedingungen auf das Migrationsverhalten dermalen Fibroblasten aus?
7. Nehmen hypobare Bedingungen Einfluss auf die Neoangiogenese im Wundgebiet?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Laborgeräte und Software

<b>Gerät</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>
Absauganlage	Vacuboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Absaugpumpe	LABOPORT	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, BRD
Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, BRD
Brutschrank	HERACELL 150i CO <sub>2</sub> - Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Eismaschine	AF 80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
Gefrierschrank -20°C	Premium NoFrost	LIEBHERR-International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	HeraFreeze	Heraeus Holding GmbH, Hanau, BRD
Geldokumentationsanlage (Western)	BioRad GelDoc	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Gelkammer	Mini-Protean TetraCell PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Heizblock	dry bath	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Heizplatte u. Rührer	IKAMAG RH	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, BRD
Kühlschrank 4°C		LIEBHERR-International AG, Bulle, Schweiz
Mikroskop	Axio vert. A1, 10x	Carl Zeiss AG, Oberkochen, BRD
Multipette	Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
PC		Dell Inc., Round Rock, Tx, USA
Pipette 100-1000µl	eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipette 10-100µl	eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipette 1-10µl	eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipette 5ml	ErgoOne	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD

Pipettierhilfe	accu-jet pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, BRD
Plattenlesegerät	Victor <sup>3</sup>	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
Plattenschüttler	KM-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, BRD
Power Supplier	Mini-Protean TetraCell PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Sicherheitsbrenner	Fuego SCS basic RF	WLD-Tec, Göttingen, BRD
Sonifizierer	DU 50 H (Cycle 0,5; Amplitude 80%)	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, BRD
Sterilbank	HERAsafe	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Taumelrollenmischer	RM 5	CAT Ingenieurbüro M. Zipperer GmbH, Staufen, BRD
Transferkammer	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Vortexer	IKA MS3 basic (3000 U/min)	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, BRD
Waage	Kern ABJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, BRD
Wärme-Bad 37°C	Aqualine AL 12	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda- Königshofen, BRD
Zentrifuge	HERAEUS Megafuge 16R centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, BRD
Zentrifuge	HERAEUS Pico 17 centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, BRD

**Tabelle 3: Geräte**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Excel 2007	Microsoft Corp., Redmond, USA
ImageJ	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, BRD
Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
QuantityOne 4.6.5	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Wallac 1420	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
WorkOut 2.0	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA

**Tabelle 4: Software**

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Handelsname	Hersteller
6-Well-Platte	CytoOne 6-Well Plate with Lid	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Bechergläser		vwr International GmbH, Darmstadt, BRD
Blotting Membran	Nitrocellulose Blotting-Membran (Porengröße 0,2µm)	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, BRD
Blotting Papier	Blotting Filter Paper 2,5mm thick	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Falcons / Zentrifugenröhrchen	Cellstar Tubes (15ml / 50ml)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
Glaspipetten	Pasteurpipetten aus Glass	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, BRD
Handschuhe M	Micro-Touch Nitrile, Powder free	Ansell GmbH, München, BRD
Kryocontainer	Nalgene® Freezing Container "Mr. Frosty"	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Kryoröhrchen	Cryo.S	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
Mikrotiter-Folie	Plate Sealers	Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA, USA
Mikrotiter-Platte	Microplates, 96 well ELISA Microplates	Greiner Bio-One International, Kremsmünster, AT
Müllbeutel	Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, BRD
Multipipetten-Spitzen (0,5ml; 5ml; 10ml)	Combitips Plus steril/unsteril	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Neubauer-Kammer	Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, BRD
Parafilm	Parafilm "M"	Bemis Company, Inc., Neenah, WI, USA
Petrischale	Cellcoat, Zellkulturschale 60x15mm	Greiner Bio-One International, Kremsmünster, AT
Pipettenspitze 10µl	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipettenspitze 100µl	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD

Pipettenspitze 1000µl	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipettenspitze 10ml	costar Stripette	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitze 25ml	costar Stripette	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitze 2ml	costar Stripette	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitze 5ml	costar Stripette	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	microtubes	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, BRD
Skalpell	Feather Disposable Scalpel	FEATHER Safety Razor Co, Ltd., Osaka, Japan
Spritze 10ml	Inject	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD
Spritze 20ml	Luer Solo Inject	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD
Spritze 50ml	Original Perfusor Spritze; Luer Lock Solo	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD
Spritze 5ml	Omnifix/ Luer Lock Solo	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD
Sterilfilter-Siebnetz	NY-membrane 0,2µm	Sartorius AG, Göttingen, BRD
T-75 Zellkulturflasche	cell culture flasks; sterile, red filter cap 75cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One International, Kremsmünster, AT
Tonne für klinischen Abfall	Kontaminationsabfall	MAUSER-Werke GmbH, Brühl, BRD
Western Deckplatten, Gelplatte	Glasplatte 0,75mm	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Zellschaber	cell scraper	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT

**Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien**

### 3.1.3 Chemikalien

<b>Produkt</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>
A. dest	Demi-Wasser	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, BRD
A. dest	distilled water	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Acrylamid	30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid "Rotiphorese Gel 30"	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD

APS	Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Ascorbinsäure	L-Ascorbic acid 2-phosphate sequimagnesium salt hydrate	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Aza	5'-Azacythidine 100 mg (in DMSO 50 mg/ml)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
BSA	Bovine Serum Albumin Fraktion V	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Calcitriol	1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3; 10 µg/1 ml; HPCC	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Calcium Chlorid Dihydrat	Calcium Chlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
CellTiter-Blue	CellTiter-Blue Reagent	Promega Corporation Madison, WI, USA
CO <sub>2</sub>	UN 1013	Linde AG, München, BRD
D-(+)-Glucose	D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Dexamethason		Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Dispase	Dispase II (neutral protease grade II); Bacillus polymyxa; 1,4U/mg	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
DMEM	DMEM; with 4,5 g/L Glucose; without L-Glutamine, Sodium Pyruvate; with 3,7 g/LNaHCO <sub>3</sub> ; sterile filtered	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, BRD
DMSO	Dimethyl Sulphoxide Hybri-Max	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Ethanol (70 %)	Wet Task	Kimberly-Clark Corporation, Neenah, WI, USA
Ethanol (90 %)	Ensure; Ethanol for analysis	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
FCS	Fetal Bovine Serum Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
FGF-2	recombinant Human FGF-basic	PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA
Glucose	D-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Glycerol	Rotipuran	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Glycerophosphat	beta-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA

Glycin	Glycine	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
HAMS F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Hepes	HEPES Buffer 1M 100 ml sterile	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Hoechst 33342	bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
HUVEC-Medium	Endopan 3, ready-to-use	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, BRD
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Kochsalz-Lösung	NaCl 0,9 % Ecotainer	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD
Kollagenase	Kollagenase Type I, CLS I, 270 U/mg	Biochrom AG, Berlin, BRD
Mercapto	2-Mercaptoethanol, for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Methanol	Methanol for analysis; Ensure	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Milchpulver	Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
NEAA	MEM NEAA 100x	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
PBS	Dulbecco's PBS; without Ca & Mg; sterile	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Pen/Strep	Pen Strep / Penicillin Streptomycin	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
p-Nitrophenol	4-Nitrophenol solution 10mM	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Ponceau S	SERVA Electrophoresis Ponceau S	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, BRD
Propidiumiodid	Propidium iodide	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
RPMI	RPMI 1640 Medium; with L-Glutamine, 2,0g/L NaHCO <sub>3</sub> ; low endotoxine	Biochrom AG, Berlin, BRD
RPMI w/o Phenol Red	RPMI 1640 w/o Phenol Red, w/o L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
SDS	VWR® Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Molekularbiologie	VWR® International GmbH, Darmstadt, BRD

Sodium Pyruvat	Sodium Pyruvate 100mM	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
TEMED	Electran; NNN'N'- Tetramethylethylen- edicamine	VWR International GmbH, Darmstadt, BRD
TRI Reagent		Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
TRIS	TRIS-HCl 1M Stock Solution	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Tris-Base	Merck KGaA 648310 Tris Base, Molecular Biology Grade Calbiochem®	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Trypanblau	Trypan Blue solution	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Trypsin	Trypsin/EDTA Solution; 0,05 %/0,02 % (w/v) in PBS; without Ca, without Mg	Biochrom AG, Berlin, BRD
Tween	Tween 20	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Western Blot Substrat	Ecl Western Blotting Substrate	Promega Corporation, Madison, WI, USA

**Tabelle 6: Chemikalien**

### 3.1.4 Puffer, Medien und Lösungen

#### 3.1.4.1 Zellkultur-Medien

Die nachfolgenden Kulturmedien wurden zur Kultivierung der in dieser Arbeit genutzten Zellen verwendet:

#### **HUVEC-Medium**

Endopan 3, ready-to-use, siehe Kapitel 3.1.3.

#### **Fibroblasten-Medium**

500	ml	RPMI
15	%	FCS
1	%	Pen/Strep
1	%	NEAA
1	%	Sodium-Pyruvat
1	%	HEPES

### **Jurkat-Medium**

500	ml	RPMI w/o Phenol Red
5	%	FCS
1	%	Pen/Strep

### **ASC-Medium**

500	ml	DMEM
10	%	FCS
2	ng/ml	Sodium-Pyruvat
1	%	Pen/Strep
1	%	L-Glutamin

### **ASC-Proliferationsmedium**

250	ml	DMEM
250	ml	HAMS F12 Medium
10	%	FCS
2	ng/ml	FGF-2
1	%	L-Glutamin
1	%	Pen/Strep

### **3.1.4.2 Puffer und Lösungen**

#### **RIPA-Puffer nach Abcam**

50	mM	TRIS (pH = 8)
150	mM	NaCl
1	%	NP-40
0,5	%	Na-deoxycholat
0,1	%	SDS

#### **Western Blot**

##### **Laufpuffer (10x)**

30,3	g	TRIS (pH 8,3 – 8,8)
144,2	g	Glycin
10	g	SDS
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

##### **Tris-Glycin Transferpuffer (25x)**

18,2	g	Tris-Base
90	g	Glycin
		ad 500 ml H <sub>2</sub> O

### Blotting Puffer

60	ml	Tris-Glycin Transferpuffer
75	ml	Methanol
		ad 750 ml H <sub>2</sub> O

### 4x Sammelgelpuffer

6,05	g	TRIS (pH = 6,8)
0,4	g	SDS
		ad 100 ml H <sub>2</sub> O

### 4x Trenngelpuffer

91	g	TRIS (pH = 8,8)
2	g	SDS
		ad 500 ml H <sub>2</sub> O

### Sammelgel (1 Gel)

650	µl	30 % Acrylamid
3	ml	H <sub>2</sub> O
1,25	ml	4x Sammelgelpuffer
10	µl	TEMED
25	µl	10 % APS

### 10% Trenngel (1 Gel)

2,5	ml	30 % Acrylamid
3,125	ml	H <sub>2</sub> O
1,875	ml	4x Trenngelpuffer
10	µl	TEMED
25	µl	10 % APS

### 4x Laemmli-Puffer

2,5	ml	1 M Tris-HCl (pH = 6,8)
4	ml	Glycerol
0,8	g	SDS
eine Spatelspitze		Bromphenolblau
		ad 10 ml H <sub>2</sub> O

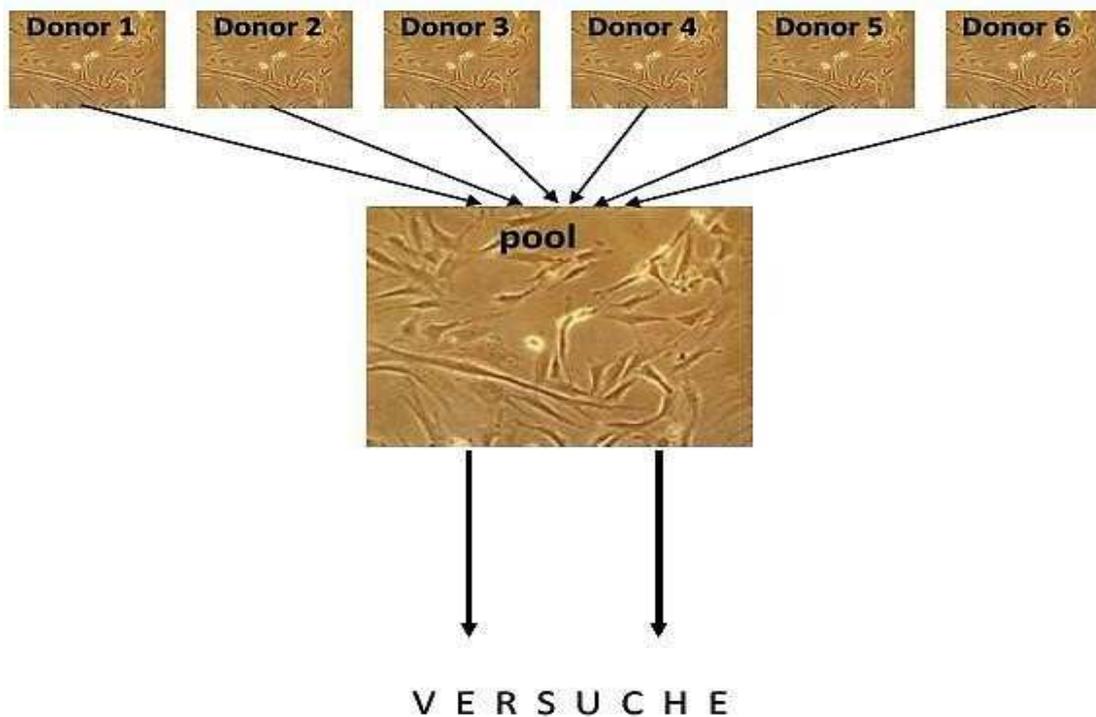
## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Methoden der Zellkultur**

#### **3.2.1.1 Verwendete Zellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen wurden bereits in den Kapiteln 1.2.1 bis 1.2.4 näher charakterisiert. Während die in Suspension wachsenden Zellen der THP-1- und Jurkat-Zelllinie von der Firma ATCC/LGC Standards GmbH, Wesel, BRD bezogen wurden, wurden Fibroblasten, HUVECs und ASCs, welche ebenfalls adhärentes Zellwachstum zeigen, selbst aus Spendermaterial isoliert. Der große Umfang der operativen Tätigkeiten in der Klinik für Unfall- und Handchirurgie, sowie die große Erfahrung der Mitarbeiter im Forschungslabor für Unfallchirurgie in der Etablierung menschlicher Zellkulturen erlaubten es, entsprechende Zellkulturbanken zu etablieren. Insgesamt konnten Zellkulturen von 28 Patienten im Altersintervall von 10 – 79 Jahren etabliert werden. Diese Arbeiten wurden kontinuierlich erweitert, um einen soliden Stock an Zellkulturen aufrecht zu erhalten. Um interindividuelle Unterschiede in der zu erwartenden biologischen Antwort auf den physikalischen Reiz (Unterdruck) zu nivellieren, wurden im Fall der Fibroblastenkultur nach Expansion der jeweiligen Zellkulturen die entsprechenden Isolate von 6 – 10 Individuen „gepoolt“ (vgl. Abb. 3). Der Zellvorrat wurde aliquotiert und kryokonserviert. Die Verwendung eines solchen einheitlichen Zellpools erlaubte es uns, die weiter unten genannten physiologischen Parameter unabhängig von den individuellen Schwankungen der Zelldonoren (Patienten) zu betrachten. Dies war jedoch nicht mit allen Zelltypen möglich, da wir nicht bei allen Zelltypen eine ausreichende Zahl an Patienten akquirieren konnten. Im Fall der verwendeten Endothelzellen (n=6) und fettstämmigen Stammzellpräparate (ASC, n=6) haben wir daher die entsprechenden Versuche mit individuellen Zellproben durchgeführt.

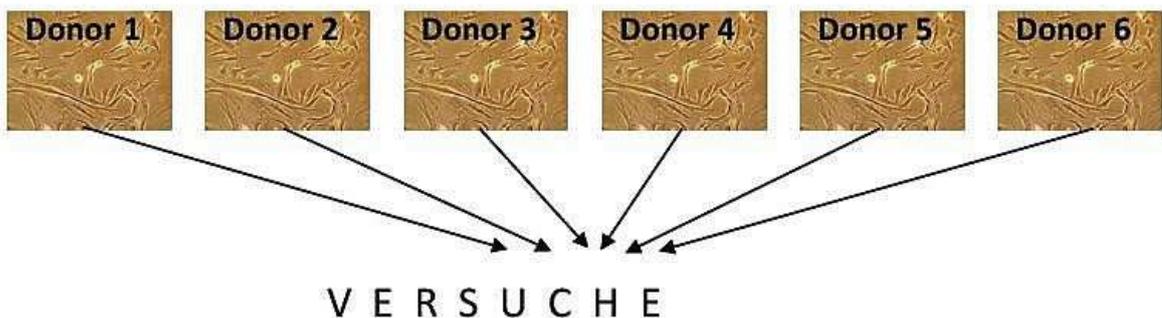
## Fibroblastenzellkultur



## Zellkultur

Endothelzellen – HUVEC

Fettgewebestammzellen – ASC



**Abb. 3** „Pooling“ der Zelldonoren im Falle der Fibroblastenzellkulturen (oben) und individuelle Zellproben im Falle der HUVECs und ASCs (unten). Um interindividuelle Schwankungen im Bereich der physiologischen Antwort auf den physikalischen Reiz (Unterdruck) zu nivellieren, wurden jeweils 6-10 Isolate der Zelldonoren im Falle der Fibroblasten „gepoolt“. Da dies bei den ASCs und HUVECs aufgrund zu niedriger Patientenzahlen (n=6) nicht möglich war, wurde bei den Versuchen mit diesen Zellen mit individuellen Proben gearbeitet.

## **Isolation von Fibroblasten**

Als Spendermaterial diente hier das Preputium penis der Zelldonoren. Um die Zellen aus den in Fibroblasten-Medium zwischengelagerten Vorhäuten zu isolieren, müssen zunächst die folgenden 2 Lösungen angesetzt werden:

- **Dispase-II-Lösung:**

PBS mit        0,1 % Dispase Typ II  
                  5 % Hepes

- **Kollagenase-Lösung:**

A. dest. mit    0,001 M CaCl  
                  0,005 M D-(+)-Glucose  
                  0,1 M Hepes  
                  0,12 M NaCl  
                  0,05 M KCl

sowie unmittelbar vor Gebrauch:    0,2 % Kollagenase Typ I  
  1,5 % BSA

Im Anschluss daran wird die Vorhaut zunächst in eine Petrischale mit Fibroblasten-Medium überführt und dort mit einem Skalpell möglichst weit zerkleinert. Hiernach wird das zerkleinerte Spendermaterial in ein Falcon gegeben, in welchem 8 ml der Dispase-II-Lösung vorgelegt wurden und über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert.

Am nächsten Tag wird das Falcon für 45 min im 37 °C Wärmebad unter Schütteln erwärmt, bevor die Reaktion durch Zugabe von 8 ml PBS abgestoppt wird. Daraufhin wird die Lösung 5 min mit 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es folgt die Zugabe von 8 ml Kollagenase-Lösung in das Falcon, sowie eine weitere Inkubation unter Schütteln im 37 °C Wärmebad, diesmal für 60 min. Der Falcon-Inhalt wird nun in ein 500 µl Kunststoffsieb überführt und durch das Sieb in eine Petrischale gestempelt. Dieser Schritt wird nach einmaligem Durchspülen des Siebes mit PBS noch einmal wiederholt. Dann wird das Sieb samt Inhalt verworfen und das in der Petrischale verbliebene Filtrat wieder in ein Falcon gegeben um bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert zu werden. Abschließend wird der Überstand abgenommen, das Zellpellet in Fibroblasten-Medium resuspendiert und in das gewünschte Zielgefäß überführt. Nach 24 h sollten die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt werden.

### **Isolation von MSCs**

Für die MSCs diente das Liposuktionsfett verschiedener Patienten im Alter von 12 bis 78 Jahren als Spendermaterial, aus welchem mesenchymale Stammzellen in Form von ASCs gewonnen wurden. Die Liposuktion selbst wurde in allen Fällen von Ärzten der Arteo Klinik für Plastische-Ästhetische Chirurgie in 40476 Düsseldorf durchgeführt.

Als erster Schritt der Isolation wird das Spendermaterial auf 50 ml Falcons verteilt und 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert um flüssige und feste Phase voneinander zu trennen. Die obere flüssige Phase wird nun entnommen und verworfen, während die untere Phase im Verhältnis 1:1 mit Kollagenase-Lösung versetzt wird. Es folgt eine 1-stündige Inkubation unter Schütteln im Wasserbad (37 °C). Anschließend wird die Suspension durch ein 250 µM Siebnetz filtriert und das Filtrat 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf das Zellpellet abgenommen. Das aus Erythrozyten und Stammzellen bestehende Pellet wird in 30 ml 0,9 %iger NaCl resuspendiert (Waschschritt) und die Zellsuspension ein weiteres Mal 10 min mit 1200 U/min zentrifugiert. Das nun entstandene Pellet wird in ASC-Proliferationsmedium aufgenommen, in T75er Flaschen ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch Waschen mit PBS erfolgt am nächsten Tag die Trennung der ASCs von den übrigen Zellen, da diese als einzige Zellen der Suspension adhärent wachsen. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgt im ASC-Medium.

### **Isolation von HUVECs**

Nach Besprühen der Nabelschnur mit 70 % Ethanol wird diese zunächst an beiden Enden durch eine Olive kanüliert um sie anschließend mit 20 ml PBS zu durchspülen. Hiernach werden ca. 10 ml Kollagenaselösung in das Lumen der Nabelschnur appliziert, bis diese auf der anderen Seite der Nabelschnur wieder austritt. Die Vene wird danach abgeklemmt und 20 min unter einem Tuch inkubiert um das Enzym gegen Wärmeverlust zu schützen. Ist die Inkubationszeit abgelaufen, überführt man die Kollagenase-Zellsuspension in ein 50 ml Falcon. Nach erneutem Durchspülen der Nabelschnur mit 10 ml Medium wird diese Zellsuspension ebenfalls in das Falcon überführt. Der Falcon-Inhalt wird für 5 min bei 400 g zentrifugiert, das Medium abgesaugt und das entstandene Zellpellet anschließend wieder in frischem Medium resuspendiert. Abhängig von der Größe der genutzten Nabelschnur können nun die Zellen in eine entsprechende Anzahl von T75er-Zellkulturflaschen überführt werden. Täglich sollten die Zellen mikroskopiert werden um etwaige Kontaminationen

frühzeitig zu bemerken. Nach 3 Tagen wird schließlich das Medium entfernt und die Zellen werden mehrfach mittels PBS gewaschen um möglicherweise verbliebene Erythrozyten zu entfernen. Abschließend wird frisches Medium auf die Zellen gegeben.

### **3.2.1.2 Routineprozeduren der Zellkultur**

#### **Zellen kultivieren**

Um die für den jeweiligen Versuch benötigte Zellzahl zu erreichen, wurden alle genutzten Zellen zunächst im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in T75-Zellkulturflaschen mit 18 ml des für den jeweiligen Zelltyp geeigneten Zellkulturmediums herangezüchtet (Vgl. Kapitel 3.1.4.1). Für die Zellen der THP-1-Zelllinie wurde dasselbe Medium genutzt wie für die Fibroblasten. Medienwechsel wurden je nach Bedarf alle 2 – 5 Tage durchgeführt. Bei den in Suspension wachsenden Zellen ist zu beachten, dass für einen Medienwechsel nicht wie bei den adhärent wachsenden Zellen einfach das alte Medium in der Flasche abpipetiert und ersetzt werden kann. Der gesamte Flascheninhalt muss in ein 50 ml Falcon überführt und anschließend bei 1200 – 1500 U/min 5 Minuten herunterzentrifugiert werden. Danach wird der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet in 18 ml frischem Medium resuspendiert um dann wieder in eine neue T75er Flasche überführt zu werden.

#### **Zellen ernten**

Während die in Suspension wachsenden Jurkat- und THP-1-Zelllinien einfach aus den für die Kultivierung verwendeten T75-Flaschen hinauspipetiert werden können, müssen die adhärent wachsenden ASCs und Fibroblasten zunächst mittels Trypsin von der Oberfläche der T75-Flaschen abgelöst werden.

Hierzu werden nach dem Absaugen des alten Mediums die Zellen zunächst mit 5 ml PBS innerhalb der T75-Flasche abgewaschen. Anschließend wird das PBS wieder abpipetiert und durch 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt. Es folgt eine 5 minütige Inkubation der Zellen im Brutschrank, nach welcher unter dem Mikroskop kontrolliert wird, ob sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst haben. Ist dies nicht der Fall, kann die Inkubation auf insgesamt maximal 10 Minuten verlängert werden. Unterstützend kann die Ablösung der Zellen auch durch sanftes Beklopfen der Flasche beschleunigt werden.

Sind die Zellen abgelöst, wird die Trypsin-Reaktion durch die Zugabe von 5 ml FCS-haltigem Medium abgestoppt und die Zellen können wie die Suspensionszellen aus der Flasche herauspipetiert werden.

### **Zellzahl bestimmen**

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend werden sie bei 1200-1500 U/min über 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wird abgesaugt und das Pellet, je nach Größe, in einem definierten Volumen von 2 bis 10 ml Medium resuspendiert.

50 µl der Suspension werden hiernach in einer Mikrotiter-Platte mit 50 µl Trypanblau 1:1 verdünnt. Diese Verdünnung kann dann in die vorher gemäß Gebrauchsanweisung vorbereitete Neubauer-Zählkammer zwischen Deckgläschen und Zählkammer eingebracht werden. Unter dem Mikroskop können nun in der Zählkammer die vitalen Zellen gezählt werden, da diese im Gegensatz zu toten Zellen in der Lage sind, das Trypanblau wieder heraus zu transportieren. Sie erscheinen also weiß vor dem blauen Hintergrund.

Ausgezählt werden 4 Großquadrate der Zählkammer mit anschließender Bestimmung des Mittelwertes der 4 Quadrate. Gemäß der Formel:

$\text{vitale Zellen / ml} = n \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor der Zellsuspension}$ <p><math>n = \text{Mittelwert der ausgezählten Großquadrate}</math> <math>10^4 = \text{Verdünnungsfaktor der Zählkammer}</math></p>
--

kann dann die Zellzahl pro Milliliter in der Suspension bestimmt werden.

### **Zellen aussäen**

Nachdem die Zellzahl pro Milliliter wie oben beschrieben in der Suspension bestimmt wurde, lässt sich über die Formel:

$\frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{vitale Zellen / ml}} = \text{benötigtes Volumen der Resuspension}$
---

berechnen, wie viele Milliliter der Suspension benötigt werden um die gewünschte Zellzahl für einen Versuch auszusäen.

### **Zellen einfrieren**

Zum Einfrieren überzähliger Zellen, welche für einen Versuch nicht benötigt werden, muss zunächst ein Einfriermedium angesetzt werden. Dieses besteht aus 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, einem organischen Lösungsmittel, welches die Bildung von Eiskristallen während dem Einfrieren verhindert) und 90 % FCS. Die Zahl der Zellen, welche weggefroren werden sollen, wird anschließend wie oben beschrieben bestimmt. Ist dies erfolgt, wird die Zellsuspension erneut bei 1200-1500 U/min 5 Minuten zentrifugiert und das überstehende Medium abgesaugt. Das entstandene Pellet wird dann in dem Volumen Einfriermedium resuspendiert, das benötigt wird um eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter Einfriermedium zu erreichen. Je 1 ml dieser Zellsuspension wird nun in die zum Wegfrieren genutzten Vials überführt und unmittelbar auf Eis gestellt. Ist die gewünschte Anzahl an Vials befüllt, werden diese zunächst über Nacht in einem Kryocontainer bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert. Dieser Container ermöglicht ein kontrolliertes Absinken der Temperatur um  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  pro Minute bis die Umgebungstemperatur erreicht ist. Die endgültige Lagerung erfolgt bei  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff.

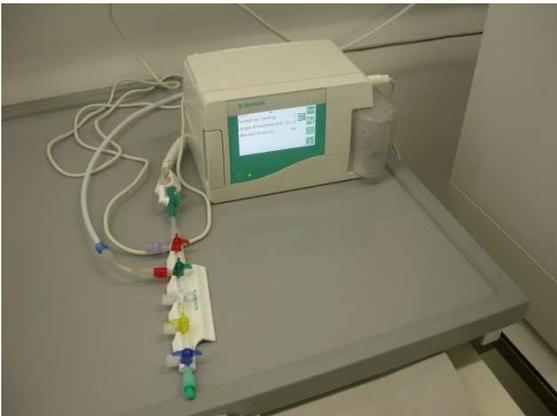
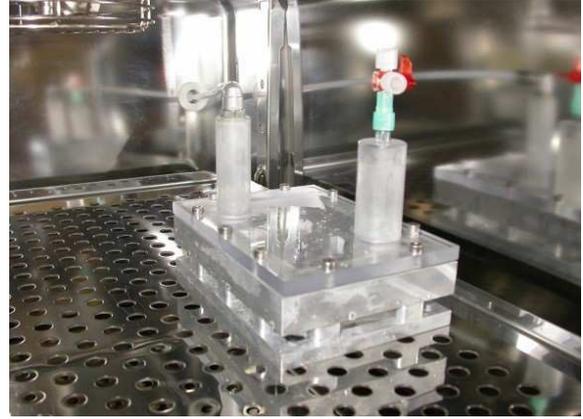
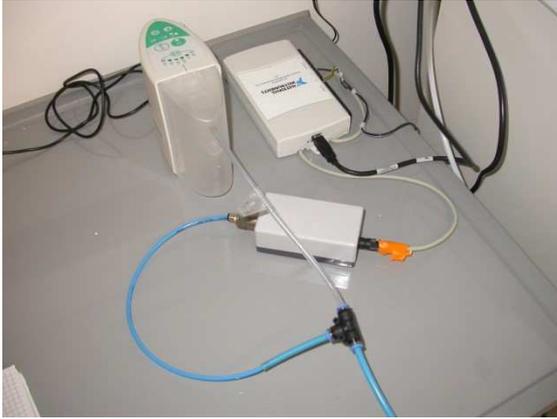
### **Zellen auftauen**

Sollen weggefrorene Zellen für einen weiteren Versuch wieder aufgetaut werden, so werden die Vials zunächst bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut. Sobald der Inhalt eines Vials flüssig geworden ist, wird dieser mittels 1 ml Pipette in ein Falcon mit 5 ml vorgewärmtem, für die jeweiligen Zellen geeigneten, Wachstumsmedium überführt. Das Falcon wird dann für 5 min bei 1200-1500 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wird in 5 ml Medium resuspendiert und in eine T75er-Flasche mit 13 ml vorgelegtem Medium überführt.

#### **3.2.1.3 Inkubation der Versuchszellen im Unterdruck**

In den in diese Arbeit eingeflossenen Versuchsansätzen wurden die jeweiligen Versuchszellen einem kontinuierlichen Unterdruck von  $-125 \text{ mmHg}$  (Vitalität, Proliferation und Migration) bzw.  $-250 \text{ mmHg}$  (sekretorische Immunantwort und Differenzierung) ausgesetzt. Um dies zu ermöglichen, wurden verschiedene Unterdruckkammern genutzt, in welche 6-Well, 12-Well oder 48-Well-Platten

eingesetzt werden können. Die Kammern selbst befanden sich während der Versuche innerhalb des Brutschrankes und waren über eine Öffnung in der Rückwand desselben mit der außerhalb des Schrankes stehenden Pumpe über ein Schlauchsystem verbunden. Bei den Pumpen wurden zunächst zwei eigens für diese Arbeit angefertigte Prototypen der Firma B.Braun genutzt. Da bei diesen jedoch immer wieder Probleme mit der Aufrechterhaltung des eingestellten Druckes auftraten, wurde später auf eine kommerziell erhältliche Pumpe der Firma KCI, Modell V.A.C.Ultra™ zurückgegriffen, welche bereits im Rahmen der VAC®-Therapie klinisch eingesetzt wird. Die verwendeten Unterdruckkammern wurden ebenfalls eigens für diese Arbeit von der Firma B.Braun entwickelt und hergestellt. Allerdings wurde parallel auch ein Eigenbau verwendet um mehr Kammern gleichzeitig zur Verfügung zu haben. Die in dieser Arbeit verwendeten Pumpen und Kammern sind in Abb. 4 bis Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 4: Unterdruckpumpen der Firma B.Braun.** oben: Pumpe der ersten Generation; unten: Pumpe der zweiten Generation

**Abb. 5: Die Unterdruckkammern der Firma B.Braun.** oben: Unterdruckkammer der ersten Generation; unten: Unterdruckkammer der zweiten Generation



**Abb. 6: Kommerziell erhältliche VAC®-Pumpe der Firma KCI. Modell V.A.C.Ultra™**

**Abb. 7: Selbstgebaute Unterdruckkammer.** Eigenbau aus einem 500 ml „WECK-Glas“, dem Deckel einer 6- oder einer 24-Well-Platte, sowie eines Stückes Infusionsschlauch

## **3.2.2 Untersuchte Parameter**

### **3.2.2.1 Vitalität**

Zunächst sollte geprüft werden ob die Unterdruckbehandlung selbst im genutzten Versuchsaufbau toxisch auf die Zellen wirken könnte. Hierzu wurden Fibroblasten, THP-1-Zellen, Jurkat-T-Zellen, HUVECs und ASCs in einer Konzentration zwischen  $2 \times 10^5$  und  $2 \times 10^6$  Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät und anschließend für 8h, 16h, 24h, 48h und 72h im Unterdruck inkubiert. Die Auswertung erfolgte jeweils mittels CellTiterBlue<sup>®</sup>-Assay oder Auszählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer (Vgl. Kapitel 3.2.1.2: „Zellzahl bestimmen“).

### **3.2.2.2 Proliferation**

Um das Proliferationsverhalten der verschiedenen Zellen bei -125 mmHg Unterdruck zu untersuchen, wurden die Zellen in einer reduzierten Konzentration zwischen  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät. Neben den Versuchsplatten wurden jeweils Kontrollplatten besät, welche ohne Unterdruck im Brutschrank inkubiert wurden. Auswertungen wurden über 12 Tage hinweg mittels CellTiterBlue<sup>®</sup>-Assay alle 24 h durchgeführt.

Um die Ergebnisse, welche bei den Jurkat-T- und THP-1-Zellen erhoben wurden, weiter abzuklären wurde für diese beiden Zelllinien im Anschluss an die Versuche zusätzlich eine Propidiumiodid, sowie eine Hoechst-Färbung durchgeführt.

### **3.2.2.3 Sekretorische Immunantwort**

Die Reaktion der Zellen auf einen inflammatorischen Reiz wurde an Fibroblasten, adipogenen Stammzellen und THP-1-Monozyten getestet. Hierfür wurden die Zellen in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  (Fibroblasten),  $5 \times 10^5$  (THP-1) und  $1 \times 10^5$  (ASCs) Zellen pro Well auf jeweils eine 6-Well-Platte pro Zelltyp ausgesät. Anschließend wurden pro Platte je 3 Wells mittels 500 U/ml Il-1 $\beta$  zytokinaktiviert, bevor die Inkubation im Unterdruck folgte. Parallel wurden als Kontrolle Platten besät, welche nach gleichem Muster zytokinaktiviert wurden, jedoch nicht dem Unterdruck ausgesetzt wurden. Nach 48 h wurden die Konzentrationen von Il-1, Il-6, Il-8 und TNF $\alpha$  mittels ELISA im Überstand der Versuchs- und Kontrollwells bestimmt.

#### 3.2.2.4 Differenzierung

Die Versuche zur Differenzierung der Zellen im Unterdruck beschränkten sich auf die induzierte bzw. VAC-assoziierte Differenzierung von THP-1-Monozyten zu Makrophagen und die spontane bzw. induzierte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Im Fall der THP-1-Monozyten wurden 6-Well-Platten mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well besät. Anschließend wurden die Zellen von 3 der 6 Wells pro Platte mit 5 ng/ml Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) zur Differenzierung in Makrophagen angeregt, bevor die Versuchsplatten in die Unterdruckkammern eingesetzt wurden. Nach 24 h bzw. 48 h im Unterdruck wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend die Zahl der adhärenen Zellen mit dem Mikroskop visualisiert. Da Makrophagen im Gegensatz zu Monozyten adhärent wachsen, kann die Anzahl adhärenen Zellen nach dem Waschen als Maß für die Differenzierung der Monozyten angesehen werden. Die nicht mit PMA stimulierten Wells ermöglichen es, die Frage zu klären, ob der Unterdruck per se eine Differenzierung der THP-1-Zellen induziert. Parallel zu den Versuchsplatten wurden gleich behandelte Platten als Kontrolle ohne Unterdruck im Brutschrank inkubiert.

Um die Differenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten zu untersuchen, wurden die Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Anschließend erfolgte die Aktivierung der Fibroblasten mittels 5 ng/ml TGF- $\beta$ , was zur Differenzierung der Zellen in Myofibroblasten führt. Nach 72 h Inkubation bei -250 mmHg folgte die immunzytochemische Anfärbung des myofibroblastenspezifischen Proteins  $\alpha$ -SMA zur Visualisierung der differenzierten Myofibroblasten, sowie die densitometrische Auswertung der grau-schwarzen  $\alpha$ -SMA Signale, um zunächst eine semiquantitative Auswertung des Versuchs zu ermöglichen. Als Kontrolle dienten identisch behandelte Platten, welche jedoch ohne 72-stündige Unterdruckapplikation im Brutschrank inkubiert wurden. Zur weiteren Quantifizierung wurde darüber hinaus die  $\alpha$ -SMA-Expression mittels Western Blot bestimmt und ebenfalls densitometrisch quantifiziert. Die densitometrischen Analysen wurden hierbei mit Hilfe des Programms „ImageJ“, welches vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg bezogen wurde, durchgeführt.

### **3.2.2.5 Migration**

Das Migrationsverhalten von Zellen bei -125 mmHg Unterdruck wurde anhand der Fibroblasten untersucht. Zu diesem Zweck haben wir die Zellen in einer Konzentration von  $9,5 \times 10^4$  Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät. 24 h nachdem die Zellen ausgesät wurden sind sie angewachsen und es wird mit Hilfe einer 1 ml Pipettenspitze eine Schneise durch die Zellen gezogen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Versuchsplatte im Unterdruck, die Kontrollplatte wird ohne Unterdruck im Brutschrank inkubiert. Alle 24 h erfolgt eine mikroskopische Fotodokumentation bei welcher die Breite der Schneise vermessen wird. Die Zeit, die die Zellen benötigen, um über die Schneise hinweg wieder Zell-Zell-Kontakt herzustellen, wird bei Versuchs- und Kontrollplatte bestimmt und verglichen.

### **3.2.2.6 Angiogenese**

Bei den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Versuchen im Bereich der Angiogenese wurde auf das AngioKit Modell der Firma TCS Cellworks, Buckingham, UK zurückgegriffen. Die Präparation und Inkubation der Versuchs- und Kontrollplatten, sowie die anschließende Auswertung der Zellen mittels immunzytochemischer Anfärbung von CD34- bzw. von-Willebrandt-Faktor erfolgte streng gemäß des Herstellerprotokolls. Die für den Versuchszeitraum von 11 Tagen im Unterdruck bei -125 mmHg inkubierten Zellen wurden jeweils mit den unbehandelten Kontrollzellen, welche lediglich im Inkubator platziert wurden, verglichen.

## **3.2.3 Methoden der Auswertung**

### **3.2.3.1 CellTiter-Blue<sup>®</sup> Assay**

Der CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay der Firma Promega, Madison, WI, USA, basiert auf der Reduktion des Stoffes Resaruzin zu Resorufin in den Mitochondrien vitaler Zellen. Resorufin emittiert Fluoreszenz bei 590 nm, sodass die mittels Victor bestimmte Fluoreszenz der untersuchten Zellen als proportional zur Anzahl vitaler Zellen im Versuchsansatz angesehen werden kann.

In dieser Arbeit wurde das CellTiter-Blue Reagent jeweils im Verhältnis 1:5 mit dem entsprechenden Zellkulturmedium verdünnt. Im Fall von 6-Well-Platten wurden 2 ml der Verdünnung auf die Zellen gegeben, bevor diese für 2 h bei 37 °C im Brutschrank

inkubiert wurden. Anschließend folgte die Fluoreszenz-Bestimmung mittels Plattenlesegerät und der Wallac 1420 Software.

### **3.2.3.2 ELISA**

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Verfahren, bei welchem mittels enzymatischer Farbreaktion verschiedenste Stoffe nachgewiesen werden können. Hierzu wird zunächst eine 96-Well Mikrotiterplatte mit einem für den nachzuweisenden Stoff spezifischen „Capture Antibody“ beschichtet, bevor die Proben in die Wells eingebracht werden. Anschließend wird ein mit HRP (horseradish peroxidase) konjugierter „Detection Antibody“ hinzugegeben und die ungebundenen Stoffe, die sich noch in den Wells befinden, werden mit Hilfe eines Waschpuffers herausgewaschen. Durch die Zugabe einer  $H_2O_2$  / Tetramethylbenzidin (TMB) – Mischung wird die eigentliche Farbreaktion gestartet, die nach 20 min wieder durch Hinzugabe von Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) gestoppt wird. Die Farbreaktion schlägt von Blau in Gelb um und mittels Plattenlesegerät kann bei 450 nm die Fluoreszenz bestimmt werden, welche proportional zur Konzentration des untersuchten Stoffes in den einzelnen Wells ist.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich DuoSet<sup>®</sup> ELISA – Kits der Firma R&D Systems, Minneapolis, MN, USA verwendet (Katalog Nr. DY201, DY206, DY208, DY210, DY293B). Die Durchführung erfolgte streng gemäß des jeweils beiliegenden Protokolls, die Fluoreszenz-Bestimmung erfolgte mittels Plattenlesegerät und der beiden Programme Wallac Workstation 1420 bzw. WorkOut 2.0.

### **3.2.3.3 Western Blot**

Das Prinzip des Western Blots ist der gezielte Nachweis bestimmter Proteine mit Hilfe spezieller Antikörper sowie die Quantifizierung des untersuchten Proteins. Hierfür muss zunächst die Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Proben bestimmt werden. Dies erfolgt mittels des Biocinic-Assays (BCA) der Firma ThermoScientific, Schwerte, BRD, bei welchem als Erstes die in 35  $\mu$ l RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay)-Puffer bei  $-80^\circ C$  eingefrorenen Zellpellets aus dem jeweiligen Versuch durch Sonifizieren (10 Ultraschall-Stöße) lysiert werden. Es folgt eine 1:6 Verdünnung der Proben bevor 10  $\mu$ l derselben auf eine Mikrotiterplatte überführt und mit jeweils 200  $\mu$ l des „Working Reagents“ (WR) versetzt werden. Das WR besteht aus Biocinon-Säure

und 4 % Kupfersulfat im Verhältnis 50:1. In 2 Reaktionsschritten bildet das  $\text{Cu}^{1+}$  in alkalischer Umgebung mit Proteinen, die 3 oder mehr Aminosäurereste besitzen, einen hellblauen Chelatkomplex, bevor im zweiten Schritt die Biocinon-Säure mit den reduzierten Kupferkationen des ersten Schritts einen purpurfarbenen Chelatkomplex bildet, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt. Somit kann mittels Plattenlesegerät und der Software WorkOut 2.0 die Proteinkonzentration der jeweiligen Proben über die Fluoreszenz bei 562 nm in der Mikrotiterplatte bestimmt werden. Zur Quantifizierung wird parallel hierzu in der Platte ein definierter BSA-Standard durchgemessen.

<b>Konzentration (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Probe (Bezeichnung)</b>	<b>BSA-Standard (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>PBS oder RIPA (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
2,0	A	300	0
1,5	B	375	125
1,0	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 = BLANK	I	0	400

**Tabelle 7: Herstellung des BSA-Standards**

Parallel zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben sollte bereits damit begonnen werden die SDS (*sodium dodecyl sulfate*) Polyacrylamid-Gele für die folgende Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese zu gießen.

Hierbei ist zu beachten, dass in Abhängigkeit von der Größe des Proteins, welches nachgewiesen werden soll, die Konzentration des Trenngels unterschiedlich gewählt werden muss. Die in dieser Arbeit als Marker für die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten nachgewiesenen Proteine  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) und  $\beta$ -Aktin weisen beide ein Molekulargewicht von 42 kDa auf, sodass gemäß Tabelle 8 10 %-ige Gele verwendet wurden.

<b>Proteingröße</b>	<b>Konzentration des Gels</b>
>250 kDa	5
250 – 120 kDa	7,5
120 – 40 kDa	10
40 – 15 kDa	12
<15 kDa	15

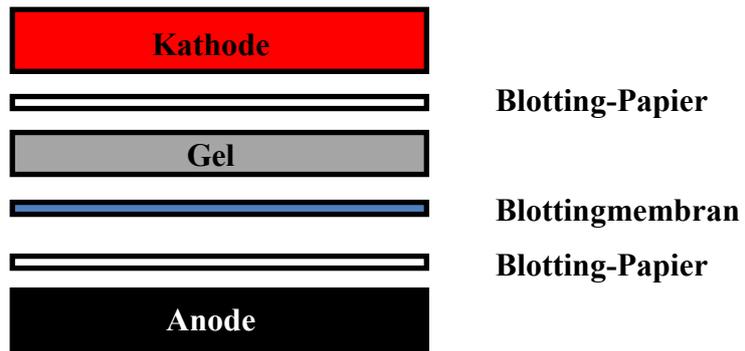
**Tabelle 8: Erforderliche Konzentration des Trenngels in Abhängigkeit von der Proteingröße**

Sind die Gele auspolymerisiert, können die Proben vorbereitet und in die Slots gegeben werden. Pro Slot werden im Fall von 0,75 mm bis 1 mm starken Gelen jeweils 40 µg Protein-Probe in einem Zielvolumen von 25 µl aufgetragen. Das Zielvolumen setzt sich aus der 40 µg Protein entsprechenden Menge der Probe, sowie 6 µl Laemmli-Puffer (mit SDS) zusammen. Die Differenz zu 25 µl wird durch Aqua dest. aufgefüllt. Unmittelbar vor dem Auftragen der so vorbereiteten Proben müssen diese für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt werden um so eine Denaturierung der Proteine zu erzielen.

Zum Einbringen der Proben in die Gele werden die Gele mitsamt dem Glasrahmen, in dem sie gegossen wurden, in die Laufkammer eingespannt, bevor der Plastikamm, welcher beim Gießen der Gele als Platzhalter für die Probenslots dient, entfernt wird. Anschließend wird die Laufkammer mit dem Laufpuffer gefüllt und die Slots werden mit Hilfe einer 1000 µl Pipette mit Laufpuffer durchgespült, bevor das definierte Probenvolumen in die Slots gegeben wird. Zusätzlich werden in einen freien Slot 3,5 µl eines Standard-Proteingemisches als Marker aufgetragen.

Als nächstes kann die Kammer verschlossen und der Strom angeschlossen werden. Zunächst wird eine Spannung von 60 V angelegt bis die Proteine durch das Sammelgel gelaufen sind. Ist die Grenze zum Trenngel erreicht, wird die Spannung auf 110 V erhöht. Sobald der Marker beginnt auszulaufen, wird der Gel-Lauf gestoppt.

Der folgende Schritt ist der Blotting-Prozess an sich, was bedeutet, dass die im Gellauf aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Hierfür wird das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wird dann zusammen mit 2 zurechtgeschnittenen Stücken Blotting-Papier und der Blottingmembran in Transferpuffer kurz äquilibriert, bevor der Blot wie in der folgenden Abb. 8 im Trans-Blot Turbo aufgebaut wird:



**Abb. 8: Aufbau des Western-Blots im Trans-Blot Turbo.** Von unten nach oben wird auf die Anode zunächst ein Stück Blotting-Papier, dann die Blottingmembran, anschließend das Trenngel und abschließend erneut ein Stück Blotting-Papier geschichtet, bevor der Trans-Blot Turbo durch die Kathode verschlossen wird.

Für die in dieser Arbeit verwendeten dünnen 0,75 mm Gele wurde eine Spannung von 25 V und eine Stromstärke von 1 A an den Trans-Blot Turbo angelegt. Die Transferzeit betrug 40 min.

Sind die Proteine auf die Blottingmembran übertragen, wird die Membran für 2-3 min in Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Dies führt zu einer unspezifischen Anfärbung der auf die Membran übertragenen Proteinbanden und dient somit als Erfolgs- und Qualitätskontrolle des Blotting-Prozesses. Ist dies erfolgt, kann die Membran wieder mit A. dest und TBS-T (*Tris Buffer Saline* mit 0,1% Tween) entfärbt werden.

Als vorletzter Schritt folgt hierauf die Immunmarkierung der Banden. Zu diesem Zweck wird die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in TBS-T + 5 % BSA bzw. Milchpulver (je nach eingesetztem Primärantikörper) geblockt um ein unspezifisches Binden des Antikörpers an die Membran zu verhindern. Nachdem die Membran geblockt ist, wird diese anschließend mit dem Primärantikörper zur Detektion des gewünschten Proteins inkubiert. Diese Inkubation erfolgt in einer Verdünnung je nach Herstellerangabe über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag kann dann, nachdem der Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt wurde, die 1stündige Inkubation mit dem Sekundärkörper erfolgen. Die Auswahl des Sekundärantikörpers richtet sich nach dem Primärantikörper. Er ist mit HRP konjugiert und richtet sich gegen konstante Abschnitte des Primärantikörpers. Wie der „Detection Antibody“ beim ELISA dient er der Lumineszenz-Markierung der gebundenen Proteine. Hierfür wird die Membran jedoch zunächst nach erneutem dreimaligem Abwaschen in einer luminolhaltigen Entwicklerlösung inkubiert. In Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert die HRP die

Oxidation des Luminols. Die entstehende Lumineszenzreaktion kann unter UV-Licht durch den Western Detektor und das Programm QuantityOne detektiert werden.

#### **3.2.3.4 Propidiumiodid und Hoechst-Färbung**

Mit Hilfe der Propidiumiodid bzw. Hoechst-Färbung lässt sich der Anteil der nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen in einem Versuchsansatz bestimmen. Hierzu werden die zu untersuchenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Färbung der Zellen mit 8 µg/ml Hoechst 33342 (Extinktion/Emission bei Interkalierung in DNA ~350/461 nm) und 0,5 µg/ml Propidiumiodid (Extinktion/Emission bei Bindung an die DNA: ~535/617 nm) für 5 min im Brutschrank. Nach erneutem Waschen mittels PBS werden die Zellen in PBS aufbewahrt, um anschließend unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt zu werden. Pro Versuchsansatz wurden jeweils mindestens 3 repräsentative mikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Im Gegensatz zu Propidiumiodid ist Hoechst 33342 in der Lage, durch eine intakte Zellmembran hindurch zu diffundieren. Somit können Zellen ohne Propidiumiodid-färbung aber mit kondensierten Zellkernen (Blaufärbung) als apoptotische Zellen angesehen werden, während die durch Propidiumiodid rot angefärbten Zellen als nekrotische Zellen anzusehen sind. Es ist zu beachten, dass apoptotische Ereignisse frühestens 3 Stunden nach Beginn der Apoptose morphologisch nachweisbar sind.

#### **3.2.3.5 Immunzytochemische Anfärbung ( $\alpha$ -SMA)**

Zur Immunzytochemischen Anfärbung des Myofibroblasten-spezifischen kontraktiven Proteins  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) wurde das REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse der Firma Dako, Hamburg, Deutschland verwendet. Bei diesem System wird zunächst ein monoklonaler, muriner Primärantikörper genutzt, welcher gegen das Antigen Actin, alpha 2 gerichtet ist. Zusätzlich wird ein Sekundärantikörper verwendet, durch welchen die Enzymbindung und somit die Substratumsetzung und (indirekte) Färbung der Zellen erfolgt. Der biotinylierte Sekundärantikörper reagiert mit den murinen Immunglobulinen. Jedes biotinylierte Antikörper-Molekül kann mit mehreren mit alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidin-Molekülen reagieren, sodass die Zellen anschließend im Lichtmikroskop gut erkennbar sind. Die Durchführung erfolgte jeweils streng gemäß Herstellerprotokoll.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vitalität

Abb. 9 zeigt, dass ein unterdruckbedingter Stimulus von -125 mmHg in den untersuchten Zeitintervallen, also 0 bis 72 h, mit Ausnahme der Jurkat-T-Zelllinie keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der unterschiedlichen Zelltypen (n=4) ausübte.

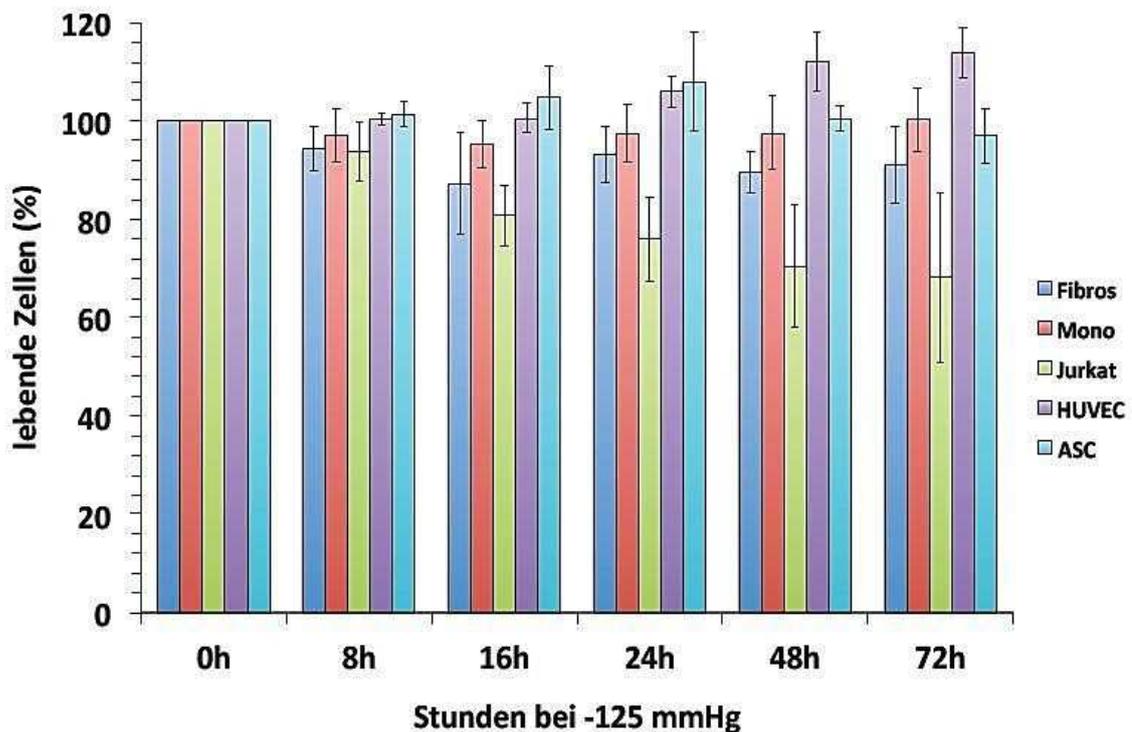
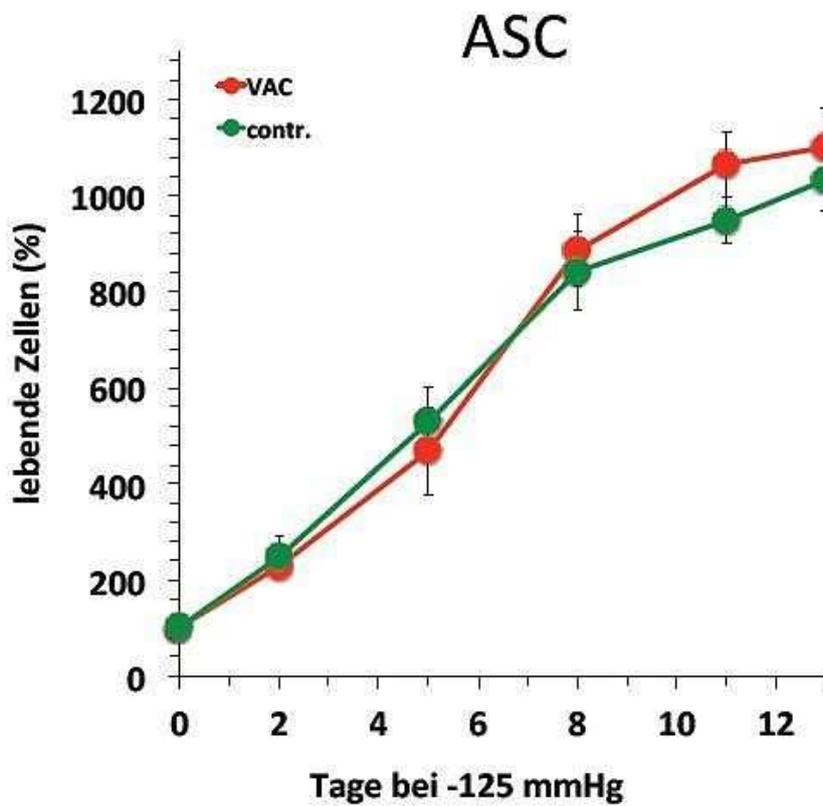
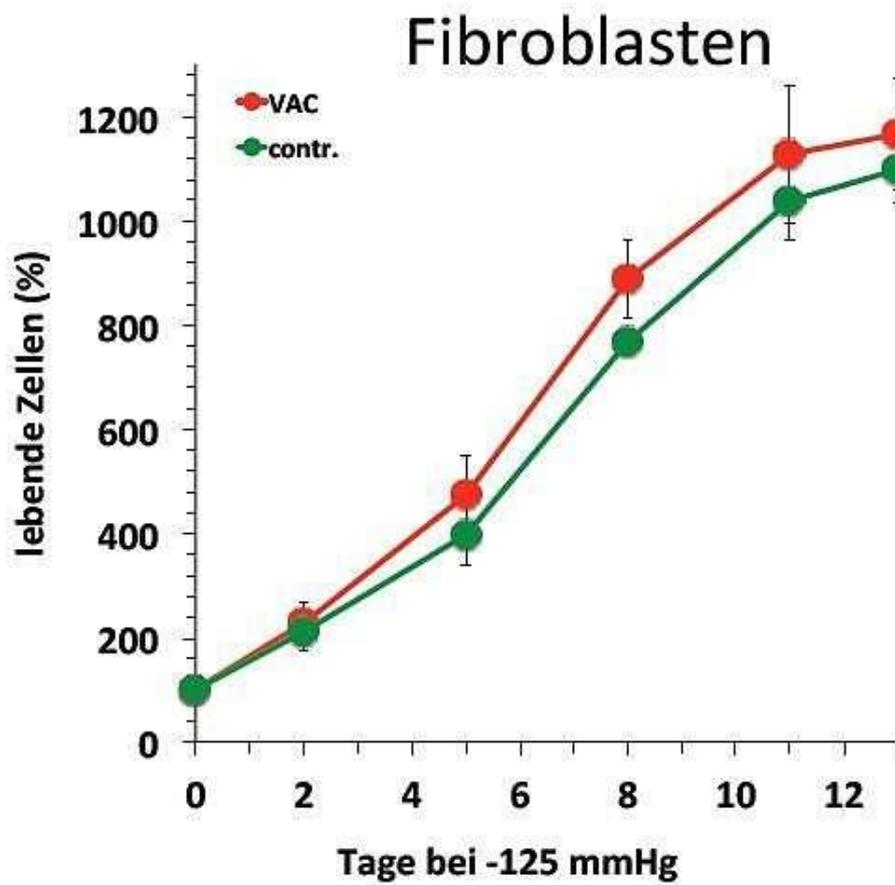
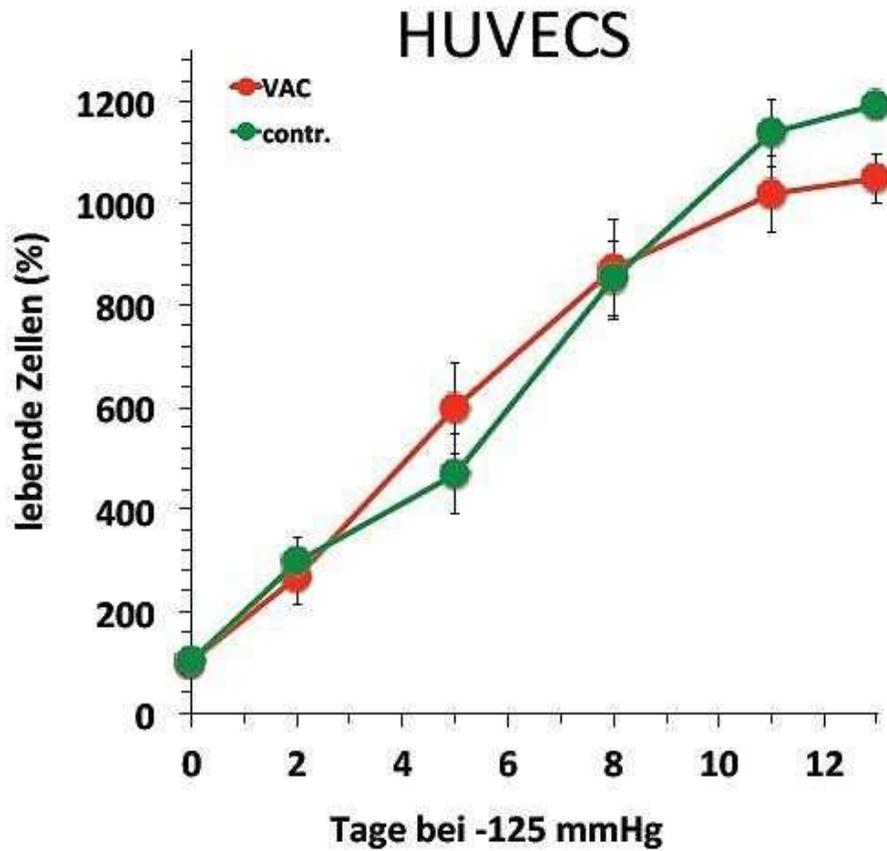


Abb. 9: Prozentualer Anteil vitaler Zellen nach 8 h, 16 h, 24 h, 48 h und 72 h Unterdruckapplikation bei -125 mmHg. Mit Ausnahme der Jurkat-T-Zelllinie ist keine signifikante Reduktion der vitalen Zellen über das jeweilige Zeitintervall nachweisbar (n=4).

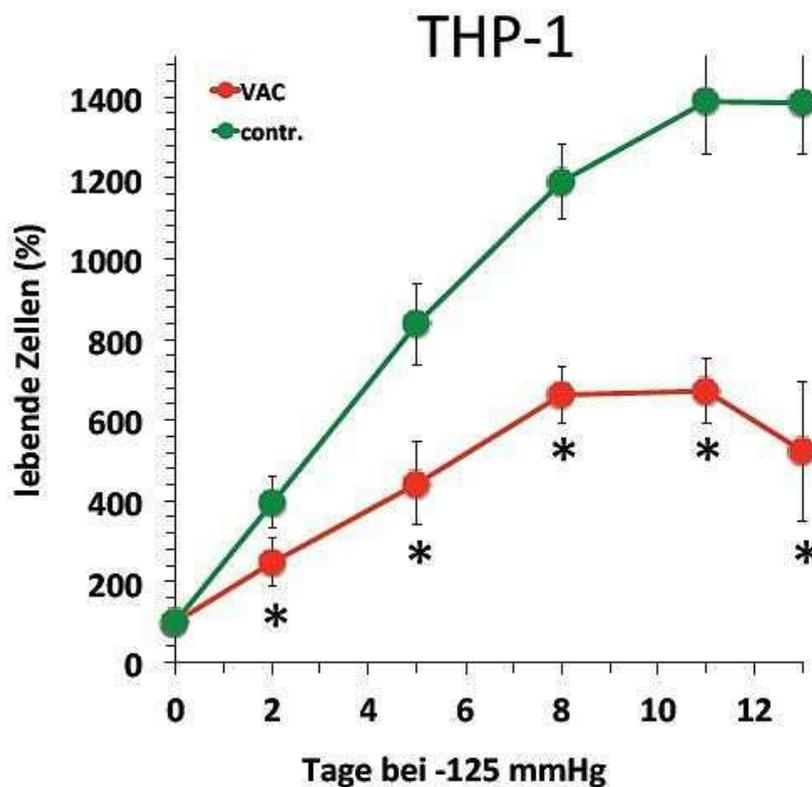
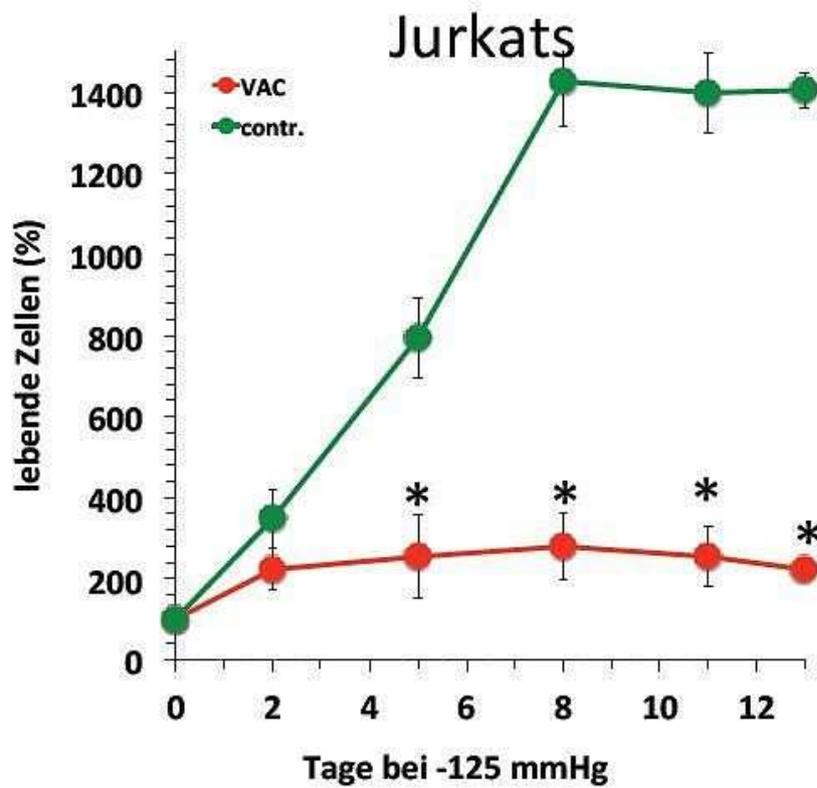
### 4.2 Proliferation

Aus den Abb. 10 und Abb. 11 geht hervor, dass ein unterdruckbedingter Stimulus von -125 mmHg eine unterschiedliche Auswirkung auf die Proliferationsraten von Fibroblasten, adipogenen Stammzellen und HUVECs einerseits und THP-1-Monozyten, sowie Jurkat-T-Lymphozyten andererseits hat. Bereits nach 4 Tagen Unterdruckapplikation über Nacht ist die Proliferationsrate der THP-1-Lymphozyten und Jurkat-T-Zellen, welche dem Unterdruck ausgesetzt waren, signifikant niedriger als die der Kontrollzellen. Ein ähnlicher Effekt ließ sich für die Fibroblasten, adipogenen Stammzellen und HUVECs nicht nachweisen.





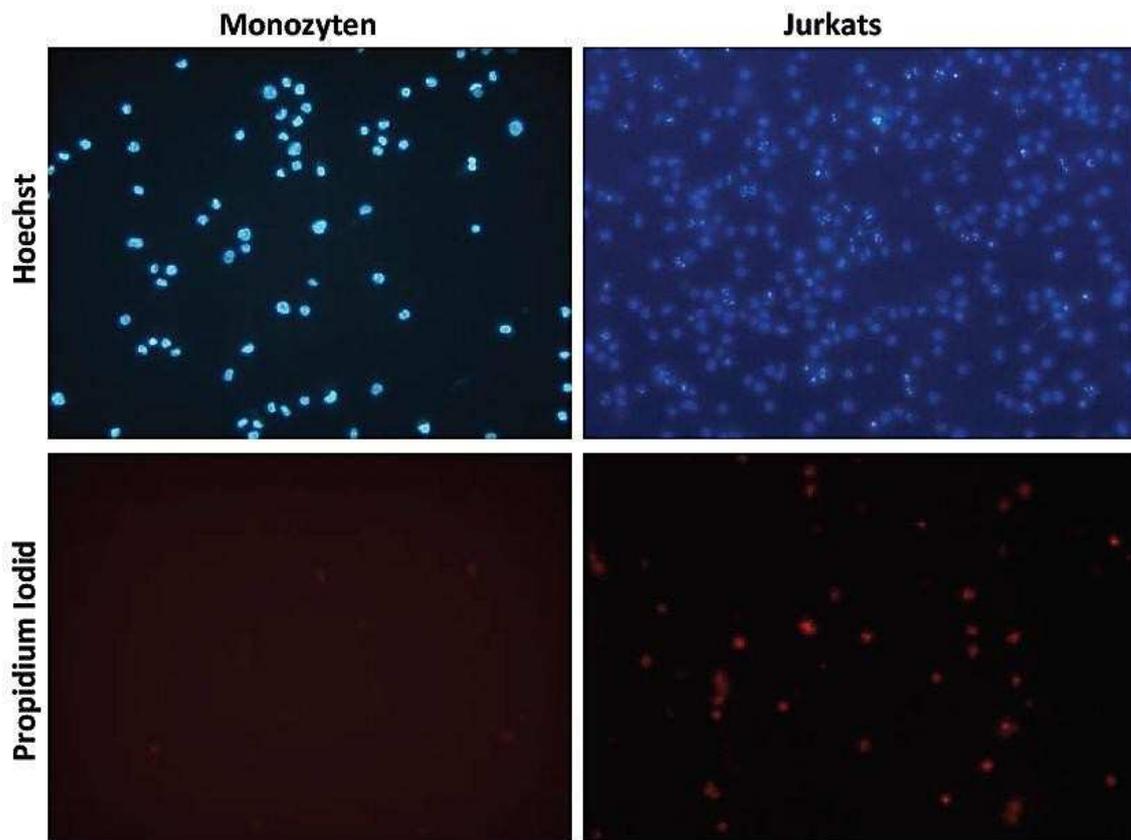
**Abb. 10:** Prozentualer Anteil vitaler Fibroblasten (oben), ASCs (Mitte) und HUVECs (unten) nach 0 bis 12 Tagen Unterdruckapplikation bei -125mmHg jeweils über Nacht. Ein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate der Versuchs- und Kontrollzellen ließ sich nicht nachweisen (n=4)



**Abb. 11: Prozentualer Anteil vitaler THP-1 (oben) und Jurkat-T-Lymphozyten (unten) nach 0 bis 12 Tagen Unterdruckapplikation bei -125mmHg jeweils über Nacht. Sowohl bei den THP-1-Monozyten als auch bei den Jurkat-T-Lymphozyten ist die Proliferationsrate bereits nach 4 Tagen im Unterdruck signifikant niedriger als im Kontrollansatz (n=4).**

In Abb. 12 ist das Ergebnis der weiteren Untersuchung der Jurkat-T- und THP-1-Zellkulturen mittels Propidiumiodid- bzw. Hoechst-Färbung dargestellt. In der Hoechst-Färbung ist im Falle der Jurkat-T-Zellen eine deutliche Fragmentierung der Zellkerne bzw. das Vorhandensein von kondensiertem Chromatin zu erkennen, beides sind Zeichen für Apoptose. Darüber hinaus sind in der Hoechst-Färbung eine Vielzahl der Jurkat-T-Zellen rot angefärbt, was für eine defekte Membranstruktur dieser Zellen und somit für die Nekrose dieser Zellen spricht.

Ähnliche oder analoge zellmorphologische Veränderungen konnten bei der Anfärbung der THP-1-Monozyten nicht beobachtet werden. Hier zeigte sich eine intakte Kernmorphologie in der Hoechst-Färbung, sowie das völlige Fehlen Propidiumiodid positiver (= nekrotischer) Zellen.



**Abb. 12:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Hoechst- (oben) bzw. Propidiumiodid-Färbung (unten) der THP-1-Monozyten (links) und Jurkat-T-Zell-Kulturen (rechts) nach Abschluss der Versuche aus Abb. 11. Die Jurkat-T-Zellen (rechts) zeigen in der Hoechst-Färbung eine deutlich fragmentierte Kernmorphologie, sowie kondensiertes Chromatin in den Zellkernen, beides spricht für die Apoptose dieser Zellen. In der Propidiumiodidfärbung sind darüber hinaus zahlreiche angefärbte Zellen zu erkennen, was für eine defekte Membranstruktur und somit für die Nekrose dieser Zellen spricht. Ähnliche zellmorphologische Veränderungen sind im Falle der THP-1-Monozyten (links) in beiden Färbungen nicht nachweisbar.

### 4.3 Sekretorische Immunantwort

Wie in Abb. 13 dargestellt, hatte eine kontinuierliche Vakuumpplikation von -250 mmHg über 48 h im prozentualen Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen keinen Einfluss auf die Sekretion entzündungsrelevanter Mediatoren durch ruhende (= nicht-zytokinaktivierter) Fibroblasten, THP-1-Monozyten oder adipogene Stammzellen. Im Gegensatz hierzu war bei den durch 500 U/ml IL-1 $\beta$  aktivierten Zellen die provozierte Immunantwort signifikant erniedrigt.

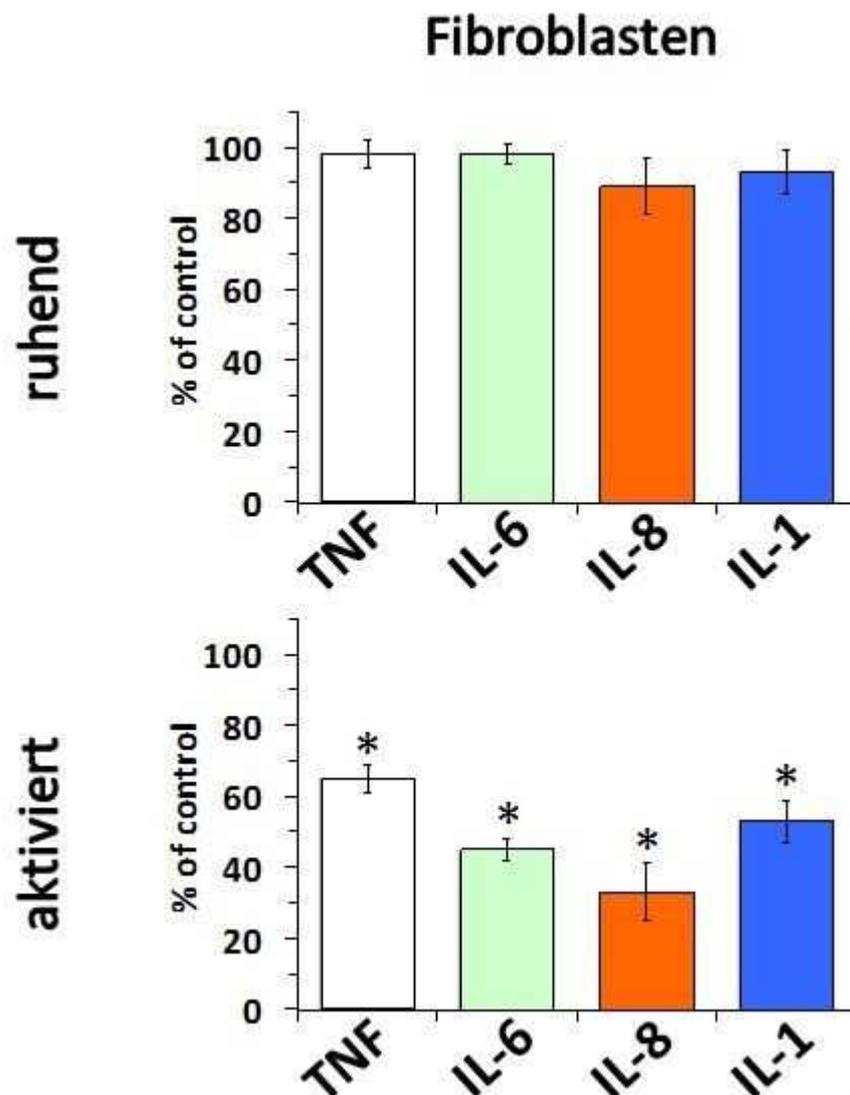
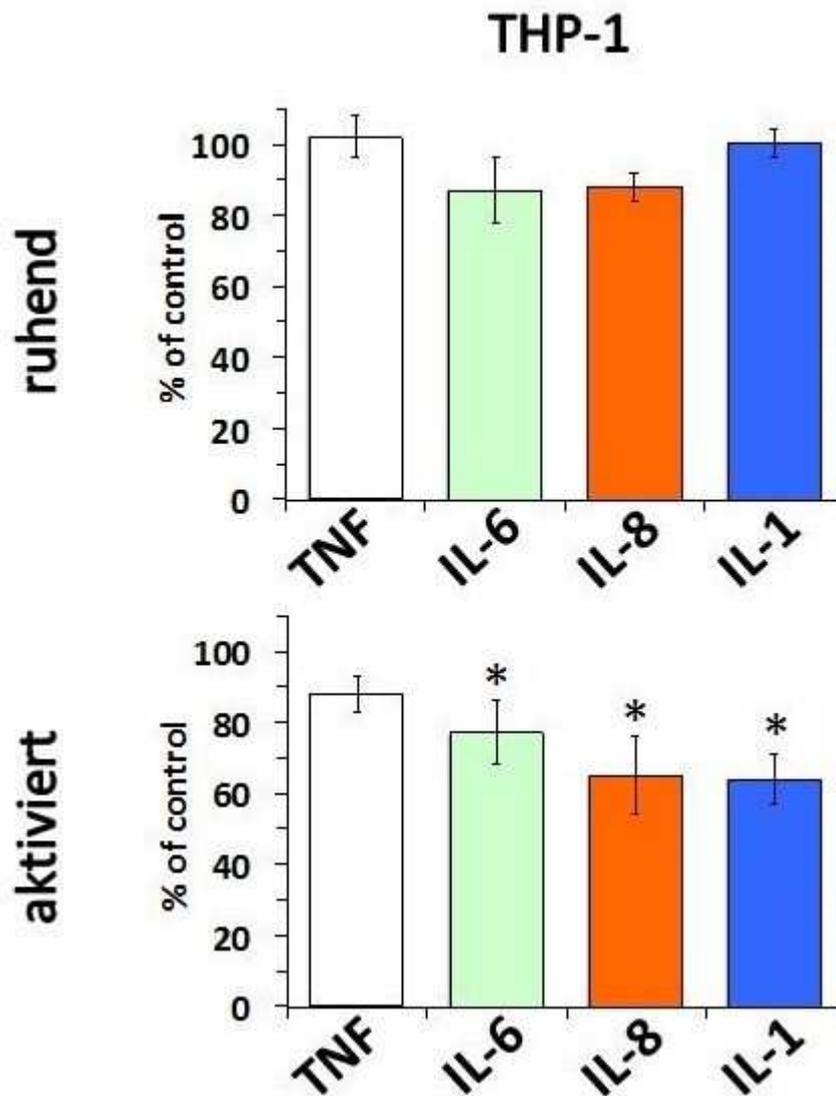
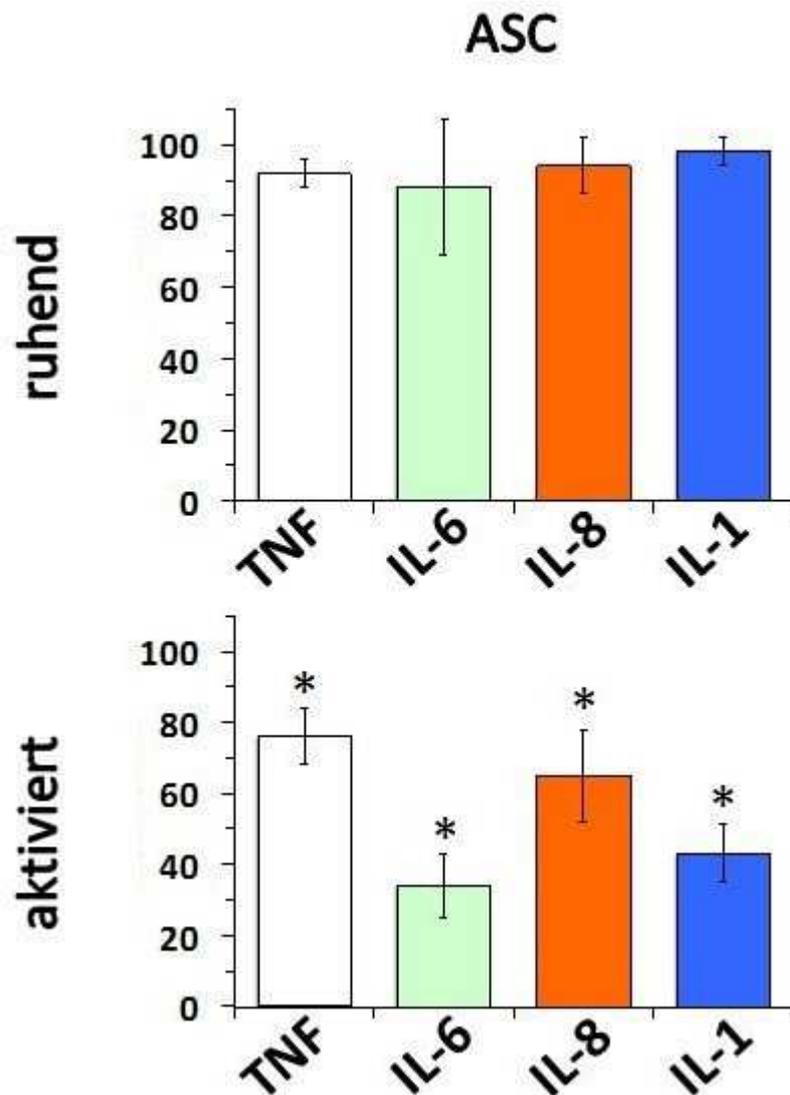


Abb. 13: Sekretorische Immunantwort ruhender (oben) und zytokinaktivierter (unten) Fibroblasten nach 48h Inkubation im Unterdruck bei -250 mmHg im prozentualen Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (nicht vakuumexponierte Zellen). In nicht-zytokinaktivierten (=ruhenden) Zellen zeigt sich kein Einfluss der Vakuumpplikation auf die Sekretion entzündungsrelevanter Mediatoren. Bei zytokinaktivierten Zellen hingegen wird die durch 500 U/ml IL-1 $\beta$  provozierte sekretorische Immunantwort signifikant erniedrigt (n=4).



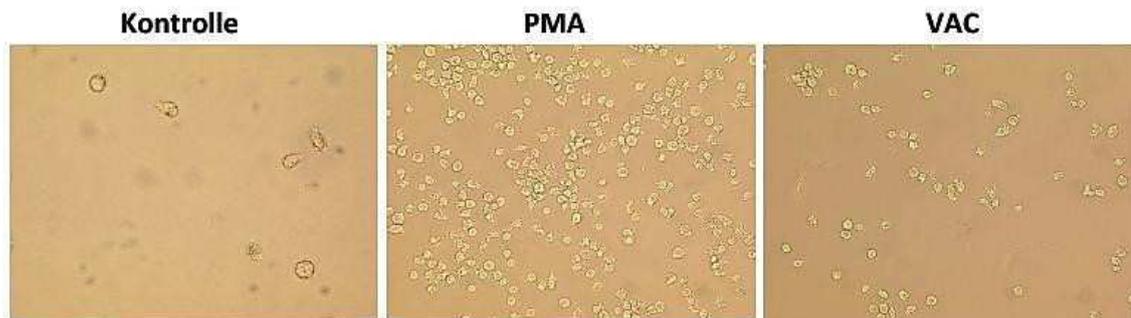
**Abb. 14:** Sekretorische Immunantwort ruhender (oben) und zytokinaktivierter (unten) THP-1-Monozyten nach 48 h Inkubation im Unterdruck bei -250 mmHg im prozentualen Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (nicht vakuumexponierte Zellen). In nicht-zytokinaktivierten (=ruhenden) Zellen zeigt sich kein Einfluss der Vakuumapplikation auf die Sekretion entzündungsrelevanter Mediatoren. Bei zytokinaktivierten Zellen hingegen wird die durch 500 U/ml IL-1 $\beta$  provozierte sekretorische Immunantwort signifikant erniedrigt (n=4).



**Abb. 15:** Sekretorische Immunantwort ruhender (oben) und zytokinaktivierter (unten) ASCs nach 48 h Inkubation im Unterdruck bei -250 mmHg im prozentualen Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (nicht vakuumexponierte Zellen). In nicht-zytokinaktivierten (=ruhenden) Zellen zeigt sich kein Einfluss der Vakuumapplikation auf die Sekretion entzündungsrelevanter Mediatoren. Bei zytokinaktivierten Zellen hingegen wird die durch 500 U/ml IL-1 $\beta$  provozierte sekretorische Immunantwort signifikant erniedrigt (n=4).

#### 4.4 Differenzierung

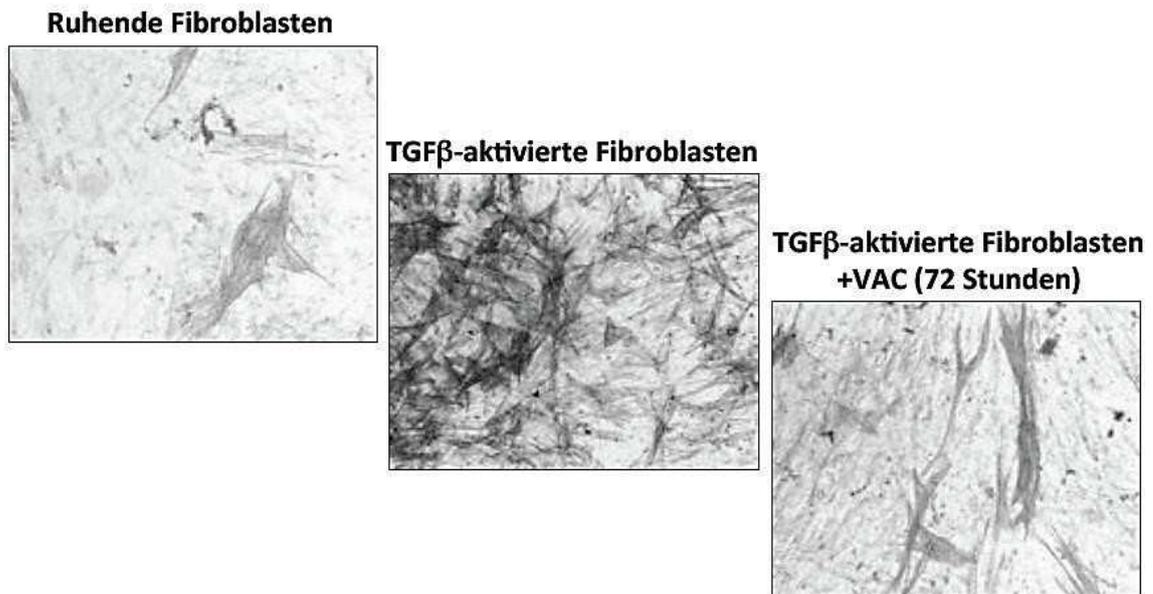
Im Bereich der Monozyten konnte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl adhärenter, also von Monozyten in Makrophagen differenzierter, Zellen zwischen den mittels 5 ng/ml PMA zur Differenzierung angeregten Zellen im Vakuum im Vergleich zu denen unter Kontrollbedingungen weder nach 24 h noch nach 48 h gezeigt werden. Was jedoch, wie in Abb. 16 zu sehen ist, gezeigt werden konnte, ist, dass die Anzahl der spontan, also ohne Stimulation mittels PMA, in Makrophagen differenzierten Monozyten bereits nach 24 h bei -250 mmHg Unterdruck höher ist, als in der Kontrolle.



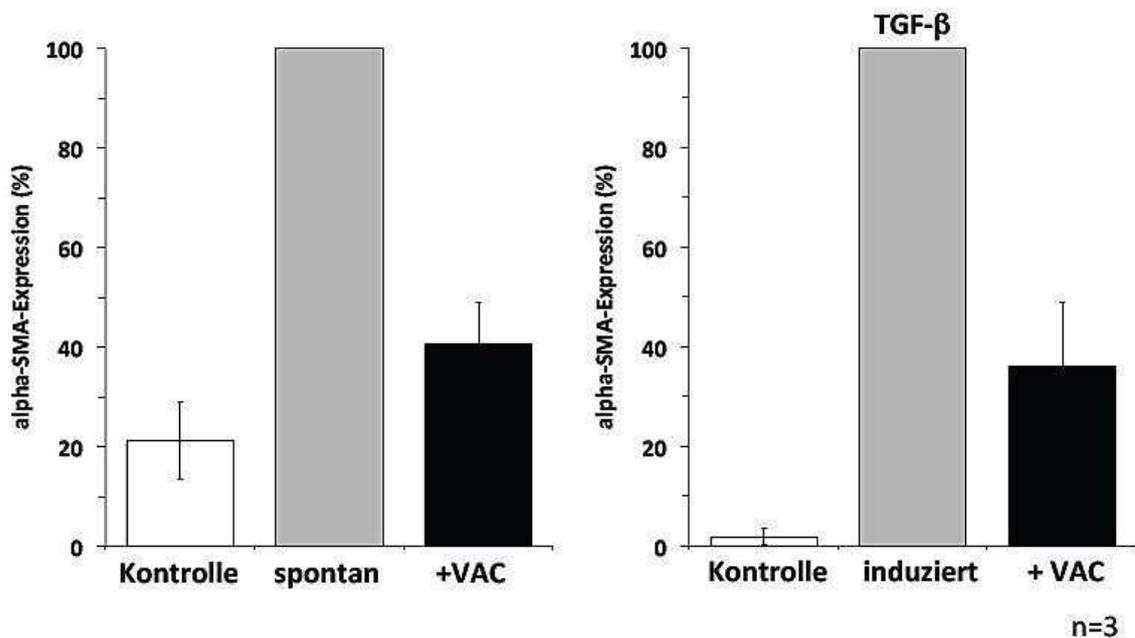
**Abb. 16: Adhäsionsassay. Unbehandelte Kontrollplatte (links), mit 5 ng/ml PMA stimulierte Kontrollplatte (mitte) und unbehandelte Versuchsplatte nach 24 h Vakuumexposition bei -250 mmHg, jeweils nach Waschen der Platten mit PBS. In der Kontrollplatte (links) kommt es kaum zur spontanen Differenzierung der Monozyten in Makrophagen. In der durch 5ng/ml PMA stimulierten Kontrolle ist diese jedoch sehr ausgeprägt. Im Falle der unstimulierten, aber dem Vakuum ausgesetzten Platte (rechts) ist es vermehrt zur spontanen Differenzierung der Monozyten in Makrophagen gekommen.**

In Bezug auf die untersuchten Fibroblasten ist in Abb. 17 zu erkennen, dass eine geringe Anzahl dieser Zellen bereits im ruhenden Zustand die Tendenz hat, zu Myofibroblasten zu differenzieren. Eine spezifische Aktivierung der Fibroblasten mittels TGF $\beta$  führt zu einer signifikant erhöhten Differenzierungsrate. Folgt auf die Aktivierung jedoch eine 72-stündige Unterdruckapplikation, fällt die Erhöhung der Differenzierungsrate niedriger aus, als in der TGF $\beta$ -aktivierten Kontrolle.

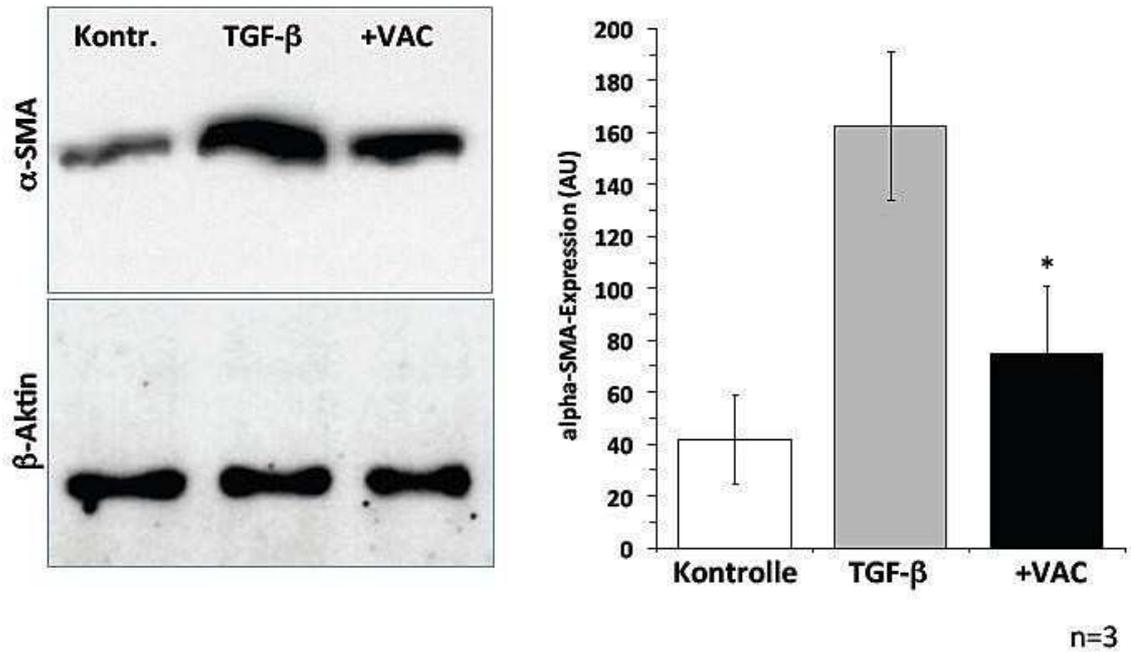
Abb. 18 zeigt semi-quantitativ nach densitometrischem Vergleich der in Abb. 17 dargestellten Ergebnisse, dass dies sowohl auf die spontane Differenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten, als auch auf die induzierte Differenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten mittels TGF $\beta$  zutrifft. Die in Abb. 19 dargestellte weitere Verifizierung dieser Ergebnisse mittels Western Blot und anschließendem densitometrischem Vergleich bestätigt diese Ergebnisse nochmals.



**Abb. 17: Immunzytochemische Darstellung des Myofibroblasten spezifischen  $\alpha$ SMA.** Bereits in ruhenden Fibroblasten (links) besteht eine schwache spontane Differenzierungstendenz zu Myofibroblasten. Nach spezifischer Aktivierung der Zellen durch TGF $\beta$  ist eine signifikant erhöhte Anzahl an Myofibroblasten zu sehen (Mitte). Folgt auf die Aktivierung eine 72-stündige Unterdruckapplikation von -250 mmHg fällt die Differenzierungsrate niedriger aus.



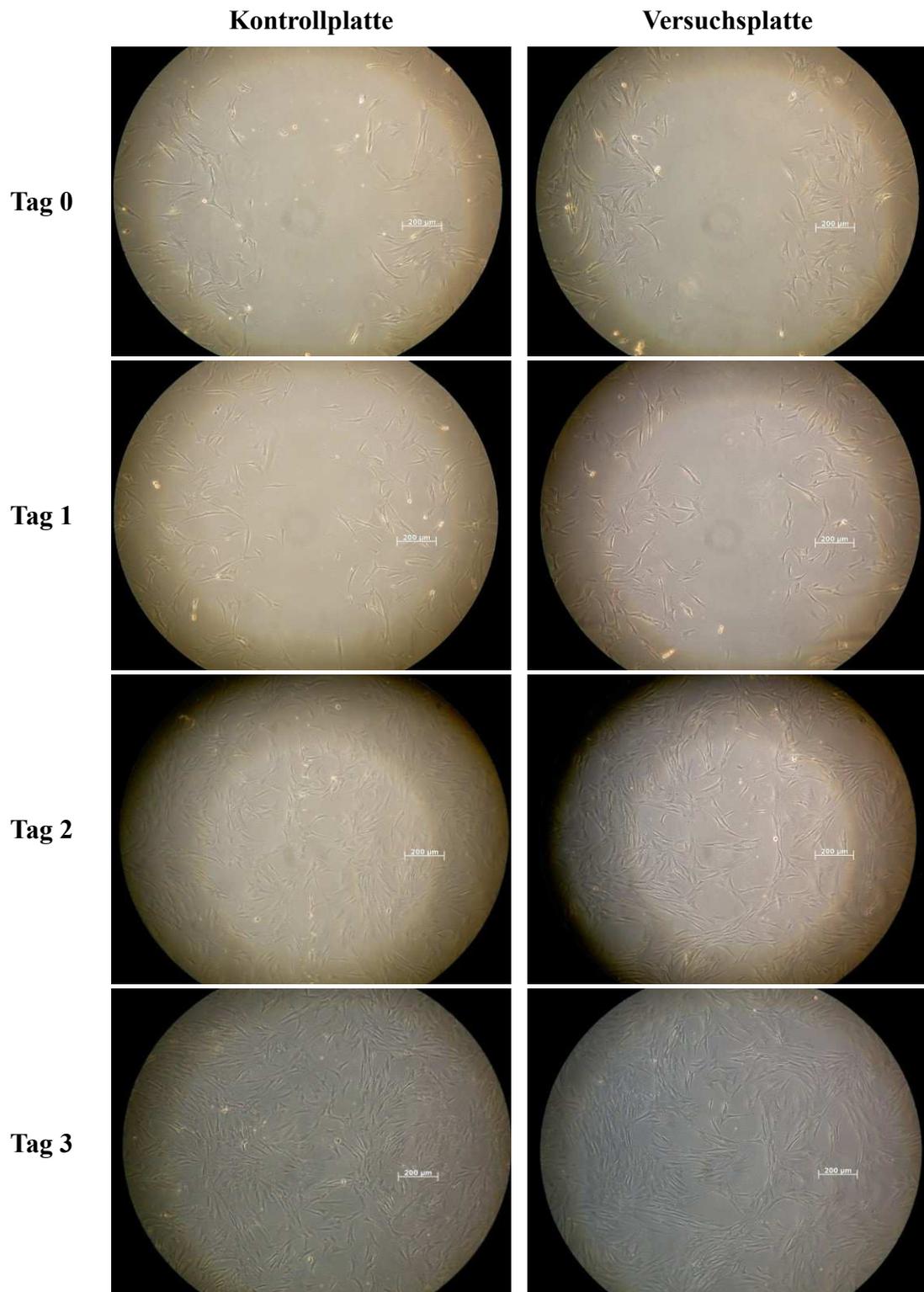
**Abb. 18: Densiometrische Quantifizierung der grau-schwarzen  $\alpha$ -SMA-Signale aus Abb. 17.** Sowohl die spontane (links), als auch die induzierte (rechts) Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten fällt nach einer 72-stündigen Unterdruckapplikation von -250 mmHg signifikant niedriger aus als in der unter Standardbedingungen inkubierten Kontrolle.



**Abb. 19:** Nachweis der  $\alpha$ -SMA-Expression 72 h nach spezifischer Aktivierung der Fibroblasten mittels TGF $\beta$  mit und ohne Unterdruckapplikation (links), sowie densitometrische Quantifizierung des Ergebnisses (rechts). Die  $\alpha$ -SMA-Expression nach Aktivierung, gefolgt von Unterdruckapplikation (schwarzer Balken) fällt signifikant niedriger aus als in den TGF $\beta$  aktivierten Zellen, welche keinem Unterdruck ausgesetzt wurden (grauer Balken). Als Kontrolle dienten ruhende Fibroblasten (weißer Balken).

#### 4.5 Migration

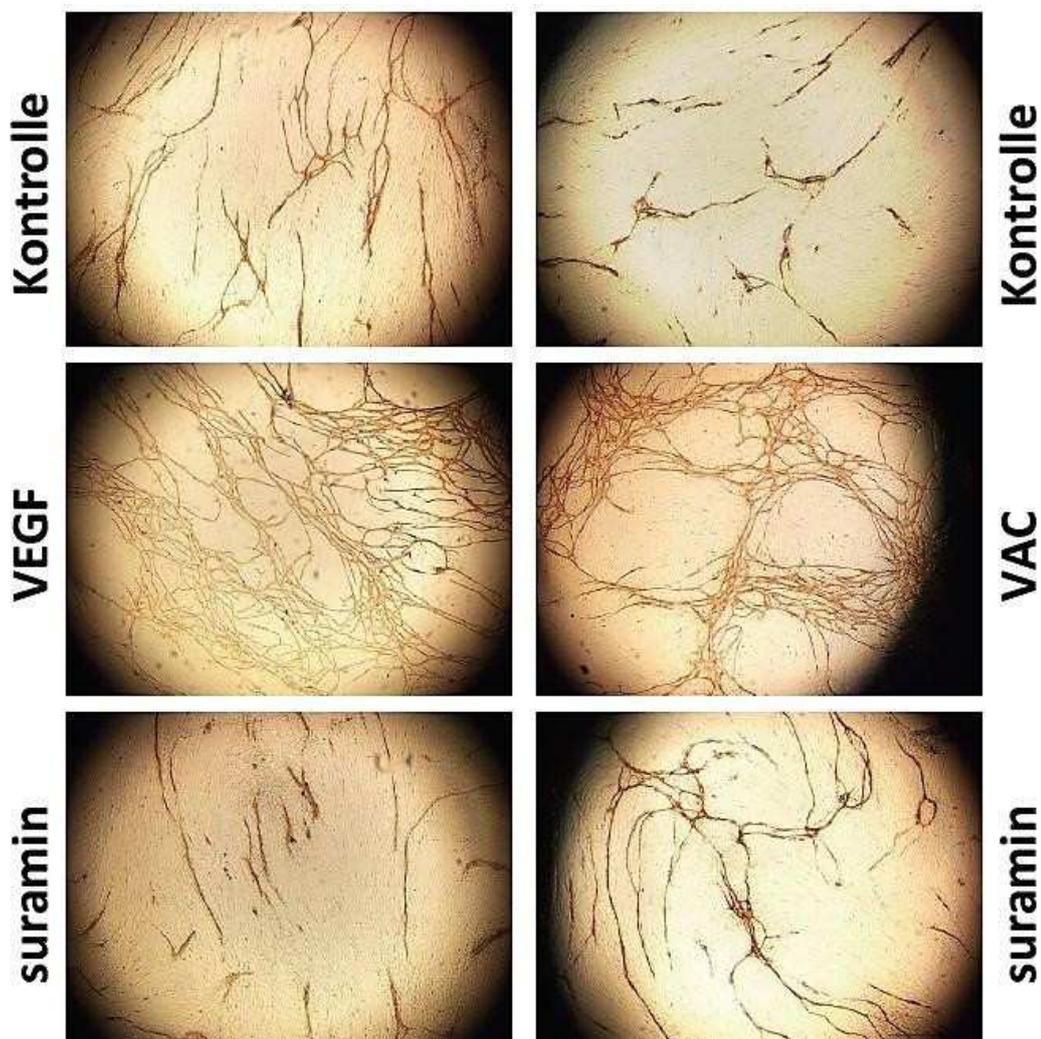
Wie in Tabelle 9 zu erkennen ist, kann bereits 2 Tage nachdem die zellfreie Schneise durch die Fibroblasten gezogen wurde, diese lichtmikroskopisch nicht mehr sicher dargestellt werden und der Zell-Zell-Kontakt zwischen den Fibroblasten auf beiden Seiten der Schneise ist wiederhergestellt. Einen Unterschied zwischen den Kontrollplatten (links) und den Versuchsplatten (rechts) konnten wir hierbei nicht zeigen.



**Tabelle 9: Migrationsassay. Links Kontrollplatte, rechts Versuchsplatte.** Bereits am zweiten Tag nach Ziehen der Schneise ist lichtmikroskopisch eine sichere Abgrenzung dieser weder bei der Versuchsplatte noch bei Kontrollplatte möglich. Ein signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollplatte lässt sich nicht feststellen.

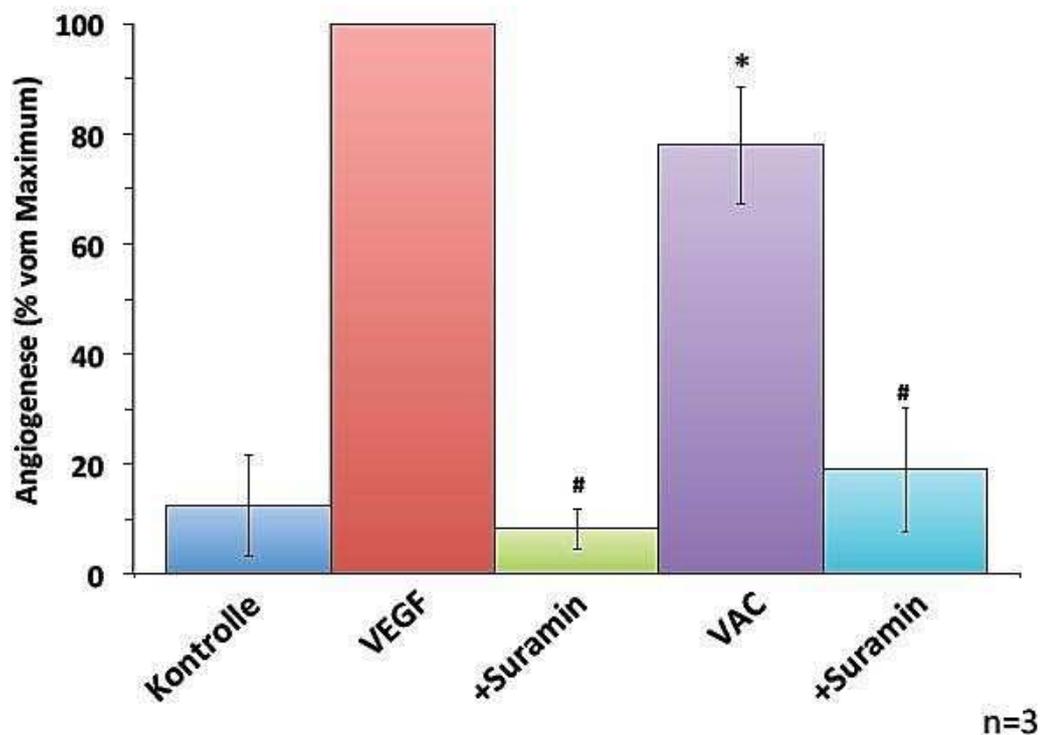
## 4.6 Angiogenese

Abb. 20 zeigt, dass nach immunzytochemischer Anfärbung durch endothelspezifische Antikörper (anti-CD34 oder anti-von Willebrandt) kapillaranaloge Strukturen bereits in der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden konnten. Sowohl durch die Induktion der Angiogenese mittels VEGF, als auch durch die Inkubation der Zellen im Unterdruck konnten wir eine Verstärkung dieses Effektes erzielen. Um zu beweisen, dass dieser Effekt der Unterdruckbehandlung VEGF-vermittelt stattfindet, haben wir den Versuch ein weiteres Mal durchgeführt, diesmal jedoch den VEGF-Rezeptor-Inhibitor Suramin hinzugegeben. In diesem Fall blieb die zuvor durch die Unterdruckbehandlung erzielte Kapillarneubildung aus.

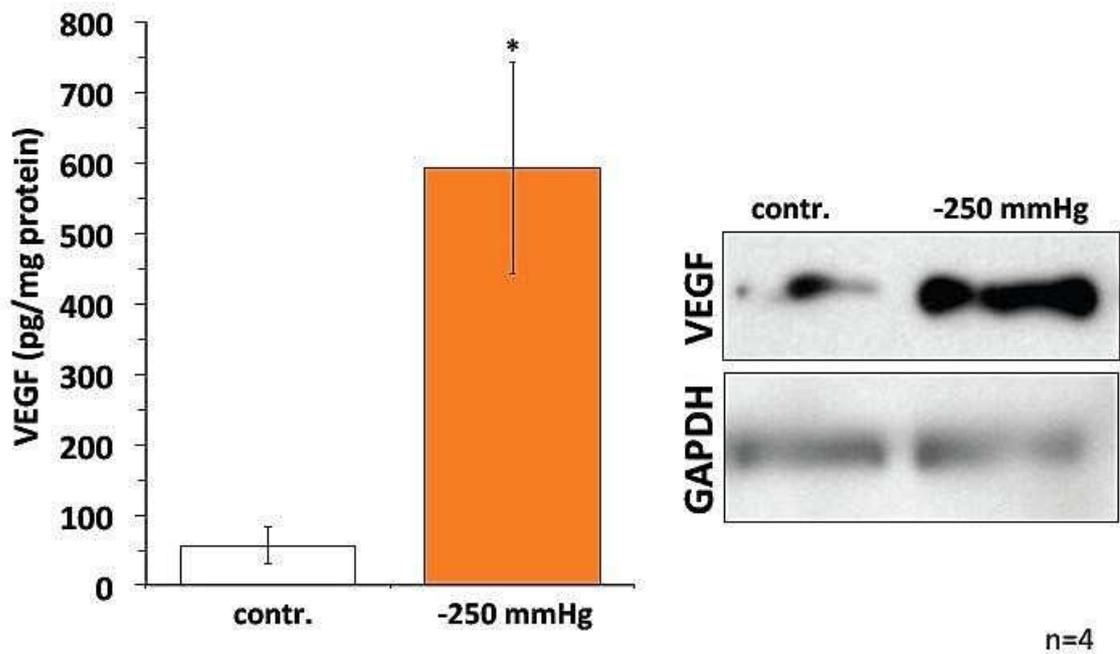


**Abb. 20: Angiogenese-Assay. Kapillaranaloge Gefäßstrukturen sind immunzytochemisch mit Hilfe von endothelspezifischen Antikörpern (anti-von-Willebrand oder anti-CD34) angefärbt.** Bereits in der unbehandelten Kontrolle (oben) bilden sich spontan Kapillarähnliche Strukturen. Nach Inkubation der Zellen mit einem spezifischen Induktor der Angiogenese (VEGF), sowie nach Inkubation der Zellen im Unterdruck kann eine starke Zunahme der Kapillarbildung gezeigt werden (Mitte). Zum Nachweis, dass dieser Effekt VEGF-vermittelt ist, wurde in einem weiteren Versuch Suramin, ein VEGF-Rezeptor-Inhibitor, hinzugegeben (unten). In diesem Fall bleibt sowohl bei den mittels VEGF induzierten, als auch bei den im Unterdruck inkubierten Zellen eine Kapillarneubildung aus.

Zur Quantifizierung dieser Ergebnisse führten wir anschließend eine densitometrische Auswertung der in Abb. 20 dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen durch. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Abb. 21 dargestellt. Auch hierbei konnte gezeigt werden, dass die Vakuumbehandlung der Zellen einen ähnlich starken, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöhten, Reiz zur Neoangiogenese darstellt wie die Induktion selbiger durch die Zugabe von VEGF. Nach Zugabe von Suramin blieb sowohl bei den mit VEGF stimulierten Zellen, als auch bei den im Unterdruck inkubierten Zellen eine signifikant erhöhte Ausbildung neuer kapillarähnlicher Strukturen aus.



**Abb. 21: Densitometrische Auswertung der in Abb. 20 dargestellten Ergebnisse.** Die Vakuumbehandlung der Zellen (lila Balken) erzeugt einen ähnlich starken Reiz zur Neoangiogenese wie die Induktion der Neoangiogenese durch Hinzugabe von VEGF (roter Balken). Dass dieser Effekt jeweils VEGF-spezifisch vermittelt wird, konnten wir durch die Zugabe von Suramin, einem VEGF-Rezeptor-Inhibitor, zeigen. In diesem Fall bleibt die Neubildung kapillarähnlicher Strukturen aus (grüner bzw. hellblauer Balken).



**Abb. 22: Nachweis von VEGF in den im Unterdruck inkubierten Zellen mittels ELISA (links), sowie Western Blot (rechts).** Um die Hypothese zu stützen, dass der durch die Vakuumbehandlung induzierte Neoangiogenetische-Effekt VEGF vermittelt ist, haben wir mit den Versuchszellen einen VEGF-spezifischen ELISA (links), sowie einen VEGF-spezifischen Western Blot (rechts) durchgeführt. In beiden Fällen konnte eine deutliche Induktion der endothelialen VEGF-Synthese gezeigt werden.

Da bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Versuche die Frage aufkam, ob der gezeigte neoangiogenetische Effekt der Vakuumbehandlung VEGF vermittelt stattfindet, haben wir zusätzlich zur soweit durchgeführten Auswertung mit den im Unterdruck inkubierten Versuchszellen einen VEGF-spezifischen ELISA, sowie einen Western Blot durchgeführt. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen sind in Abb. 22 dargestellt. In beiden Fällen konnten wir eine signifikante Erhöhung der endothelialen VEGF-Synthese im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigen.

## 5 Diskussion

Die Vakuumtherapie von akuten und chronischen Wunden hat in den vergangenen zwei Jahrzehnten einen weitreichenden Einzug in den klinischen Alltag der Chirurgie und anderer medizinischer Fachrichtungen gehalten. Die kontinuierliche Drainage des Wundsekrets und der Keimbeseidlung, die Verminderung des Gewebeödems und eine verbesserte Perfusion des Gewebes sind nur einige der in der Literatur angeführten Wirkungsmechanismen (18). Darüber hinaus wird unter anderem von einer mechanischen Stimulation der Zellproliferation und Gewebeataption, sowie der Reduktion von Wachstumsinhibitoren im Wundgebiet bzw. einer Modulation der Zytokinexpression im Wundgebiet ausgegangen (9).

In dieser Arbeit konnten wir im *in vitro* Modell zeigen, dass die Unterdrucktherapie in der Lage ist, die lokale Gewebeperfusion durch Anregung der Neoangiogenese zu steigern. Einen Einfluss auf die Zellproliferation verschiedener Zelltypen konnten wir hingegen nicht nachweisen. Die postulierte Modulation der Zytokinexpression konnten wir in unserem Modell für zytokinaktivierte Fibroblasten, Monozyten und adipogene Stammzellen zeigen. Auf ruhende Zellen dieser Zelllinien scheint sie jedoch keinen Einfluss zu haben. Das Migrationsverhalten von Fibroblasten scheint ebenfalls nicht beeinflusst zu werden und die für die Wundadaption bedeutende Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten während der Wundheilung scheint eher gehemmt als stimuliert zu werden. Die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen scheint dagegen aber durchaus positiv beeinflusst zu werden.

### 5.1 Vitalität

Als Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben wir zunächst gezeigt, dass die Applikation eines Unterdrucks von -125 mmHg in dem von uns genutzten Versuchsaufbau an sich keine toxische Wirkung hat. Als Ausnahme sind die Versuchsergebnisse für die Jurkat-T-Zelllinie anzuführen. In den weiterführenden Experimenten zum Proliferationsverhalten der einzelnen Zelllinien haben wir gezeigt, dass ein signifikanter Anteil der Jurkat-T-Zellen nach 4 Tagen im Unterdruck bereits in Apoptose geht. Ähnliche Ergebnisse sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der verringerte Sauerstoffpartialdruck den Stoffwechsel der Jurkat-T-Zellen soweit drosselt, dass diese in Apoptose gehen. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ist die Zahl der bisher durchgeführten Studien zu diesem Thema

allerdings sehr gering. Die einzige vorliegende Studie aus dieser Kategorie durch Dzieciuchowicz et al (43) beschäftigt sich lediglich mit der systemischen Immunantwort nach Vakuumbehandlung von Wundinfekten bei Patienten mit diabetischem Fußsyndrom. Hier konnte keine Auswirkung auf die lymphozytäre Population gezeigt werden. Somit sollte es Inhalt von Folgearbeiten sein, die Auswirkungen der VAC-Therapie auf lymphozytäre Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* näher zu beleuchten.

## 5.2 Proliferation

Das Proliferationsverhalten von Fibroblasten, adipogenen Stammzellen und HUVECs wurde durch die hypobare Drucktherapie in unserem Versuchsaufbau nicht beeinflusst. In Bezug auf die Fibroblasten steht dies in Widerspruch zu den bisher in der Literatur geschilderten Ergebnissen (44) und wird in Kapitel 5.4 weiter diskutiert.

Auch das Ergebnis unserer Untersuchungen an adipogenen Stammzellen steht im Kontrast zu bisher in der Literatur beschriebenen *in vitro* Experimenten. Zhu et al. (45) etablierten ebenfalls ein Modell, in dem die Zellen, allerdings in einer komplexeren Fibrin-Matrix, einem kontinuierlichen Unterdruck von -125 mmHg ausgesetzt wurden. In diesen Versuchen konnten sie bereits nach 72 h eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate der mesenchymalen Stammzellen im Unterdruck im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisen, wohingegen in unseren Versuchen auch nach 12 Tagen Unterdruckbehandlung kein Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchszellen nachzuweisen war. Möglicherweise ist diese Diskrepanz darauf zurückzuführen, dass in den Experimenten von Zhu et al. porcine, dem Periost der Versuchstiere entstammende mesenchymale Stammzellen genutzt wurden um den Schwerpunkt der Untersuchungen auf einen möglichen Einfluss der Unterdrucktherapie auf die Knochenheilung zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit haben wir hingegen humane Zellen aus Liposuktionsmaterial genutzt. Ein interessantes Feld für Folgearbeiten wäre somit zu untersuchen, in wie weit das Ursprungsgewebe mesenchymaler Stammzellen einen Einfluss auf deren Reaktion auf hypobare Drucktherapie hat.

Während die Literatur sich gemeinhin einig ist, dass die V.A.C.<sup>®</sup>-Therapie einen stimulierenden Effekt auf die Neoangiogenese im Wundgebiet hat (36,46), beschränken sich die diesbezüglichen Untersuchungen in der Regel jedoch auf für die für die Angiogenese relevanten Zytokine (wie z. B. VEGF) im Wundgebiet oder

Versuchsansatz. Das Verhalten isolierter endothelialer Zellen, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, wurde in diesem Zusammenhang bisher nicht untersucht. Betrachtet man jedoch weiterhin, dass in der Literatur der proliferationsfördernde Effekt der Unterdrucktherapie im Wesentlichen auf die verwendete Wundauflage zurückzuführen ist (47,48), erscheint es wenig verwunderlich, dass wir in unseren Versuchen keinen Effekt der Unterdrucktherapie auf das Proliferationsverhalten von endothelialen Zellen, in Form von HUVECs, nachweisen konnten. In weiteren Folgearbeiten sollte somit der genutzte Versuchsaufbau insoweit optimiert werden, dass verschiedene Wundauflagen eingebracht werden können. Dies würde es ermöglichen, aussagekräftigere und besser vergleichbare Daten im Bereich des Proliferationsverhaltens aller untersuchten Zelllinien zu generieren.

Auf die Jurkat-T-Zellen hatte die Unterdruckbehandlung in unseren Versuchen allerdings einen negativen Einfluss. Wie bereits in Kapitel 5.1 beschrieben, konnten wir in den Vitalitätsversuchen bereits zeigen, dass ein signifikanter Anteil der Jurkat-T-Zellen bereits nach 4 Tagen im Unterdruck in die Apoptose geht. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die verringerte Proliferationsrate der Jurkat-T-Zellen darauf zurückzuführen ist, dass die Zellen bereits durch die Unterdruckbehandlung in Apoptose gehen. *In vitro* Voruntersuchungen hierzu finden sich in der Literatur bisher allerdings nicht.

Die Abnahme der Proliferationsrate im Falle der THP-1-Zellen haben wir jedoch auf einen anderen Effekt der Unterdruckbehandlung zurückgeführt: Wie in den Versuchen zur Differenzierung (vgl. Kapitel 5.4 und Abb. 16) gezeigt wurde, führte die Unterdruckbehandlung der THP-1-Zellen zu einer gesteigerten spontanen Differenzierungsrate der Monozyten in Makrophagen. Makrophagen wachsen im Gegensatz zu Monozyten adhärent und verlieren nach ihrer Differenzierung in Makrophagen die Fähigkeit zur weiteren Proliferation. Die Tatsache, dass mit der Propidiumiodidfärbung (Vgl. Abb. 12) keine nekrotischen Zellen dargestellt werden konnten und die Zellkerne in der Hoechst-Färbung intakt waren, spricht dafür, dass im Proliferationsversuch nicht das Proliferationsverhalten der THP-1-Monozyten, sondern das der differenzierten Makrophagen untersucht wurde. Somit tritt, wie es in Abb. 11 zu sehen ist, nach der Unterdruckbehandlung ein Proliferationsstopp ein, da die Monozyten zu Makrophagen differenziert sind und somit ihre Proliferationsfähigkeit verloren haben. Somit lässt sich sagen, dass die VAC<sup>®</sup>-Behandlung das Wachstum von Monozyten durch die Induktion ihrer Differenzierung in Makrophagen zu stoppen

vermag. Gabriel (49) sieht hierin einen für die Wundheilung förderlichen Aspekt, da eine zu starke Immigration von Makrophagen, Monozyten und Leukozyten in das Wundgebiet die Wundheilung durch eine überschießende inflammatorische Reaktion zu behindern vermag.

### **5.3 Sekretorische Immunantwort**

In den 3 von uns im Rahmen der Experimente zur sekretorischen Immunantwort untersuchten Zelllinien konnten wir keinen signifikanten Einfluss auf die Il-1, Il-6, Il-8 und TNF $\alpha$  Konzentration im Versuchsansatz nachweisen, solange die jeweiligen Zellen nicht durch Zugabe von 500U Il-1 $\beta$  aktiviert wurden. Nach Aktivierung war die provozierte Immunantwort in Bezug auf alle untersuchten Zytokine (mit Ausnahme von TNF $\alpha$  im THP-1-Monozyten Versuchsansatz) im Vergleich zur Kontrolle jedoch signifikant erniedrigt. In der Literatur liegen hierzu unterschiedlichste *in vivo* Vorarbeiten vor, welche zum Teil mit den von uns ermittelten Ergebnissen übereinstimmen, diesen aber auch zum Teil entgegenstehen. So beschreiben Glass und Nanchahal (9) beispielsweise in einer Metaanalyse verschiedener Studien, dass die lokale TNF $\alpha$ -Konzentration im Wundmilieu zwischen dem ersten und siebten Tag der Unterdruckbehandlung erniedrigt ist, während die Il-1 $\beta$ -Konzentration konstant bleibt. Des Weiteren scheinen die systemischen Il-6- und TNF $\alpha$ -Konzentration durch die Unterdruckbehandlung erniedrigt zu werden, während die systemische Il-1 $\beta$ -Konzentration sich nicht verändert. Liu et al. (50) hingegen zeigten im Tiermodell, dass die Il-1 $\beta$ -Genexpression im Wundgebiet nach 2-4 Tagen Unterdruckbehandlung signifikant erhöht ist. Nach 6 Tagen war kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mehr nachweisbar. Für Il-8 konnte am zweiten Tag eine signifikant verstärkte Genexpression gezeigt werden, nach 6 und 8 Tagen lag diese jedoch unterhalb der Kontrollgruppe. TNF $\alpha$  war bei Liu et al. vom zweiten bis zum achten Tag der Untersuchungen kontinuierlich signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrolle. Eine Datenlage für isolierte *in vitro* Betrachtungen einzelner Zelllinien, wie wir sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt haben, liegt jedoch bisher nicht vor. Somit sollten weitere Folgearbeiten zum Inhalt haben, worin die Begründung für die Diskrepanz zwischen den *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen zu sehen ist. Es stellt sich allerdings auch die Frage, ob *in vitro*-Untersuchungen generell geeignet sind, um die Wirkungsweise der VAC<sup>®</sup>-Therapie weiter zu beleuchten, da die isolierte Betrachtung einzelner

Aspekte dieses komplexen Wirkmechanismus nicht zwangsläufig die Vorgänge in der „realen“ Wundsituation widerspiegelt.

#### **5.4 Differenzierung**

In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen haben wir gezeigt, dass die hypobare Drucktherapie im *in vitro* Modell in der Lage ist, die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen zu fördern und die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten zu hemmen. Vor allem das zuletzt genannte Ergebnis ist allerdings ambivalent zu betrachten. Die Literatur ist sich gemeinhin einig und konnte auch zeigen, dass die durch die Vakuumtherapie verursachten Mikrodeformationen von Fibroblasten zu einer TGF $\beta$ -vermittelten Proliferations- und Differenzierungssteigerung führen (44). Eine mögliche Erklärung für die Differenz zwischen diesen Ergebnissen und unseren könnte sein, dass in dem von uns genutzten Versuchsaufbau ein Teil des Versuchsmediums, und somit ein Teil des zur Differenzierungsinduktion hinzugegebenen TGF $\beta$ , durch die Vakuumpumpe abgesaugt wurde und somit die Konzentration an TGF $\beta$  in den vakuum-behandelten Versuchsansätzen geringer war. Insofern sollte in Folgearbeiten untersucht werden, ob die Vakuumtherapie in unserem Versuchsaufbau selbst in der Lage ist die lokale TGF $\beta$ -Konzentration und somit die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten zu steigern, ohne dass diese vorher durch TGF $\beta$  zur Differenzierung angeregt wurden. Sollte die Unterdrucktherapie auch in der Lage sein, die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten zu hemmen, könnte hierin allerdings gemäß Sarrazy et al. (25) auch ein protektiver Faktor zu sehen sein, welcher vor übermäßiger Narbenbildung schützt.

Zum Differenzierungsverhalten von Monozyten in Makrophagen unter Vakuumtherapie liegen in der Literatur bisher keine Untersuchungen vor. Es ist jedoch seit längerem anerkannt, dass die Differenzierung von Monozyten in gewebeständige Makrophagen eine essentielle Rolle in der physiologischen Wundheilung spielt (27). Somit ist in der von uns gezeigten Anregung der Monozyten zur Differenzierung in Makrophagen ein positiver Effekt der Vakuumtherapie zu sehen.

#### **5.5 Migration**

In dem von uns gewählten Versuchsaufbau konnten wir weder einen signifikant positiven noch einen negativen Effekt auf das Migrationsverhalten dermalen

Fibroblasten durch die Unterdruckbehandlung nachweisen. Betrachtet man die diesbezüglich existierende Literatur, erscheint dies jedoch auch wenig überraschend. McNulty et al. (47) zeigten in ihren Untersuchungen an einer dreidimensionalen Fibroblastenmatrix bereits, dass der Einfluss der Unterdrucktherapie auf das Migrationsverhalten von Fibroblasten entscheidend von der im Rahmen der Therapie genutzten Wundauflage abhängig ist. Ein einfacher Gaze-Verband unter -125 mmHg Unterdruck hatte in diesen Experimenten keinen anderen Einfluss auf die Migration der Fibroblasten, als eine unbehandelte Kontrolle in gewöhnlichem Fibroblasten-Kulturmedium. Diese Ergebnisse sind also weitestgehend analog zu den Ergebnissen unserer Versuche zu betrachten.

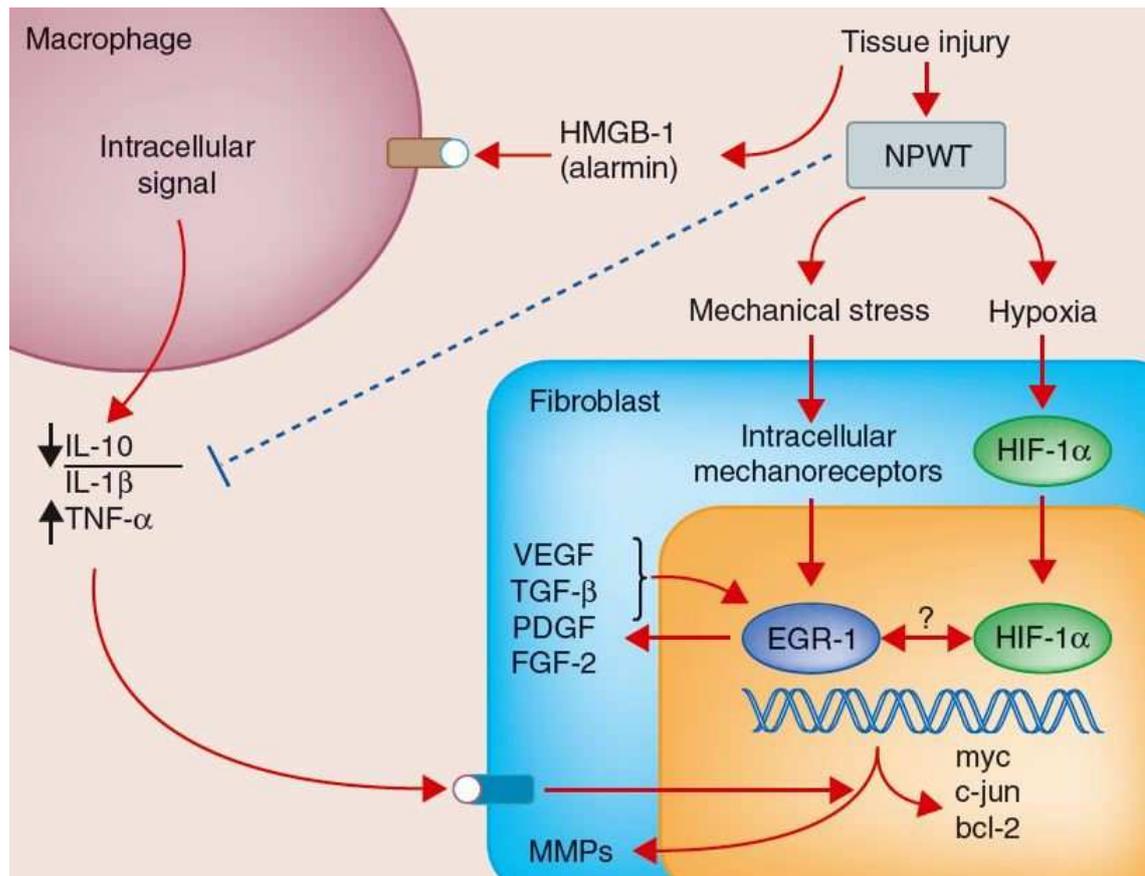
Wilkes et al. (48) bestätigten den Einfluss der gewählten Wundauflage in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2009 erneut, in welcher sie in einem computerbasierten Modell zeigten, dass die mikrodeformierende Kraftübertragung, welche letztendlich als Stimulus zur Migration anzusehen ist, unterschiedlich stark ausgeprägt ist, je nach gewähltem Material für die Wundauflage.

Es lässt sich also vermuten, dass in unserem Versuchsaufbau keine direkte Kraftübertragung des Unterdrucks auf die Zellen stattfindet, da eine entsprechende Wundauflage fehlt. Somit kommt es nicht zu Mikrodeformationen und ein Migrationsstimulus bleibt aus.

## **5.6 Angiogenese**

Die Ergebnisse unserer Versuche zur Angiogenese zeigen, dass die VAC<sup>®</sup>-Therapie in der Lage ist, die lokale Neoangiogenese VEGF-vermittelt zu steigern. Während dies bereits in diversen Vorarbeiten *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden konnte (36,46), zeigen neuere Untersuchungen (46,51) vor allem, dass dieser Effekt nicht ausschließlich durch eine lokale Hypoxie induziert wird, sondern auch über Mechanorezeptoren aufgrund von Mikrodeformationen der Zellen vermittelt wird. Dies ist insofern interessant, da die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung nahelegen, dass in dem von uns genutzten Versuchsaufbau mechanischer Stress und zelluläre Mikrodeformation durch die Unterdruckapplikation eine untergeordnete Rolle spielen (Vgl. Kapitel 5.5). Es lässt sich also sagen, dass unsere Versuche zeigen konnten, dass der neoangiogenetische Effekt im Rahmen der hypobaren Drucktherapie auch bei isolierter Hypoxie ohne Stimulation zellulärer Mechanorezeptoren stattfindet. In

Hypoxie und Mikrodeformation sind also zwei getrennte Effekte der Unterdrucktherapie zu sehen, die zwar beide die Neoangiogenese fördern, aber vermutlich nicht über einen gemeinsamen Signalweg vermittelt werden. Wie Abb. 23 zeigt, gehen auch Glass et al. (46) von dieser These aus. Eine Verschaltung des Hypoxie-induzierten und des durch mechanischen Stress vermittelten Signalweges wird von ihnen zwar vermutet, letztlich nachweisen konnten sie ihn bisher jedoch nicht.



**Abb. 23: Vermutet Wirkung der VAC®-Therapie auf Zytokine, Wachstumshormone und Matrix-Metalloproteinasen gemäß Glass et al. (46).** Abgedruckt mit freundlicher Genehmigung des John Wiley & Sons Verlags, New Jersey, USA. Es wird ein durch mechanischen Stress induzierter, sowie ein durch Hypoxie induzierter Signalweg beschrieben, welcher über intrazelluläre Mechanorezeptoren bzw. HIF-1 $\alpha$  vermittelt wird. Eine Verschaltung der beiden Signalwege wird vermutet (?), ist bisher aber nicht bewiesen. HMGB, high-mobility group box; IL, Interleukin; TNF, Tumor necrosis factor; HIF, hypoxia-inducible factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; TGF, transforming growth factor; PDGF, platelet derived growth factor; FGF, fibroblast growth factor; EGR, early growth response.

## 5.7 Kritische Betrachtung

Während der Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde uns bewusst, dass das von uns etablierte und genutzte Modell zwar dem aktuellen wissenschaftlichen Standard in der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der VAC<sup>®</sup>-Therapie entspricht, es aber dennoch nur in eingeschränktem Maße der klinischen Realität eines Vakuumverbandes gerecht werden kann. In den genutzten Versuchskammern wurde keineswegs ein Vakuum, sondern lediglich ein verringerter Sauerstoffpartialdruck erzeugt. Der normale Sauerstoffpartialdruck in der Umgebungsluft von ca. 1,01 bar wurde um 0,16 bzw. 0,33 bar (entsprechend -125 und -250 mmHg) abgesenkt. Frühere Arbeiten (7,52) zeigten hingegen, dass die Anlage eines VAC<sup>®</sup>-Verbandes viel mehr durch die gesteigerte Perfusion zu einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck im Wundgebiet führt. Darüber hinaus kann die isolierte Betrachtung des Verhaltens einzelner Zelltypen in unserem Modell nur schwer die Komplexität der Vorgänge in einer „realen“ Wunde während der Wundheilung abbilden. Es sollte auch nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei THP-1 und Jurkat-T-Zellen um artifizielle Zelllinien handelt, welche so im menschlichen Körper nicht vorkommen. Sie stellen in der wissenschaftlichen Welt zwar ein gemeinhin anerkanntes Modell für Monozyten/Makrophagen bzw. T-Lymphozyten dar, ob sich native humane T-Lymphozyten bzw. Makrophagen in unserem Versuchsaufbau allerdings gleich verhalten würden bleibt unklar und könnte der Inhalt einer Folgearbeit sein. Auch wurden etwaige Effekte der in der Unterdrucktherapie genutzten Wundaufgabe in unseren Experimenten außen vor gelassen. Bereits in Kapitel 5.5 haben wir zudem diskutiert, dass die mechanische Wundadaptation mit daraus folgender Mikrodeformation der Zellen im Wundgebiet in dem von uns genutzten Versuchsaufbau nicht berücksichtigt bzw. erreicht wird. Um dem gerecht zu werden, könnte der Versuchsaufbau in Folgeexperimenten insofern abgeändert werden, dass die untersuchten Zellen direkt mit einer Folie, wie sie im klinischen Alltag auch genutzt wird, abgedeckt werden, um so eine direkte Kraftübertragung des Unterdrucks auf die Zellen zu erreichen. Des Weiteren kann unser Modell die Komplexität einer realen Wunde nur schwer widerspiegeln, da es in unserem Aufbau nicht möglich ist, den Zellen permanent frisches Medium und somit Nährstoffe zuzuführen. Verschiedene

Untersuchungen legen nahe, dass hierin ebenfalls ein wesentlicher Effekt der Unterdrucktherapie zu sehen ist (9,46).

Trotz all dieser methodisch bedingten Einschränkungen muss jedoch auch festgehalten werden, dass zwar die klinische Erfahrung für einen positiven Effekt der hypobaren Unterdrucktherapie auf die Wundheilung spricht, Metaanalysen (53,54) jedoch zeigen, dass diese klinische Erfahrung keineswegs ausreichend evidenz-basiert ist. Es scheint also umstritten, ob alle in der Literatur beschriebenen Effekte, seien es nun in *in vitro* oder *in vivo* Untersuchungen, auch tatsächlich relevant und reproduzierbar sind.

Somit lässt sich abschließend sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit als Hinweis und auch weiterer Beleg für einige der vermuteten Wirkmechanismen, wie beispielsweise für eine Induktion der Differenzierung von Monozyten in gewebständige Makrophagen oder eine Anregung der Neoangiogenese, der weit verbreiteten VAC<sup>®</sup>-Therapie gesehen werden können. Andere konstatierte Effekte erscheinen jedoch auch fraglich. Was beispielsweise das Migrations- und Differenzierungsverhalten von Fibroblasten anbelangt, konnten wir in unseren Versuchen beispielsweise keinen positiven Effekt der Therapie zeigen. Die tatsächliche Wirkweise dieser Therapie wird sich somit wohl nur in komplexeren Modellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, sowie weiteren klinischen Studien adäquat analysieren lassen, sodass dies der Inhalt weiterer Folgearbeiten sein sollte.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Fleischmann W, Strecker W, Bombelli M, Kinzl L. [Vacuum sealing as treatment of soft tissue damage in open fractures]. *Unfallchirurg*. September 1993;96(9):488–92.
2. Volkering CH. Die Prinzipien der chirurgischen Therapie beim fortgeschrittenen Pyoderma gangränosum [Internet] [Dissertation]. [München]: Ludwig-Maximilians-Universität zu München; 2008. Verfügbar unter: [http://edoc.ub.uni-muenchen.de/9322/1/Volkering\\_Christoph.pdf](http://edoc.ub.uni-muenchen.de/9322/1/Volkering_Christoph.pdf)
3. Argenta LC, Morykwas MJ. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann Plast Surg*. Juni 1997;38(6):563–76; discussion 577.
4. Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, McGuirt W. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Ann Plast Surg*. Juni 1997;38(6):553–62.
5. Holle G, Riedel K, von Gregory H, Gazyakan E, Raab N, Germann G. [Vacuum-assisted closure therapy. Current status and basic research]. *Unfallchirurg*. Juni 2007;110(6):490–504.
6. Wild T, Schöttel M, Renner B, Zeugswetter S, Fitzal F, Rinder H, u. a. Schwarzer oder weißer Schwamm? *Eur Surg*. 2003;35:43–4.
7. Brauckmann S. Einfluss von subatmosphärischem Druck auf die Reaktivität humaner Leukozyten – potentieller Wirkmechanismus der Vakuumversiegelung [Inaugural-Dissertation]. Duisburg-Essen; 2008.
8. Birke-Sorensen H, Malmsjo M, Rome P, Hudson D, Krug E, Berg L, u. a. Evidence-based recommendations for negative pressure wound therapy: treatment variables (pressure levels, wound filler and contact layer)--steps towards an international consensus. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. September 2011;64 Suppl:S1–16.
9. Glass GE, Nanchahal J. The methodology of negative pressure wound therapy: Separating fact from fiction. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. August 2012;65(8):989–1001.
10. Vuerstaek JDD, Vainas T, Wuite J, Nelemans P, Neumann MHA, Veraart JCJM. State-of-the-art treatment of chronic leg ulcers: A randomized controlled trial comparing vacuum-assisted closure (V.A.C.) with modern wound dressings. *J Vasc Surg*. November 2006;44(5):1029–37; discussion 1038.
11. Haslik W, Kamolz L-P, Andel H, Meissl G, Frey M. [The use of subatmospheric pressure to prevent burn wound progression: first experiences in burn wound treatment]. *Zentralbl Chir*. Mai 2004;129 Suppl 1:S62–3.
12. Armstrong DG, Lavery LA. Negative pressure wound therapy after partial diabetic foot amputation: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 12. November 2005;366(9498):1704–10.

13. Wild T, Stortecky S, Stremitzer S, Lechner P, Humpel G, Glaser K, u. a. [Abdominal dressing -- a new standard in therapy of the open abdomen following secondary peritonitis?]. *Zentralbl Chir.* April 2006;131 Suppl 1:S111–4.
14. Jeschke MG, Rose C, Angele P, Füchtmeier B, Nerlich MN, Bolder U. Development of new reconstructive techniques: use of Integra in combination with fibrin glue and negative-pressure therapy for reconstruction of acute and chronic wounds. *Plast Reconstr Surg.* Februar 2004;113(2):525–30.
15. Sjögren J, Gustafsson R, Nilsson J, Malmsjö M, Ingemansson R. Clinical outcome after poststernotomy mediastinitis: vacuum-assisted closure versus conventional treatment. *Ann Thorac Surg.* Juni 2005;79(6):2049–55.
16. Wild T. [Consensus of the German and Austrian societies for wound healing and wound management on vacuum closure and the VAC treatment unit]. *MMW Fortschr Med.* 9. Oktober 2003;145 Suppl 3:97–101.
17. Von Thun-Hohenstein H. Druckverhältnisse im Bereich der Grenzschicht Schwamm / Gewebe während der Anwendung der Vakuumversiegelung - Eine klinisch-experimentelle Studie [Internet] [Dissertation]. [Osnabrück]: Ulm; 2006. Verfügbar unter: [http://vts.uni-ulm.de/docs/2006/5794/vts\\_5794\\_7708.pdf](http://vts.uni-ulm.de/docs/2006/5794/vts_5794_7708.pdf)
18. Gustafsson R, Sjögren J, Ingemansson R. Was unter einer lokalen Unterdrucktherapie zu verstehen ist. 2007;3.
19. Wackenfors A, Sjögren J, Gustafsson R, Algotsson L, Ingemansson R, Malmsjö M. Effects of vacuum-assisted closure therapy on inguinal wound edge microvascular blood flow. *Wound Repair Regen.* Dezember 2004;12(6):600–6.
20. Kairinos N, Solomons M, Hudson DA. The paradox of negative pressure wound therapy – in vitro studies. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery.* Januar 2010;63(1):174–9.
21. Martins-Green M, Petreaca M, Wang L. Chemokines and Their Receptors Are Key Players in the Orchestra That Regulates Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* September 2013;2(7):327–47.
22. Slobodianik GI. [Current views on the morphology of wound healing]. *Lik Sprava.* August 2001;(4):129–33.
23. Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol.* Oktober 2002;13(5):377–83.
24. Robson MC. Growth factors as wound healing agents. *Curr Opin Biotechnol.* Dezember 1991;2(6):863–7.
25. Sarrazy V, Billet F, Micallef L, Coulomb B, Desmoulière A. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair Regen.* September 2011;19 Suppl 1:s10–5.

26. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Translational Medicine*. 24. Februar 2012;1(2):142–9.
27. Diegelmann RF, Cohen IK, Kaplan AM. The role of macrophages in wound repair: a review. *Plast Reconstr Surg*. Juli 1981;68(1):107–13.
28. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. August 1980;26(2):171–6.
29. Colwell AS, Beanes SR, Soo C, Dang C, Ting K, Longaker MT, u. a. Increased angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor during scarless repair. *Plast Reconstr Surg*. Januar 2005;115(1):204–12.
30. Ono I, Yamashita T, Hida T, Jin H-Y, Ito Y, Hamada H, u. a. Combined administration of basic fibroblast growth factor protein and the hepatocyte growth factor gene enhances the regeneration of dermis in acute incisional wounds. *Wound Repair Regen*. Februar 2004;12(1):67–79.
31. Schäffer M, Barbul A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *British journal of surgery*. 2003;85(4):444–60.
32. Barbul A, Breslin RJ, Woodyard JP, Wasserkrug HL, Efron G. The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg*. April 1989;209(4):479–83.
33. Boyce DE, Jones WD, Ruge F, Harding KG, Moore K. The role of lymphocytes in human dermal wound healing. *Br J Dermatol*. Juli 2000;143(1):59–65.
34. Lacher SK. Adenosinrezeptoren auf humanen T-Lymphozyten: Modulation durch Subtyp-selektive Rezeptor-Agonisten und-Antagonisten [Internet]. Universitäts- und Landesbibliothek Bonn; 2009 [zitiert 24. März 2013]. Verfügbar unter: <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2009/1695/1695.pdf>
35. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. 4. Oktober 2012 [zitiert 18. April 2013]; Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-012-1152-9>
36. Xia C-Y, Yu A-X, Qi B, Zhou M, Li Z-H, Wang W-Y. Analysis of blood flow and local expression of angiogenesis-associated growth factors in infected wounds treated with negative pressure wound therapy. *Mol Med Rep*. Mai 2014;9(5):1749–54.
37. Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer; 2007.
38. Lukens JR, Gross JM, Kanneganti T-D. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Frontiers in immunology* [Internet]. 2012 [zitiert 4. April 2013];3. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3466588/>

39. Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Koh TJ. Blocking IL-1 $\beta$  Induces a Healing-associated Wound Macrophage Phenotype and Improves Healing in Type-2 Diabetes. *Diabetes*. 14. März 2013;
40. O'Reilly S, Ciechomska M, Cant R, Hügle T, van Laar JM. Interleukin-6, its role in fibrosing conditions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. Juni 2012;23(3):99–107.
41. Lan C-CE, Wu C-S, Huang S-M, Wu I-H, Chen G-S. High-glucose environment enhanced oxidative stress and increased interleukin-8 secretion from keratinocytes: New insights on impaired diabetic wound healing. *Diabetes*. 19. Februar 2013;
42. Ashcroft GS, Jeong M-J, Ashworth JJ, Hardman M, Jin W, Moutsopoulos N, u. a. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. Januar 2012;20(1):38–49.
43. Dzieciuchowicz Ł, Kruszyna Ł, Krasieński Z, Espinosa G. Monitoring of systemic inflammatory response in diabetic patients with deep foot infection treated with negative pressure wound therapy. *Foot Ankle Int*. Oktober 2012;33(10):832–7.
44. Daigle P, Despatis M-A, Grenier G. How mechanical deformations contribute to the effectiveness of negative-pressure wound therapy. *Wound Repair Regen*. August 2013;21(4):498–502.
45. Zhu J, Yu A, Qi B, Li Z, Hu X. Effects of Negative Pressure Wound Therapy on Mesenchymal Stem Cells Proliferation and Osteogenic Differentiation in a Fibrin Matrix. *PLoS One* [Internet]. 12. September 2014 [zitiert 15. Oktober 2014];9(9). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4162584/>
46. Glass GE, Murphy GF, Esmaili A, Lai L-M, Nanchahal J. Systematic review of molecular mechanism of action of negative-pressure wound therapy. *Br J Surg*. 8. Oktober 2014;
47. McNulty AK, Schmidt M, Feeley T, Kieswetter K. Effects of negative pressure wound therapy on fibroblast viability, chemotactic signaling, and proliferation in a provisional wound (fibrin) matrix. *Wound Repair and Regeneration*. 1. November 2007;15(6):838–46.
48. Wilkes R, Zhao Y, Kieswetter K, Haridas B. Effects of dressing type on 3D tissue microdeformations during negative pressure wound therapy: a computational study. *J Biomech Eng*. März 2009;131(3):031012.
49. Gabriel A. Integrated negative pressure wound therapy system with volumetric automated fluid instillation in wounds at risk for compromised healing. *Int Wound J*. August 2012;9 Suppl 1:25–31.
50. Liu D, Zhang L, Li T, Wang G, Du H, Hou H, u. a. Negative-Pressure Wound Therapy Enhances Local Inflammatory Responses in Acute Infected Soft-Tissue Wound. *Cell Biochem Biophys*. 20. April 2014;

51. Lancerotto L, Bayer LR, Orgill DP. Mechanisms of action of microdeformational wound therapy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Dezember 2012;23(9):987–92.
52. Labler L, Trentz O. The use of vacuum assisted closure (VAC) in soft tissue injuries after high energy pelvic trauma. *Langenbecks Arch Surg*. September 2007;392(5):601–9.
53. Webster J, Scuffham P, Sherriff KL, Stankiewicz M, Chaboyer WP. Negative pressure wound therapy for skin grafts and surgical wounds healing by primary intention. In: *The Cochrane Collaboration, Herausgeber. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2012 [zitiert 21. Oktober 2014]. Verfügbar unter: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD009261.pub2>
54. Gregor S, Maegele M, Sauerland S, Krahn JF, Peinemann F, Lange S. Negative pressure wound therapy: A vacuum of evidence? *Arch Surg*. 1. Februar 2008;143(2):189–96.

## **Danksagung**

Eigentlich hatte ich für mich immer beschlossen, dass eine Danksagung im Rahmen meiner Dissertationsarbeit nicht nötig wäre, da die vielen Menschen die mich während der nicht immer einfachen Zeit die ich mit dieser Arbeit verbracht habe unterstützt haben ohnehin wissen, wie unsagbar dankbar ich ihnen bin.

Nun da sich meine Zeit mit dieser Arbeit jedoch allmählich dem Ende nähert, ist mir bewusst geworden, dass es doch ein paar Menschen gibt, die neben meinen Freunden, Verwandten, Kommilitonen und Kollegen aus dem Labor die ich hier nicht alle namentlich aufzählen kann, an dieser Stelle eine ganz besondere Erwähnung finden sollten. Ohne euch wäre das Zustandekommen dieser Dissertation niemals möglich gewesen!

An erster Stelle stehen hier ganz klar meine geliebten Eltern Christiane und Norbert, sowie mein großes Bruderherz Steffen. Ihr habt mich über die gesamte Studienzeit, die gesamte Zeit die ich mit dieser Arbeit verbracht habe und auch darüber hinaus auf jede erdenkliche Art und Weise unterstützt, mir gut zugesprochen wenn ich es nötig hatte und mich mit allem in Frieden gelassen und mir Ablenkung geboten, als ich es brauchte. Das werde ich euch nie vergessen und für meine Dankbarkeit hierfür gibt es keine Worte!

An nächster Stelle steht mein Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek. Du hast mein Vertrauen in diese Arbeit immer am Leben erhalten und standest mir stets freundlich, freundschaftlich und geduldig zur Seite, wenn etwas nicht so lief wie geplant und hattest auch immer gleich einen Lösungsvorschlag parat. Für die Idee der WECK-Glas-Unterdruckkammern werde ich dich ewig feiern!

Zu guter Letzt gilt mein Dank den beiden herzensguten medizinisch-technischen Assistentinnen Samira und Jutta, sowie meiner Laborkollegin Benita. Ihr habt mir so unfassbar viel beigebracht während den experimentellen Arbeiten die dieser Dissertation zu Grunde liegen und hattet immer ein offenes Ohr für mich, wenn ich mit meinem Latein mal wieder am Ende war und eure Hilfe dringend brauchte. Danke nochmal dafür, ihr habt mehr als ein Frühstück gut bei mir!

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

16.04.2015, Florian Löcherbach