

Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie des
Universitätsklinikum Düsseldorf

Leiter: Univ.-Prof. Dr. Hubert Schelzig

Einfluss von oxidiertes Cellulose auf grundlegende
Prozesse der Wundheilung

Dissertation

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

vorgelegt von

Joscha Udo Nikolaus Mulorz

2017

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari

“The natural history of science is the study of the unknown. If you fear it, you're not going to study it and you're not going to make any progress.”

Michael Ellis DeBakey

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Wagenhäuser MU, Mulorz J, Ibing W, Simon F, Spin JM, Schelzig H,
Oberhuber A.
Oxidized (non)-regenerated cellulose affects fundamental cellular processes of
wound healing.
Sci Rep. 2016 Aug 25;6:32238

Zusammenfassung

Materialien aus oxidierte Cellulose werden im chirurgischen Alltag vielfach verwendet, aufgrund ihrer einfachen und schnellen Anwendbarkeit als Hämostyptika und Adhäsionsbarriere. Obwohl sie bereits seit vielen Jahren Anwendung finden, sind viele Fragen hinsichtlich ihrer genauen Funktionsweise und Eigenschaften weitestgehend ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von oxidierte regenerierte Cellulose (ORC) und oxidierte nicht-regenerierte Cellulose (ONRC) auf grundlegende Prozesse der Wundheilung zu untersuchen. Hintergrund dafür ist der häufige Einsatz beider Materialien bei chirurgischen Eingriffen, wobei sie hierbei oft im Patienten verbleiben.

Im Rahmen dieses Projektes wurden Fibroblasten, die maßgeblich am Heilungsprozess tiefer chirurgischer Wunden beteiligt sind, mit den beiden unterschiedlichen Materialien zusammengebracht und dabei Parameter wie lokale pH-Wert-Entwicklung, Wachstumsverhalten, Kontraktionsfähigkeit und Migrationsverhalten untersucht.

Beide Materialien zeigten für beinahe alle der untersuchten Eigenschaften eine hemmende Wirkung auf die Zellen. Am deutlichsten kamen die inhibierenden Effekte unter dem Einsatz von ONRC zum Tragen. Naheliegender erschien, dass diese Effekte auf eine pH-Wert-Änderung zurückzuführen seien, die während des Zerfalls- bzw. Abbauprozesses der Materialien entstand. Dies konnte jedoch durch vergleichende Versuche mit annähernd pH-Wert-identischen Kontrollkulturmedien weitestgehend widerlegt werden.

Schlussfolgernd scheint sowohl ORC, aber vor allem ONRC, einen inhibierenden Effekt auf Fibroblasten bezüglich der untersuchten Parameter zu haben. Dieser Effekt ist vermutlich überwiegend losgelöst vom lokalen pH-Wert. Ein möglicher Erklärungsansatz könnten materialspezifische Zerfallsprodukte sein, die während des Abbauprozesses entstehen.

Diese Arbeit leistet einen basiswissenschaftlichen Beitrag zur Wirkungsweise von oxidierte Cellulose auf den Wundheilungsprozess.

Abstract

Materials made from oxidized cellulose are commonly used in surgeon's daily routine as hemostats and adhesion barrier. Though they are in use for several years, there are still unanswered questions concerning their properties and way of functioning.

This work investigated the influence of oxidized regenerated cellulose (ORC) and oxidized non-regenerated cellulose (ONRC) on fundamental processes in woundhealing, considering the background that the materials are often left in the human body following surgical procedures.

Human stromal fibroblasts were used for the experiments as they are crucial to the healing process of deep incisional wounds. Different parameters like local pH environment, cell proliferation, cell migration and collagen matrix contraction were compared under and without influence of ORC and ONRC.

Both materials showed inhibiting influence for nearly all investigated cellular processes especially when ONRC was used. It seemed obvious that the observed effects resulted from acidosis produced by the degradation process of the materials. By using buffered control media with nearly same pH values as produced by the materials this theory was mostly contradicted.

In conclusion both materials showed to have an inhibiting influence on the investigated cellular processes which was more evident for ONRC. These effects might be explainable due to material-specific compounds such as fibrous hydrolysis end-products since the observations were mostly independent from changes in local pH values.

This work contributes to the basic scientific understanding of how materials made from oxidized cellulose influence the wound healing process.

Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Ø	Durchmesser
Σ	Sigma (Summenzeichen)
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag(e)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes, steriles Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified EageL Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm

h	Stunde
HCL	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
n =	Probenanzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
O₂	Sauerstoff
ONRC	Oxidierter nicht-regenerierter Cellulose
ORC	Oxidierter regenerierter Cellulose
p	p-Wert, Signifikanzwert
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDGF	platelet derived growth factor
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

sec	Sekunde
sog.	sogenannte(r)
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderen
US\$	Dollar (amerikanisch)
VEGF	vascular endothelial growth factor
WST	water soluble tetrazolium
xg	relative Zentrifugalkraft
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Wundheilung.....	1
1.1.1 Phasen der Wundheilung	2
1.1.1.1 Phase der Blutungsstillung.....	2
1.1.1.2 Inflammationsphase.....	2
1.1.1.3 Granulations- / Proliferationsphase	4
1.1.1.4 Umbauphase.....	5
1.1.2 Rolle der Fibroblasten in der Wundheilung.....	5
1.2 Wundheilungsstörungen	7
1.2.1 Wundheilungsstörungen nach (gefäß-) chirurgischen Eingriffen	9
1.3 Oxidierte Cellulosematerialien	10
1.3.1 Aufbau und Eigenschaften von oxidierten Cellulosematerialien	10
1.3.2 Oxidierte Cellulose und Wundheilung.....	13
1.4 Fragestellung und Aufbau der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Oxidierte Cellulosematerialien	16
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.1.4 Kulturmedien	19
2.1.5 Zellkulturen	19
2.1.6 Computerprogramme.....	19
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Zellkultur	20
2.2.1.1 Allgemeine Anmerkungen	20
2.2.1.2 Einfrieren der Zellkultur	20
2.2.1.3 Auftauen der Zellkultur	21
2.2.1.4 Wechsel des Zellkulturmediums.....	21
2.2.1.5 Zellkultivierung.....	21
2.2.1.6. Bestimmung der Zellzahl	22
2.2.2 pH-Wert-Bestimmung	23

2.2.2.1 Versuchsaufbau Ansätze in Zellkulturmedium.....	23
2.2.2.2 Versuchsaufbau Ansätze in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung.....	24
2.2.2.3 Versuchsaufbau Ansätze mit gesäuertem Zellkulturmedium.....	24
2.2.2.4 Übersicht der Versuchsgruppen.....	25
2.2.2.5 Durchführung der Messung.....	26
2.2.3. Zellviabilitätsassay.....	26
2.2.3.1. Versuchsaufbau.....	26
2.2.3.2. Assayprinzip und Auswertung.....	27
2.2.4 Kontraktionsassay.....	28
2.2.4.1 Versuchsaufbau/Erstellen der Matrizen.....	28
2.2.4.2 Fotodokumentation.....	30
2.2.4.3 Ausmessen der Matrizen.....	31
2.2.5 Migrationsassay.....	31
2.2.5.1 Versuchsaufbau.....	31
2.2.5.2 Dokumentation.....	32
2.2.5.3 Bildauswertung.....	32
3. Ergebnisse.....	34
3.1 Ergebnisse pH-Messung.....	34
3.1.1 pH-Messung mit Zellkulturmedium.....	34
3.1.2 pH-Messung mit 0,9 % NaCl-Lösung.....	35
3.1.3 pH-Messung mit angesäuertem Zellkulturmedium.....	36
3.2 Ergebnisse Zellviabilitätsassay.....	38
3.2.1 Zellwachstum in Zellkulturmedium.....	38
3.2.2 Zellwachstum in angesäuertem Zellkulturmedium.....	39
3.3 Ergebnisse Kontraktionsassay.....	41
3.3.1 Kontraktionsassay mit Zellkulturmedium.....	41
3.3.2 Kontraktionsassay mit angesäuertem Zellkulturmedium.....	42
3.4. Ergebnisse Migrationsassay.....	43
3.4.1 Kontrolle gegen oxidierte Cellulosematerialien.....	43
3.4.2 Angesäuertes Zellkulturmedium gegen oxidierte Cellulosematerialien	45
4. Diskussion.....	47
4.1 pH-Wert-Entwicklung.....	47
4.2 Zellwachstum.....	50

4.3 Kontraktionsverhalten	52
4.4 Zellmigration	54
5. Schlussfolgerung	57
6. Literatur- und Quellenverzeichnis	59
7. Abbildungsverzeichnis	66
Danksagung	
Eidesstattliche Versicherung	

1. Einleitung

1.1 Wundheilung

Die Haut des Menschen bildet eine natürliche Barriere gegen Umwelteinflüsse. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, muss sie in der Lage sein nach Verletzungen ihre Integrität rasch wiederherzustellen. So wird ein zu hoher Blutverlust oder eine Infektion verhindert. Ein weiteres Ziel der Wundheilung ist das Zurückbleiben einer unter funktionellen Gesichtspunkten zufriedenstellenden Narbe (1).

Wundheilung umfasst einen komplexen biologischen Vorgang, bei dem zahlreiche Prozesse, zum Teil aneinander gekoppelt, aktiviert, kontrolliert und letztendlich gestoppt werden müssen (2).

Üblicherweise werden bei diesem Ablauf bis zu vier verschiedene Phasen unterschieden, welche sich zeitlich überlappen: Die Hämostase, die Entzündungs-, die Proliferations- und die Umbauphase des Gewebes (3, 4).

Während diese Phasen durchlaufen werden sind unterschiedliche Zelllinien für eine regelrechte Wundheilung entscheidend, die sich gegenseitig durch diverse Zytokine beeinflussen und kontrollieren. Die zugrundeliegenden Vorgänge sind bis heute Gegenstand intensiver Forschungen und nur teilweise untersucht und verstanden (5).

Können diese Vorgänge nicht regelrecht ablaufen, so kann es zu Wundheilungsstörungen kommen. Die Ursachen sind zahlreich. Es können sowohl endogene lokale Ursachen wie Bakterien oder Hypoxie, als auch endogene systemische Ursachen wie Alter oder Gerinnungsstörungen, die Wundheilung verlangsamen und erschweren (6).

1.1.1 Phasen der Wundheilung

1.1.1.1 Phase der Blutungsstillung

Die meisten Wunden verursachen eine Verletzung von Blutgefäßen und führen damit zu lokalen Blutungen. Durch die initiale Bildung eines Thrombus wird ein temporärer Schutz des offenliegenden Wundgewebes gewährleistet und zudem eine erste provisorische Matrix erstellt, die es Zellen ermöglicht während des Heilungsprozesses in den Wundgrund einzuwandern (7).

Die ersten rekrutierten Zellen sind Thrombozyten, da diese wesentlich an der Thrombusbildung beteiligt sind. Sie sind in der Lage Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln und so den Blutverlust zu limitieren.

Der Thrombus besteht daher überwiegend aus miteinander vernetzten Fibrinmolekülen und Plasma-Fibronektin, das als zusätzliches Bindungsprotein für Fibrin fungiert. Jedoch sind auch weitere Proteine, wie Vitronektin und Thrombospondin, die in der Proliferationsphase zum Auf- bzw. Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) führen, von wesentlicher Bedeutung (8).

Dass die initiale Thrombusbildung für die folgende Wundheilung essentiell ist, konnte anhand von Fibrinogen-defizitären Mäusen nachgewiesen werden. Diese Tiere zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikant schlechtere Wundheilung (9).

Weiterhin sind auch zelluläre Blutbestandteile für eine erfolgreiche Blutgerinnung wichtig. Thrombozyten und neutrophile Granulozyten werden aus dem Blut rekrutiert und tragen zur Thrombusbildung bei. Sie schütten eine Vielzahl von Zytokinen aus, die die Aggregation verstärken, die Koagulationkaskade unterstützen und eine chemotaktische Wirkung auf Zellen der inflammatorischen Phase ausüben (10).

1.1.1.2 Inflammationsphase

In der zweiten Phase der Wundheilung kommt es zunächst zur Infiltration durch Leukozyten.

Es werden proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) durch im Thrombus enthaltene Zellen, vor allem Thrombozyten, ausgeschüttet. Diese aktivieren

neutrophile Granulozyten, die so durch das Endothel der Blutkapillaren in den Wundgrund einwandern.

Dies führt zu einer erhöhten Expression von Adhärenzmolekülen, die für die Bindung und Diapedese weiterer Leukozyten sorgen.

So werden endotheliale P- und E-Selektine, wie auch intercellular adhesion molecule (ICAM) -1 und -2 ausgebildet, die wiederum mit Integrinen auf der Oberfläche von weiteren neutrophilen Granulozyten interagieren (11).

Frisch rekrutierte neutrophile Granulozyten sind nun in der Lage sowohl das avitale Gewebe abzubauen als auch infektiöse Mikroorganismen zu phagozytieren. Zu diesem Zweck erzeugen sie reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), kationische Peptide sowie diverse Proteasen (12).

Zirkulierende Makrophagen werden zeitlich versetzt rekrutiert und können die Wunde von verbrauchten neutrophilen Granulozyten sowie Matrix- und Zellüberresten reinigen (13).

Zudem übernehmen die Makrophagen auch noch weitere wichtige Funktionen, indem sie unter anderem (u.a.) Wachstumsfaktoren wie transforming growth factor (TGF) - α und - β sowie Platelet-derived growth factor (PDGF) und Insulin-like growth factor (IGF) -1 ausschütten. Durch diesen Prozess wird die Bildung von Granulationsgewebe gefördert (14). Außerdem nehmen sie direkten Einfluss auf Fibroblasten, einem zentralen Zelltyp der Wundheilung und regen diese zur Proliferation an (15).

Die wechselseitige Beziehung von Fibroblasten und Leukozyten wird anhand einer Studie an CD18-defizitären Mäusen deutlich. CD18 ist ein Oberflächenprotein von Leukozyten. Die Wundheilung war bei diesen Tieren in Folge geringerer Wundkontraktion deutlich verlangsamt. Diese Beobachtung wurde auf die mangelnde Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zurückgeführt. Pathophysiologisch konnte gezeigt werden, dass bei CD18-defizitären Tieren die Wunden weitestgehend frei von apoptotischen neutrophilen Granulozyten waren. Den Makrophagen fehlte folglich ein wichtiger Stimulus um TGF- β 1 zu sekretieren, einen zentralen Mediator der Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten (16).

Ebenfalls von Bedeutung in der Phase der Inflammation sind Mastzellen, die über eine Fülle von Mediatoren verfügen mit denen sie auch spätere Phasen der Wundheilung beeinflussen können. So werden neben chemotaktischen und

vasoaktiven auch proinflammatorische Peptide und Wachstumsfaktoren wie etwa Interleukin-4 und -8, vascular endothelial growth factor (VEGF), PDGF und TGF- β ausgeschüttet. Diese Proteine sind für Angiogenese, Fibroplasie und Re-Epithelialisierung essentiell (17).

1.1.1.3 Granulations- / Proliferationsphase

Die dritte Phase der Wundheilung überlappt und interagiert, durch Wechselwirkungen mit zuvor erwähnten Zytokinen und Proteinen, mit vorhergehenden Phasen. In dieser Phase stehen Zellproliferation und struktureller Umbau der EZM, bei der insbesondere Fibroblasten eine Rolle spielen, im Mittelpunkt. Diese wandern in den Wundgrund ein, proliferieren und bilden EZM als Basis für regeneratives Granulationsgewebe (3).

Um das neu gebildete Granulationsgewebe adäquat zu versorgen, ist eine suffiziente Sauerstoffversorgung des betroffenen Areals notwendig. Deswegen werden im Rahmen der Neoangiogenese durch erniedrigte Sauerstoff (O_2)-Spiegel Endothelzellen zum Wachstum angeregt (18). Dieser Vorgang kann auch durch Zytokine wie VEGF und TGF- β gefördert werden (1, 19).

So konnte gezeigt werden, dass die Applikation von VEGF-A in Wunden diabetischer Mäuse die Angiogenese steigert und so die Wundheilung verbessert (20).

Für einen raschen Wundverschluss sind zudem Keratinozyten, die die Wunde re-epithelialisieren, entscheidend. Zunächst wandern sie von den Wundrändern aus in das Wundareal ein. Dies geschieht mit Hilfe von Integrin-Rezeptoren, die mit der fibronectin-reichen EZM interagieren (4). Um diesen Vorgang zu erleichtern produzieren die Keratinozyten Matrix-Metalloproteasen (MMP), die es weiteren Zellen aus der Basalmembran ermöglichen ebenfalls in die Wunde einzuwandern (21). Die Sekretion von MMP in den interzellularen Raum und in die EZM führt zu Degradationsprozessen. Diese schaffen ein vermehrtes Platzangebot und dienen als Grundlage für eine gesteigerte Zellproliferation (22, 23). Keratinozyten können deshalb durch eine Kombination aus gezielter Zellwanderung und Zellproliferation die Wunde bedecken und gegen weitere äußere Einflüsse schützen (24).

1.1.1.4 Umbauphase

Der letzte Teil der Wundheilung ist geprägt durch den Umbau des neu gebildeten Gewebes. Aus dem anfänglichen Gewebedefekt mit dem fibrin-reichen Thrombus, der nach und nach durch Granulationsgewebe ersetzt wird, entsteht Narbengewebe.

Eingeleitet wird die Umbauphase unter anderem durch Ausschüttung von TGF- β durch Makrophagen und durch aktivierte Thrombozyten. Dies regt Fibroblasten zur Differenzierung in Myofibroblasten an.

Das anfängliche Granulationsgewebe ist reich an Kollagen Typ III, wobei am Ende der Umbauphase Kollagen Typ I dominiert. Das Kollagen Typ III wird durch u.a. MMP zusehends abgebaut (25). Parallel steigern Myofibroblasten die Produktion von Kollagen Typ I, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen (8). Final gehen die Myofibroblasten und die Zellen der neu gebildeten Kapillaren in Apoptose über und ermöglichen so einen geregelten Übergang zur Narbenbildung (26).

Nach Abschluss des Prozesses entspricht die Dichte an Blutgefäßen der von normalem Gewebe (27).

Am Ende einer geregelten Wundheilung entsteht ein weitestgehend azelluläres Gewebe, das überwiegend aus Kollagen Typ I besteht. Dieses weist jedoch, verglichen mit prädominanten Kollagenen im normalen Gewebe, eine weniger organisierte Struktur auf, wodurch eine vergleichsweise schwächere mechanische Festigkeit, von maximal 70-80% des ursprünglichen Gewebes, verursacht wird (1, 28).

1.1.2 Rolle der Fibroblasten in der Wundheilung

Eine der zentralen Zelltypen der Wundheilung sind Fibroblasten. Schon kurz nach der inflammatorischen Phase werden sie u.a. durch das Glykoprotein Fibronectin angelockt und zur Proliferation stimuliert (29).

Die Migration der Fibroblasten in den Wundbereich wird durch diverse Zytokine angeregt. Studien an Zellkulturen konnten durch TGF- β -, PDGF- und fibroblast-growth-factor (FGF)-Zugabe in das Zellkulturmedium eine beschleunigte Zellmigration nachweisen. Außerdem wurde dadurch die Proliferation stimuliert (30).

Auch der anfänglich entstehende Thrombus bzw. darin enthaltene Proteine wie Fibrin, Fibrinogen und verschiedene Integrin-Rezeptoren interagieren mit Fibroblasten und regen diese zum Wachstum an (31).

Die Fibroblasten ersetzen durch die Produktion von kollagenreicher EZM Stück für Stück die provisorische Fibrin-Matrix, die dann als Gerüst für die weitere Wundheilung fungiert (3). Auch dieser Vorgang wird durch die Botenstoffe PDGF und TGF- β gestützt, da unter ihrem Einfluss weitere Integrin-Rezeptoren ausgebildet werden können (32). In der klinischen Umsetzung konnte durch Applikation von PDGF ein positiver Einfluss auf diabetische Ulzera nachgewiesen werden (33).

Die Produktion und der Umbau der EZM bilden die Grundlage für nachfolgende Schritte der Wundheilung (34).

Neben den bereits zuvor dargestellten Funktionen ist die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wesentlich. Diese Differenzierung basiert maßgeblich auf dem Einfluss von TGF- β (35).

Der Begriff Myofibroblast beschreibt einen veränderten Phänotyp, der Aktin-Mikrofilament-Bündel enthält, wie sie auch in glatten Muskelzellen vorkommen (36). Eine Isoform ist das alpha smooth muscle actin (α -SMA), das neben der kontraktilen Funktion auch der Aktivierung weiterer Myofibroblasten dient (37).

Die Aktinbündel enden auf der Oberfläche der Zellen im sog. Fibronexus, einem Membran-Komplex, an dem transmembranöse Integrine intrazelluläre Aktinbündel mit extrazellulären Fibronectin-Fibrillen der EZM verbinden können (38).

Auf diesem Weg wird ein Mechano-Transduktions-System ermöglicht, das letztlich die Kontraktionsenergie, die von den Aktinbündeln generiert wird, auf die umliegenden Strukturen überträgt (39). Darüber hinaus verfügen Myofibroblasten untereinander über direkte Verbindungen in Form von Gap Junctions. Über diese wird eine direkte Signalweiterleitung und damit die Bildung von kontraktilen Einheiten erreicht (38).

Allerdings können auch von „normalen“ Fibroblasten Traktionkräfte ausgehen, die in der Lage sind Kollagenstrukturen zu reorganisieren und so ebenfalls zur Kontraktion beizutragen (40).

Weiterhin tragen die Traktionskräfte zur Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten bei und scheinen somit eine spätere Phase des

Wundverschlusses einzuleiten (41). Tierexperimentelle Arbeiten zeigten, dass Myofibroblasten in Wunden von Ratten erst nach ca. sieben Tagen nachzuweisen sind, obwohl die Wunden zu diesem Zeitpunkt schon zu 50 % geschlossen waren (42).

Fibroblasten sind vor allem bei tiefen Gewebdefekten wie chirurgischen Wunden von Bedeutung, da sie im Bindegewebe einer der am häufigsten vertretenen Zelltypen sind (43).

Der Prozess der Wundheilung ist in *Abbildung (Abb.) 1* zur Verdeutlichung schematisch dargestellt.

Zusammenfassend können Fibroblasten als ein zentraler Zelltyp der Wundheilung angesehen werden, der in den verschiedenen Phasen der Wundheilung präsent und aktiv ist.

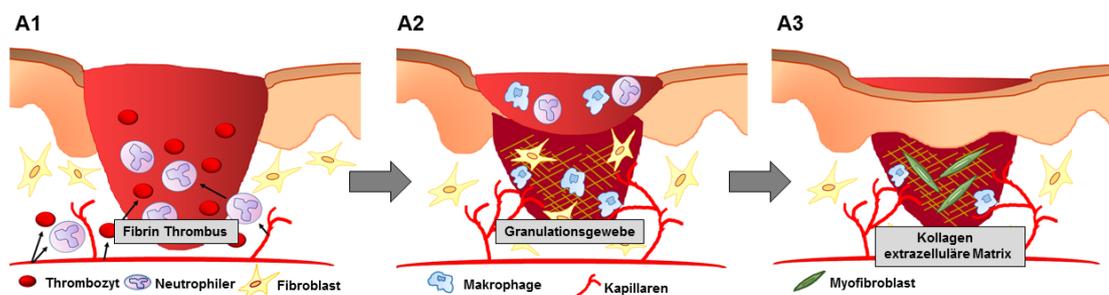


Abb. 1: Schema der Wundheilung. In der frühen Phase der Inflammation kommt es zum Influx von Neutrophilen und später von Makrophagen (A1), die über Zytokine Einfluss auf u.a. Fibroblasten nehmen und diese zur Proliferation anregen. Zellproliferation, Produktion von extrazellulärer Matrix sowie Neoangiogenese lassen Granulationsgewebe entstehen (A2). In der späten Phase des Heilungsprozesses kontrahieren Myofibroblasten im Wundareal (A3), bevor sie nach und nach in Apoptose übergehen und so abschließend azelluläres Narbengewebe zurückzulassen. Eigene Darstellung nach *Greaves et al.* (3).

1.2 Wundheilungsstörungen

In einer normal heilenden Wunde folgen die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Phasen in geregelter, zeitlich überlappender Reihenfolge aufeinander.

Zu Wundheilungsstörungen kommt es, wenn diese geregelten Abläufe gestört werden. Dies hat zur Folge, dass sich ein Stadium der chronischen Inflammation entwickelt. Daraus resultiert ein verlangsamter und nur unvollständiger Wundverschluss mit unzureichenden anatomischen wie auch funktionellen Ergebnissen (44).

Durch schlecht heilende Wunden entsteht nicht nur ein zusätzlicher Leidensdruck für den Patienten, durch längere und intensivere Behandlungen fallen zudem enorme Kosten an. Diese belaufen sich beispielsweise in den USA auf jährlich geschätzt 25 Milliarden US-Dollar (\$) (45).

Faktoren, die den Prozess der Wundheilung im Allgemeinen negativ beeinflussen sind zahlreich. Es können lokale Einflüsse, wie der Sauerstoffgehalt des Wundareals, oder Infektion sowie systemische Faktoren des Patienten wie Alter, Nebenerkrankungen oder Immunstatus unterschieden werden (27).

Allen diesen Faktoren ist eine Chronifizierung der Inflammation gemein.

Deutlich wird dies z.B. anhand von aktivierten neutrophilen Granulozyten, die in physiologisch heilenden Wunden nach 72 Stunden (h) kaum noch zu finden sind. In nicht heilenden Wunden sind diese Zellen jedoch darüber hinaus nachweisbar (46). Neutrophile Granulozyten produzieren große Mengen an MMP. Diese Enzyme sind sonst auch Teil des physiologischen Wundmilieus, da sie beispielsweise für die Erneuerung der EZM verantwortlich sind. Allerdings können sie, wenn sie unkontrolliert aktiv sind, ebenso wichtige Bestandteile der EZM durch Proteolyse zerstören (47). Erschwerend hinzu kommt ein Mangel an inhibitorischen Proteinen der MMP in chronischen Wunden (48).

Einfluss auf die Funktion der Proteasen nimmt auch der lokale pH-Wert, der in chronischen als auch akuten Wunden, verglichen mit der normalen Haut, ein alkalisches Niveau aufweist (49). In Versuchen konnte gezeigt werden, dass alkalische pH-Werte die Aktivität von MMP-2 oder der Neutrophilen-Elastase steigern und so einen erhöhten Abbau von Proteinen zur Folge haben können (50). Das führt dazu, dass erhöhte pH-Werte verglichen mit näher am neutralen Bereich liegenden Werten, zu einer schlechteren Wundheilung führen (51).

Das in der chronischen Wunde vorherrschende Zytokinprofil verändert sich zugunsten pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α . Pro-proliferative Zytokine hingegen wie TGF- β oder PDGF werden nicht im gleichen Ausmaß hochreguliert (52). Dies führt zu reduzierten Mitoseraten von Fibroblasten, die zudem aufgrund des vermehrten Abbaus durch MMP nicht ausreichend EZM produzieren können. Interessanterweise verändern sich nicht nur die Expressionsniveaus prädominierender Zytokine, sondern auch zelluläre Strukturen. So lassen sich in chronischen Wunden Zellmorphologien finden, die auf vorzeitige Alterung schließen lassen. Diese veränderten Morphologien scheinen die Zellproliferation,

Migration sowie die zelluläre Reaktion auf Wachstumsfaktoren zu verlangsamen (52, 53).

1.2.1 Wundheilungsstörungen nach (gefäß-) chirurgischen Eingriffen

Auch in der Chirurgie sind Wundheilungsstörungen eine häufige Komplikation, die man nach Möglichkeit unbedingt vermeiden möchte. Nach infrainguinaler Bypassoperation kommt es in 17-44% der Fälle zu Wundkomplikationen (54, 55). Auch beim häufig gewählten Gefäßzugang über die Leiste sind Wundheilungsstörungen keine Seltenheit und können durch rasch in die Tiefe fortschreitende Infekte zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Dabei sind beispielsweise infizierte Patch- oder Bypassmaterialien sowie septische Arrosionsblutungen oder Bypassverschlüsse möglich (56).

Häufig sind Wundinfektionen der Grund einer verzögerten Wundheilung. So ergaben Studien in Europa, dass bei 3-4% aller Patienten nach chirurgischen Eingriffen Wundinfekte auftreten (45). Allerdings werden speziell in der Gefäßchirurgie Zahlen von bis zu 6% angegeben (57).

Um Wundheilungsstörungen vorzubeugen, sind neben Einhaltung der Hygienevorschriften durch das Personal und sterilen Vorgehen während der Operation, auch patientenbezogene Faktoren wie Nikotinkonsum, Alter oder Übergewicht von Bedeutung (58).

Angesichts der demografischen Entwicklung der Patientenstruktur mit immer älteren und morbideren Patienten ist deswegen davon auszugehen, dass Wundheilungsstörungen in Zukunft noch zunehmen werden.

Demnach ist es für den (gefäß-)chirurgischen Alltag unumgänglich eine möglichst optimale Wundheilung durch akkurates Vorgehen zu gewährleisten (59).

1.3 Oxidierte Cellulosematerialien

1.3.1 Aufbau und Eigenschaften von oxidierten Cellulosematerialien

Bei chirurgischen Eingriffen kommt es regelmäßig zu Blutungen unterschiedlichen Ausmaßes. So können etwa Kapillarblutungen in tieferen Gewebeschichten ebenso wie flächige Blutungen an Organoberflächen auftreten. In der Gefäßchirurgie ist eine häufige Komplikation die Entstehung von Stichkanalblutungen, beispielsweise bei Gefäßanastomosen.

Oxidierte Cellulose wird zur Therapie bzw. Vermeidung dieser Blutungen eingesetzt. Auch zur Prävention postoperativer Verwachsungen kommen diese Materialien zum Einsatz.

In der Behandlung von Wunden sowohl traumatischen als auch chirurgischen Ursprungs kommen schon seit der Antike Materialien auf Basis von Cellulose, wie beispielsweise Mullbinden, zum Einsatz. Darüber hinaus wurden und werden sie zur Blutungsstillung noch heute eingesetzt, wenn auch der Einfluss auf die Hämostase unbefriedigend ist (60).

Es wurde stets versucht die Eigenschaften der eingesetzten Materialien zu verbessern. Dabei entdeckten die amerikanischen Forscher Frantz und Clarke während der neunzehnhundertvierziger Jahre, dass sie durch das Begasen einer Baumwollmullbinde mit Nitrogen Dioxid ein für den menschlichen Organismus resorbierbares Material geschaffen hatten. Dieses wirkte blutstillend und veränderte zudem den pH-Wert der Umgebung (61).

Cellulose ist ein lineares Homopolymer aus aneinandergereihten Hydroglykose Einheiten, die über β -1,4 glykosidischen Bindungen miteinander verbunden sind. Jede dieser Hydroglykoseeinheiten enthält eine primäre und zwei sekundäre Hydroxylgruppen (62). Diese Hydroxylgruppen sind chemisch aktiv und können durch Oxidation zu Carboxylgruppen werden (63). Der Oxidationsprozess wird in *Abb. 2* schematisch verdeutlicht.

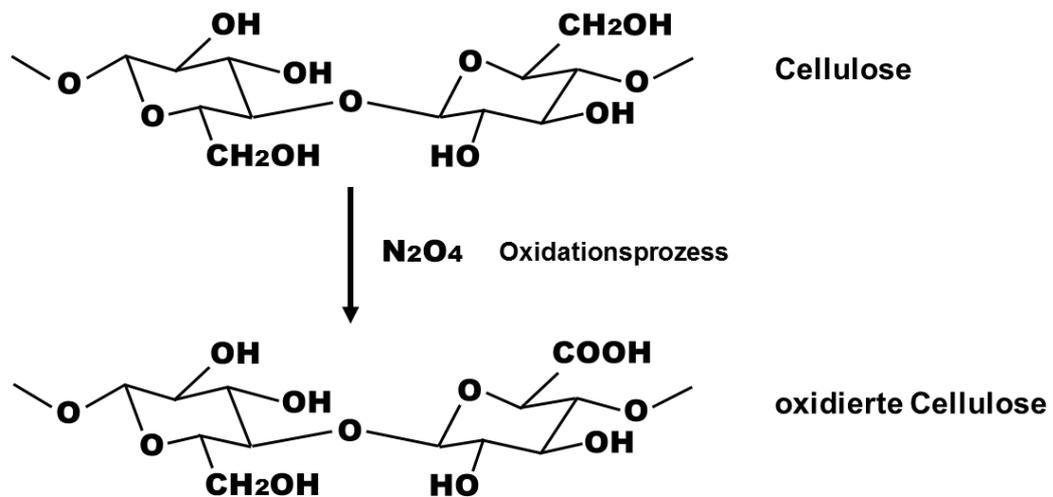


Abb. 2: Oxidation von Cellulose. Durch Begasung mit Distickstofftetroxid kommt es zur Umwandlung von Hydroxyl- in Carboxylgruppen. Dadurch wird der Polymerisationsgrad der Cellulose reduziert und die glykosidische Bindung geschwächt, sodass das Material depolymerisiert und anschließend hydrolysiert werden kann. Eigene Darstellung.

Je nachdem, welche Struktur die zu oxidierende Cellulose hat, spricht man entweder von oxidierter regenerierter Cellulose (ORC) oder oxidierter nicht-regenerierter Cellulose (ONRC). Der Unterschied beider Materialien besteht in stärker strukturierten und aufgereinigteren Fasern der regenerierten Form (62, 64).

Der Unterschied zwischen ORC und ONRC in ihrer Ultrastruktur wird in *Abb. 3* deutlich. Die Fasern der oxidierten regenerierten Form erscheinen dünner und weniger faserig. Auch das Webmuster ist feiner.

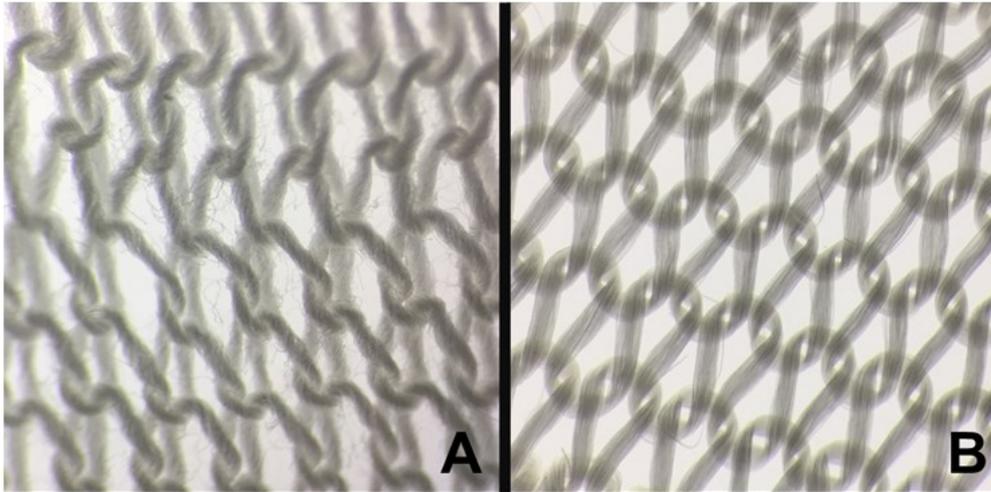


Abb.3: Mikroskopische Aufnahmen von oxidierter nicht-regenerierter Cellulose und oxidierter regenerierter Cellulose. ONRC (A) weist eine deutlich gröbere und faserigere Ultrastruktur auf als ORC (B). Die Aufnahmen zeigen die Materialien bei achtfacher Vergrößerung.

Hauptbestandteil oxidierter Cellulosematerialien ist Glukuronsäure, die das Ergebnis der Oxidation an den primären Hydroxylgruppen der Glukoseeinheiten ist. Die nicht-oxidierten Hydroxylgruppen bilden als Faseranteil den Rest. Der prozentuale Anteil der Carboxylgruppen ist annähernd gleich in beiden Materialien mit 16-24% in ONRC, bzw. 18-24% in ORC (62). Die Carboxylgruppen schwächen die Struktur der Cellulose und ermöglichen so die Biodegradation.

Diese Zusammensetzung ermöglicht es dem menschlichen Organismus oxidierte Cellulose abzubauen. Die Glukuronsäure wird über β -Eliminationsvorgänge durch Enzyme wie Glukosidasen depolymerisiert, während der faserige Anteil durch Makrophagen erst phagozytiert und anschließend hydrolisiert wird (65).

Der Zeitraum, in dem die Materialien komplett abgebaut sind, wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben, je nach verwendeter Menge und Umgebungsfaktoren. Von den kommerziellen Herstellern werden in der Regel Zeiträume von 7-14 Tagen angegeben. In wissenschaftlichen Arbeiten sind auch wesentlich längere Zeiträume von 30 Tagen bis hin zu 6 Wochen beschrieben, die tierexperimentell belegt wurden (66, 67).

Die im chirurgischen Kontext wichtigen Eigenschaften der oxidierten Cellulose ergeben sich aus dem Oxidations- bzw. Degradationsprozess.

Durch die freiwerdende Glukuronsäure kommt es zu einem Abfall des pH-Werts, der unter *in vitro* Bedingungen Werte um 2.5 erreichen kann (68). Durch diesen

pH-Wert Abfall wird ein bakterizides Milieu erzeugt, das protektiv gegen mögliche Infektionen wirkt. In zahlreichen Studien konnte eine gute Wirksamkeit gegenüber diversen Bakterienstämmen gezeigt werden (68-70).

Durch den pH-Wert-Abfall wird zudem eine blutstillende Wirkung erreicht. Es kommt zu einer unspezifischen Thrombozytenaggregation, die zur Bildung eines Thrombus führt (62). Zudem sorgt der niedrige pH-Wert für eine Kontraktion von kleinen Arteriolen und Venolen, wodurch die Blutstillung zusätzlich unterstützt wird (71). Es konnte darüber hinaus eine Aktivierung der intrinsischen Koagulationskaskade durch oxidierte Cellulose gezeigt werden, wobei hier vor allem Kalzium- und Natriumionen, die ebenfalls Bestandteil von Cellulosematerialien sind, eine Rolle zu spielen scheinen (72).

Neben der intraoperativen Blutstillung wird oxidierte Cellulose auch als Adhäsions- bzw. Verwachsungsbarriere eingesetzt, wobei die Effektivität sowohl im Tiermodell als auch im Menschen gezeigt werden konnte (73, 74).

Diese genannten Eigenschaften machen oxidierte Cellulose sowohl in regenerierter als auch in nicht-regenerierter Form zu einem beliebten und häufig verwendeten Material in fast allen chirurgischen Disziplinen. Die Tatsache, dass die Materialien bioabsorbierbar sind und damit nach Eingriffen *in situ* belassen werden können, vereinfacht zudem ihren praktischen Einsatz.

1.3.2 Oxidierte Cellulose und Wundheilung

In der Pathophysiologie der Wundheilung gilt es chronische Wunden von tiefen Gewebsdefekten, wie sie bei chirurgischen Eingriffen entstehen, zu unterscheiden.

Im vorherigen Kapitel wurden die antibakteriellen Eigenschaften von oxidierte Cellulose erläutert. Bakterielle Kontamination spielt nachweislich eine große Rolle bei der Entwicklung von Wundheilungsstörungen sowohl bei chronischen als auch tiefen Wundzuständen.

In Tiermodellen mit kontaminierten Wunden konnte ein positiver Effekt der oxidierten Cellulose auf die Rate von Wundinfekten mit Sepsis als Folge gezeigt werden (75).

Es ist davon auszugehen, dass die beschriebenen *in vitro*-Eigenschaften aus dem vorherigen Abschnitt teilweise auf den lebenden Organismus übertragen werden können. So verbesserte oxidierte Cellulose in vergleichenden

Tierversuchen das Überleben nach intravenös induzierter Sepsis bei Splenektomie und Aorteneingriffen (69, 76).

Doch neben der bakteriellen Besiedlung von Wunden von außen nehmen auch endogene Faktoren Einfluss auf die Wundheilung. So gelten vor allem in chronischen Wunden erhöhte Konzentrationen von Proteasen, inflammatorischen Zytokinen sowie ROS als verantwortlich für gestörte Heilungsabläufe. Es konnte gezeigt werden, dass oxidierte Cellulosematerialien in der Lage sind ROS zu binden und ihre Konzentration somit zu senken. Diese verursachen durch Protein- und Lipidoxidation sowie DNA-Schädigung Zellschäden (77).

Zudem scheinen die Materialien in der Lage zu sein Wachstumsfaktoren und regulative Proteine vor vermehrtem Abbau durch proteolytische Enzyme zu schützen, wodurch ein besseres Mikromilieu für die Wundheilung geschaffen wird (78).

In chronisch venösen Ulcera konnten durch Behandlung mit oxidierten Cellulose Materialien erniedrigte Spiegel von Elastase und Gelatinase im Wundsekret erreicht werden (79). Diese haben in hoher Konzentration einen verstärkten Abbau des Granulationsgewebes zur Folge.

Auch die Expression von MMP scheint durch das Einbringen von oxidierten Cellulose in Wunden verringert zu werden. Ein direkter Zusammenhang mit der Wundheilung konnte experimentell jedoch nicht festgestellt werden (80).

In Tierstudien konnte durch Behandlung mit oxidierten Cellulose eine verbesserte Re-Epithelialisierung von Wunden gezeigt werden (81).

Allerdings beschreiben nicht alle Studien einen für Wundheilungsvorgänge positiven Einfluss oxidierten Cellulose. So konnte etwa nachgewiesen werden, dass *in situ* belassene oxidierte Cellulose im Tiermodell eine starke ossäre inflammatorische Reaktion hervorruft, ähnlich einer Fremdkörperreaktion (82). Diese Studie zeigte zudem ein stark saures lokales Wundmilieu, was auch andere Autoren als negativ für den Wundheilungsprozess einstufen (60).

Des Weiteren existieren Berichte über Komplikationen wie Granulombildungen, die in Zusammenhang mit oxidierten Cellulose Materialien gesehen wurden. Ableitend ergab sich die Empfehlung, möglichst kleinen Mengen der Materialien zu verwenden (83).

Wiederum andere Studien fanden weder Vor- noch Nachteile beim Einsatz von oxidierte Cellulose am Patienten (66).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse über den Zusammenhang oxidierter Cellulose und der Wundheilung existieren. Während sich diverse Publikationen mit dem Einfluss auf chronische Wunden oder den antibakteriellen Eigenschaften beschäftigen, bleibt die unmittelbare Beeinflussung tiefer Gewebsdefekte weitestgehend unklar. Diese wäre jedoch, vor dem Hintergrund des Einsatzes der Materialien im chirurgischen Kontext, von Interesse.

1.4 Fragestellung und Aufbau der Arbeit

Obwohl oxidierte Cellulose schon seit Jahrzehnten ein fester Bestandteil der chirurgischen Praxis ist, stehen nach wie vor viele Fragen in Bezug auf die Wirkungsweise offen.

In dieser Arbeit wurden ORC und ONRC verwendet. Ein Vergleich dieser beiden Produkte hinsichtlich der Prozesse der Wundheilung *in vitro* ist bisher nicht beschrieben.

Es wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Wie verändern die Materialien das lokale pH-Niveau der Zellkulturen?
- Wie beeinflussen ORC und ONRC verschiedene für die Wundheilung tiefer Gewebsdefekte relevante Parameter, wie Wachstums-, Migrations- und das Kontraktionsverhalten von Fibroblasten?
- In wie weit sind etwaige Beobachtungen auf die pH-Wertveränderungen zurückzuführen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Oxidierte Cellulosematerialien

Es wurde TABOTAMP® Original der Firma Ethicon (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland, ORC; im Weiteren als Tabotamp geschrieben) und Resorba® Cell der Firma Resorba (RESORBA Medical GmbH, Nürnberg, Deutschland, ONRC; im Weiteren als Resorba Cell geschrieben) für die Versuche verwendet.

Beide Materialien sind als Hämostyptika für den Gebrauch am Menschen zugelassen.

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Absaugesystem Modell Vacusafe	Integra, Biebertal, Deutschland
Arbeitsbank Modell Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Brutschrank Modell HeraCell 240	Heraeus, Hanau, Deutschland
Culture-Insert 2 Well in μ -Dish 35 mm	Ibidi, München, Deutschland
Einfriermax	Nunc, Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Einmalhandschuhe	Ansell, Brussels, Belgien
Entsorgungsbeutel	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Falcon 15, 50 ml	Corning, New York, USA
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Stickstofflagerungstank -160 °C (Gasphase)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kosmetiktücher	Tapira, Heidenheim, Deutschland
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Lineal 30 cm	Sanford, Hamburg, Deutschland
Live Cycler Mikroskop Modell JuLi Br	NanoEnTek, Seoul, Korea
Mikroskop Modell CKX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Molecular Imager ChemiDoc™ MP System	Bio Rad, Hercules, USA
Multilabel Plate Reader Modell Victor X4	PerkinElmer, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Parafilm	Bemis Corporate, Neenah, USA
Petrischalen 35 x 10, 60 x 15 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
pH-Meter Modell FE20	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Pipetten Modell Research plus 0,5-10, 10-100, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Modell Easypet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Modell pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler Modell Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glasflasche 500 ml	Kavalierglass, Sázava, Tschechien
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Corning, New York, USA
Stereomikroskop Discovery V8	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
sterile Einwegspritze 10, 20 ml	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
sterile Kanüle 0,80 x 120 mm	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
sterile Pinzette	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
sterile Pipettenspitzen 10,100,1000 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland

sterile Schere	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
steriler Spatel	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
steriles Abdecktuch 45 x 75 cm	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Tube 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Wasserbad Modell Wine one	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wellplatten 12, 24, 96 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen T175, T75	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge Modell Heraeus Megafuge 40 R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DPBS Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's MEM (10 x)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ethanol 70 %, 96 %	Zentralapotheke Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland
fetales bovines Kälberserum (FCS)	PAN- Biotech, Aidenbach, Deutschland
Gentamycin 10 mg/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glutamine 200 mM	Biochrome, Berlin, Deutschland
Kalibrierungslösungen pH 7,01 / 4,01 / 10,01	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Kollagen Typ I, rat tail	Ibidi, München, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Biochrom, Berlin, Deutschland

Trypan Blau 0,4 %	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin 0,25 %	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellviabilitätsreagenz WST-1	Roche, Mannheim, Deutschland

2.1.4 Kulturmedien

Zellkulturmedium für Fibroblasten:

- 450 ml dd H₂O
- + 50 ml 10x DMEM
- + 14,6 ml NaHCO₃
- + 2,5 ml Gentamycin
- + 5 ml Glutamin 200 mM
- + 100 ml FCS

2.1.5 Zellkulturen

Es wurden ausschließlich normale, humane, dermale Fibroblasten (NHDF) eines adulten Spenders der Firma PromoCell (Heidelberg, Deutschland) für die Versuche verwendet.

2.1.6 Computerprogramme

Axio Vision LE64	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Endnote X7	Thomson Reuters, New York, USA
Graph Pad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
Image Lab	Bio Rad, Hercules, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft, Redmond, USA
Power Point 2016	Microsoft, Redmond, USA
WimScratch	Ibidi, München, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Anmerkungen

Gemäß den etablierten Standards für das sterile Arbeiten mit Zellen in Zellkultur wurden die Arbeiten stets unter einer dafür geeigneten Zellkulturarbeitsbank durchgeführt.

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor der Benutzung in einem Autoklav für 20 Minuten (min) bei 120 Grad Celsius (°C) mittels Wasserdampf sterilisiert bevor sie in die Zellkulturarbeitsbank eingebracht wurden.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Zellkulturen in einem Inkubator in folgender Atmosphäre bebrütet:

Temperatur	37 °C
Kohlenstoffdioxid- (CO ₂) Gehalt	5 %
Luftfeuchtigkeit	95 %

Verwendete Lösungen und Kulturmedien wurden bei 37 °C im Wasserbad vor der Benutzung erwärmt.

Um Zellpellets zu erstellen, wurden die entsprechenden Zellsuspensionen in einer Zentrifuge bei dreihundertfacher Erdbeschleunigung (*g*) für 5 min und 20 °C zentrifugiert.

2.2.1.2 Einfrieren der Zellkultur

Um Zellen zu konservieren wurden sie zunächst gelöst und gewaschen, wie in 2.2.1.5 beschrieben, anschließend gezählt, wie in 2.2.1.6 erklärt und in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen pro Milliliter (ml) aufgenommen. Die Zellen wurden herunterzentrifugiert (5 min bei 300 *g*) und in 1,5 ml gekühlten Einfriermedium (70 % Zellkulturmedium, 20 % fetalen Kälberserum (FCS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert und anschließend in Kryoröhrchen übertragen. Das DMSO verhinderte dabei die Bildung von Kristallen während des Einfriervorgangs. Anschließend wurde die Suspension in den Einfriermax

eingbracht und mittels Iso-Propanolol um 1 °C pro Minute kontrolliert heruntergekühlt und eingefroren. Am Folgetag konnten die Kryoröhrchen in den -195 °C Stickstoffgefrierschrank eingebracht werden.

2.2.1.3 Auftauen der Zellkultur

Die in der Gasphase vom flüssigen Stickstoff gelagerten Aliquots von jeweils 3×10^5 Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, bis das Zellpellet sich lösen ließ. Dieses wurde dann in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und anschließend für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sich am Boden des 15 ml Falcon befindlichen Zellen wurden in 10 ml vorgewärmten Kulturmedium aufgenommen und mehrfach resuspendiert. Im Anschluss wurde die Suspension in eine T75 Zellkulturflasche überführt und zur weiteren Kultivierung in den Inkubator gestellt.

2.2.1.4 Wechsel des Zellkulturmediums

Das Medium in den Zellkulturflaschen wurde alle zwei Tage gewechselt. Hierzu wurde das alte Medium mittels Pipette abgenommen und anschließend wurden die Zellen mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) einmalig gewaschen, um Rückstände zu entfernen. Anschließend wurde je nach Zellkulturflaschengröße die entsprechende Menge frischen Mediums in die Zellkulturflasche gegeben und die Zellen wieder in den Inkubator gestellt.

2.2.1.5 Zellkultivierung

Bei 70-80 prozentiger Konfluenz der Zellen wurde eine Zellpassage durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das alte Medium dekantiert, die Zellen einmalig mit 10 ml PBS gewaschen und dann 3 ml Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (1%) auf die Zellen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 1-2 Minuten im Brutschrank, gefolgt von 3-4 Minuten gleichmäßigem Klopfen per Hand. Durch diesen Vorgang lösten sich die Zell-Zell und Zell-Bodenkontakte, sodass anschließend abgerundete, einzelne Zellen vorlagen. Unter dem Lichtmikroskop konnte der Vorgang optisch kontrolliert werden. Um die enzymatische Reaktion zu beenden, wurde Zellkulturmedium in einem Verhältnis von eins zu vier hinzugegeben. Aufgrund des Anteils an FCS im Medium, das einen hohen Proteinanteil enthielt, kam es zu einer kompetitiven Konkurrenzsituation an der

Bindungsstelle des katalytischen Zentrums des Trypsins, wodurch eine weitere Proteolyse verhindert wurde.

Im Folgenden wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand verworfen, sodass lediglich das Zellpellet auf dem Boden des Röhrchens zurückblieb. Dieses Pellet wurde dann in Medium resuspendiert und konnte erneut in eine Zellkulturflasche ausgesät werden. Um eine kleinere Zellzahl pro Flasche zu erreichen wurde die Suspension auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt, diese mit der entsprechenden Menge Medium versetzt und weiter kultiviert.

2.2.1.6. Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl pro ml zu bestimmen, wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Zunächst wurden die Zellen, wie in 2.2.1.4 beschrieben, vom Flaschenboden abgelöst, gewaschen und zentrifugiert. Nachdem das so entstandene Zellpellet mehrfach resuspendiert worden war, konnten 30 µl entnommen und im Verhältnis 1:1 mit 30 µl Trypanblau gemischt werden. Da der Farbstoff die Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringen kann, werden diese auch nicht angefärbt und können so lichtmikroskopisch von abgestorbenen Zellen bzw. dem Hintergrund klar differenziert werden.

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 10 µl des Zellsuspension-Trypanblau-Gemischs unter den Objektträger der Zählkammer gegeben und anschließend unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in den vier Großquadranten der Zählkammer gezählt. Mit folgender Formel konnte anschließend die genaue Zellzahl pro ml bestimmt werden:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{4(\text{Anzahl der gezählten Quadrate})} * Vf * 10.000 \text{ (Kammerfaktor)}$$

Vf = Verdünnungsfaktor = hier: 2

2.2.2 pH-Wert-Bestimmung

2.2.2.1 Versuchsaufbau Ansätze in Zellkulturmedium

In eine 12-Wellplatte wurden 1×10^4 Zellen pro Well pipettiert und jedes Well anschließend auf 1,5 ml mit Kulturmedium aufgefüllt.

Nun wurden die Wellplatten im Inkubator bebrütet, sodass die Zellen am Boden des Wells anwachsen konnten.

Am nächsten Tag wurde das Medium abpipettiert und jedes Well mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml neues Medium hinzugefügt.

In den Kontrollansätzen ohne Zellen wurden ebenfalls 3 ml Medium in jedes Well einer neuen Wellplatte gegeben.

Gemäß den geplanten Ansätzen, wie in 2.2.2.4 beschrieben, wurden zum Start der Messungen entweder Tabotamp oder Resorba Cell in jeweils 1x1 cm großen Stücken den entsprechenden Wells mit Hilfe einer sterilen Pinzette zugesetzt.

Die 1x1 cm großen Stücke der oxidierten Cellulosematerialien wurden kurz zuvor auf einem sterilen Tuch unter der Sicherheitsbank unter Zuhilfenahme einer sterilen Schere, einer sterilen Pinzette und eines sterilen Lineals zurechtgeschnitten und in sterilen Petrischalen, getrennt nach Material aufbewahrt, wie *Abb. 4* zeigt.

Aus Gründen der Praktikabilität erfolgten die Messungen in zwei zeitlich nacheinander stattfindenden Messreihen, wobei eine Messreihe für jede Versuchsgruppe jeweils 6 Wells umfasste.

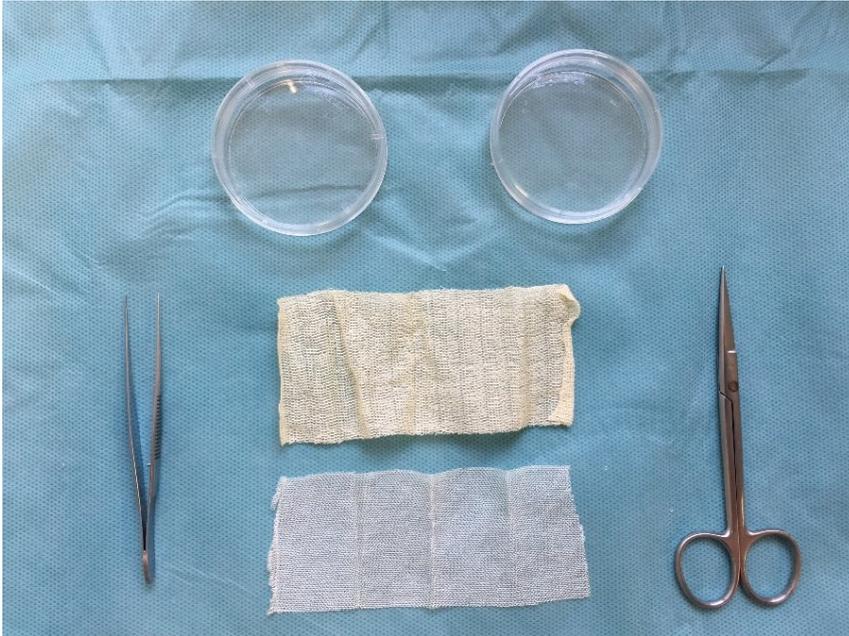


Abb. 4: Vorbereitung der oxidierten Cellulosematerialien. Die beiden Materialien, oben Resorba Cell, unten Tabotamp, werden unter sterilen Bedingungen in 1x1 cm messende Quadrate geschnitten. Im Anschluss werden sie in sterilen Petrischalen bis zur Verwendung im Versuch aufbewahrt.

2.2.2.2 Versuchsaufbau Ansätze in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung

In den Ansätzen, in denen anstatt Nährmedium eine isotonische (0,9 %) Natriumchlorid (NaCl)-Lösung verwendet wurde, wurden zunächst ebenfalls pro Well 1×10^4 Zellen, wie in 2.2.2.1 beschrieben ausgesät und inkubiert. Allerdings wurde nun nach dem Waschen mit PBS 3 ml 0,9 % NaCl-Lösung in jedes Well pipettiert.

Die weiteren Vorbereitungsschritte bis zur Messung entsprachen denen in 2.2.2.1.

2.2.2.3 Versuchsaufbau Ansätze mit gesäuertem Zellkulturmedium

Die durch die pH-Messung dokumentierten pH-Wertentwicklungen dienten als Grundlage dafür, ein Kulturmedium zu erstellen, in dem ein annähernd gleiches pH-Milieu vorlag, wie in den Ansätzen mit oxidierten Cellulose.

Ziel war es dabei, ein Medium mit den jeweils niedrigsten pH-Werten, die durch die Materialien erzeugt werden konnten, zu erstellen. Um Kulturmedien mit dem Ziel pH-Wert 7,0 bzw. 6,6 zu erhalten, musste das normale Kulturmedium mittels Salzsäure (HCl) auf ein niedrigeres pH-Wert-Niveau eingestellt werden. Um spätere pH-Wert-Schwankungen zu vermeiden, wurden zunächst 50 ml

normales Kulturmedium in eine T75 Zellkulturflasche pipettiert und über Nacht in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. In dieser Zeit konnte sich das Medium mit CO₂ aufsättigen. Danach wurden dem Medium 90 µl 5 molare (M) HCl zugesetzt um es erneut über Nacht zu inkubieren, wodurch der pH-Wert auf 7,0 abfiel. Anschließend konnte das Medium für die entsprechenden Versuche auf die Zellen gegeben werden. Um das Kulturmedium mit pH-Wert 6,6 zu erstellen, wurden ebenfalls 50 ml Kulturmedium, wie vorgehend beschrieben, für 24 h in den Brutschrank gestellt. Allerdings wurden im Anschluss daran 21 ml in eine Petrischale gegeben und mit 76,5 µl 5M HCl angesäuert. Dieser Schritt war nötig, um eine größere Diffusionsfläche zwischen dem Medium und der Atmosphäre im Brutschrank zu schaffen. Nach weiterer Inkubation über Nacht konnte das so hergestellte Medium mit pH-Wert 6,6 auf die Zellen gegeben werden.

Die jeweils eingestellten pH-Werte wurden vor Verwendung erneut mittels pH-Meter kontrolliert.

2.2.2.4 Übersicht der Versuchsgruppen

Es wurden die in *Tabelle 1* aufgeführten Ansatzgruppen mit je 12 Wells pro Versuchsreihe vorbereitet.

Tabelle 1: Übersicht über die Ansatzgruppen für die pH-Messung.

Mit Zellen	Ohne Zellen	Mit Zellen	Ohne Zellen
Medium	Medium	NaCl	NaCl
Medium + Tabotamp	Medium + Tabotamp	NaCl + Tabotamp	NaCl + Tabotamp
Medium + Resorba Cell	Medium + Resorba Cell	NaCl + Resorba Cell	NaCl+ Resorba Cell
Medium angesäuert pH-Wert 7.0		Medium angesäuert pH-Wert 6.6	

2.2.2.5 Durchführung der Messung

Die Messung erfolgte über einem Zeitraum von 14 Tagen, wobei während der ersten 6 h stündlich und im Anschluss darauf nach 12 h, 24 h, 48 h und anschließend alle 48 h gemessen wurde. Vor Beginn jeder Messreihe wurde die Sonde mittels Pufferlösungen kalibriert, um eine möglichst genaue Ermittlung des pH-Wert zu erreichen.

Die Messung begann nachdem die oxidierten Cellulosematerialien in das entsprechende Well eingebracht worden waren. Hierzu wurde die Messsonde des pH-Meter in das Medium bzw. NaCl getaucht ohne dabei den Boden des Wells zu berühren.

Nach erfolgreicher Messung eines Wells wurde die Sonde mit sterilem Wasser gesäubert und mit einem sterilen Tuch getrocknet. Daraufhin konnte die nächste Messung erfolgen. Dieser Schritt war nötig, um einer etwaigen Kontamination der Kulturmedien durch Pilze oder Bakterien sowie einer Verunreinigung und Durchmischung der Proben untereinander vorzubeugen.

Die ermittelten Werte wurden in eine Tabelle überführt.

In der Zeit zwischen den Messzeitpunkten wurden die Wellplatten in den Inkubator gestellt, um eine möglichst optimale Atmosphäre für die Zellen zu erhalten. Auch in den Ansätzen ohne Zellen wurde, der Vergleichbarkeit halber, so verfahren.

2.2.3. Zellviabilitätsassay

2.2.3.1. Versuchsaufbau

Um den Einfluss der oxidierten Cellulosematerialien auf das Zellwachstum der Fibroblasten zu untersuchen, wurden zunächst in jedes Well einer 12-Wellplatte 4×10^3 Zellen ausgesät und jedes Well auf 3 ml mit Medium aufgefüllt. Diese geringere Zellzahl erlaubte ein mögliches Wachstum über 14 Tage, da den Zellen so ausreichend Platz zur Verfügung stand. Daraufhin wurden die Wellplatten über Nacht inkubiert, sodass die Zellen sich absetzen und am Boden der Wells adhärent werden konnten. Am nächsten Tag wurde das alte Medium entfernt, jedes Well mit sterilen PBS gewaschen und im Anschluss in jedes Well 3 ml frisches Medium (pH-Wert 7,0 oder 6,6) gegeben.

Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, wurden für weitere Ansätze 1x1 cm große Stücke Tabotamp bzw. Resorba Cell vorbereitet und verwendet.

Im Anschluss daran wurden die Wellplatten, jeweils 12 Wells pro Versuchsgruppe, bis zu den Messzeitpunkten nach 7 bzw. 14 Tagen in den Inkubator gestellt.

Zudem wurde eine Zellreihe ausgesät mit je 6 Wells der gleichen Zellzahl aus der gleichen Zellpassage. Für die Zellreihe wurden so jeweils sechsmal 1×10^3 / 2×10^3 / 4×10^3 / 8×10^3 / 1×10^4 / 2×10^4 / 3×10^4 / 4×10^4 / 5×10^4 und 1×10^5 Zellen in 3 ml Suspension in die Wellplatten eingebracht.

2.2.3.2. Assayprinzip und Auswertung

Um die Zellzahl pro Well zu messen, wurden 10 % des Gesamtvolumens in jedem Well entnommen und durch das gleiche Volumen an water soluble tetrazolium (WST)- Reagenz ersetzt.

Um ein möglichst genaues Verhältnis von Medium zu Reagenz zu erhalten, wurde zunächst das Medium jedes Wells in eine neue 12 Wellplatte umpipettiert. Anschließend wurden jeweils 450 μ l des gleichen Medium wieder in das ursprüngliche Well zurückpipettiert. Unmittelbar danach wurden jedem Well 50 μ l WST-Reagenz hinzugefügt. Diese Menge an Medium war ausreichend, um den Boden der Wells mit den Zellen darauf komplett zu bedecken.

Im Anschluss wurden die Wellplatten erneut für 2 h im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit konnten die Mitochondrien lebender Fibroblasten mit Hilfe ihres Dehydrogenasen System, das leicht rötliche Tetrazoliumsalz in den wasserlöslichen, dunkelroten Farbstoff Formazan umwandeln. Dieser Vorgang ist in *Abb. 5* schematisch verdeutlicht.

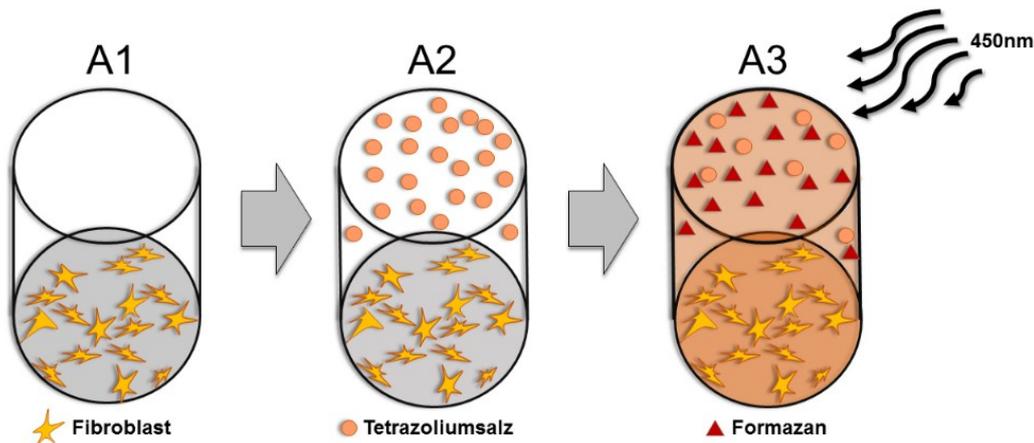


Abb. 5: Schemazeichnung des Zellviabilitätsassay. Die vitalen Fibroblasten nehmen das Tetrazoliumsalz aus dem Überstand auf. Im Anschluss wandeln ihre Mitochondrien es während der Inkubation zu wasserlöslichen Formazan um. Nun kann die Extinktionsmessung bei 450 Nanometer (nm) durchgeführt werden. Eigene Darstellung.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Wellplatten für 3 min bei 500 Runden pro Minute (rpm) mit einem Schüttler bewegt, um eine gleichmäßige Verteilung des Formazans im Überstand zu gewährleisten.

Nun wurden jedem Well 100 µl des Überstands entnommen und in eine 96 Wellplatte überführt. Diese wurde dann spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert.

Die Absorption bei 450 nm wurde, unter Hinzunahme der gemessenen Werte der Zellreihe anhand einer Standardkurve, in absolute Zellzahlen umgerechnet. Bei größeren Zellzahlen wird mehr Formazan zu Tetrazoliumsalz umgewandelt, wodurch somit Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der Zellen gemacht werden können.

2.2.4 Kontraktionsassay

2.2.4.1 Versuchsaufbau/Erstellen der Matrizen

Für den Kontraktionsassay wurde zunächst eine Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 3×10^6 Zellen/ml vorbereitet.

Im Anschluss wurde nach dem vom Hersteller vorgegebenen Versuchsprotokoll gearbeitet.

Zunächst wurden sämtliche nötigen Substanzen 10 Minuten vor Beginn auf Eis gekühlt und dann anschließend in der unten gelisteten Reihenfolge in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert.

Um eine finale Kollagen I Konzentration von 1,5 μl in einer Matrix zu erreichen, wurden die in *Tabelle 2* aufgeführten Substanzen und Volumina verwendet.

Tabelle 1: Materialien und Mengenangaben für eine Kollagen I Matrix. Die hier aufgeführten Materialien wurden vor Versuchsbeginn für 10 Minuten auf Eis gekühlt und in der aufgeführten Reihenfolge nacheinander in ein Eppendorf Tube pipettiert.

Substanz	Volumen in μl
10x DMEM	20
NaOH 1M	5
H ₂ O	81
NaHCO ₃ 7,5 %	4
Nährmedium	50
Kollagen I, 5 mg/ml	90
Zellsuspension (3x10 ⁶ Zellen/ml)	50
Σ	300

Anschließend wurden jeweils 300 μl des Gemisches in die Wells einer 24 Wellplatte gegeben.

Die Platte wurde für 30 min inkubiert (37 °C, 5 % CO₂), sodass die Matrizen auspolymerisieren konnten.

Im Anschluss wurden jedem Well 2 ml Nährmedium hinzugefügt. Je nach Versuchsgruppe wurden nun Tabotamp und Resorba Cell Stücke von 1x1 cm vorbereitet und, wie bereits in 2.2.2.1 beschrieben, den Wells hinzugegeben.

Als Kontrollen diente Kulturmedium ohne Zugabe von Cellulose sowie Kulturmedium mit einem pH-Wert von 7,0 bzw. pH-Wert 6,6.

Im Anschluss wurden die Matrizen für 24 h in den Brutschrank gestellt, sodass sie sich festsetzen und in der Vertikalen kontrahieren konnten.

Nach 24 h wurden die Matrizen vorsichtig mit einem sterilen, abgerundeten Spatel vom Boden gelöst. Unmittelbar nach dem Ablösen wurde ein Foto zum Festhalten des Ausgangsumfangs der Matrizen geschossen.

Im Anschluss wurden die Wellplatten wieder für 24 h inkubiert, woraufhin eine weitere Dokumentationskontrolle erfolgte. Die Dokumentation wurde nach 48 h Inkubation wiederholt.

Abbildung 6 zeigt schematisch den Ablauf der Kontraktion.

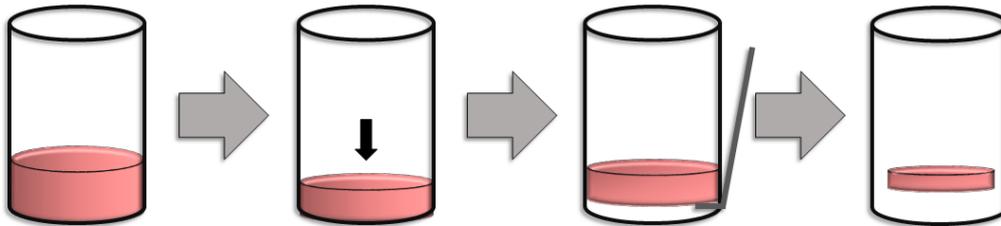


Abb. 6: Kontraktionsassay-Prinzip. Zunächst wird die Kollagen I Matrix für 24 h inkubiert, sodass sie sich in der Vertikalen durch entstehende Spannkraften kontrahieren kann. Anschließend wird die Matrix mittels eines Spatels gelöst und kann sich nun, frei schwimmend, in den nächsten 48 h auch in der Horizontalen kontrahieren. Eigene Darstellung.

2.2.4.2 Fotodokumentation

Für die Fotodokumentation zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h nach Ablösen der Matrizen, wurden die Wellplatten zentral unter die Kamera des ChemiDoc MPs positioniert und mit einer Vergrößerung von 12,3 x 9,2 abfotografiert. Das Bild wurde anschließend durch das Programm Image Lab geöffnet und mit Graustufenfiltern angepasst, sodass die Matrizen gut sichtbar wurden.

Dabei wurden folgende Bildeinstellungen festgesetzt: High: 65535, Low: 51765, Gamma 1,18. Die auf diese Weise abgelichteten Matrizen, wie in *Abb. 7* zu sehen, konnten anschließend vermessen werden.

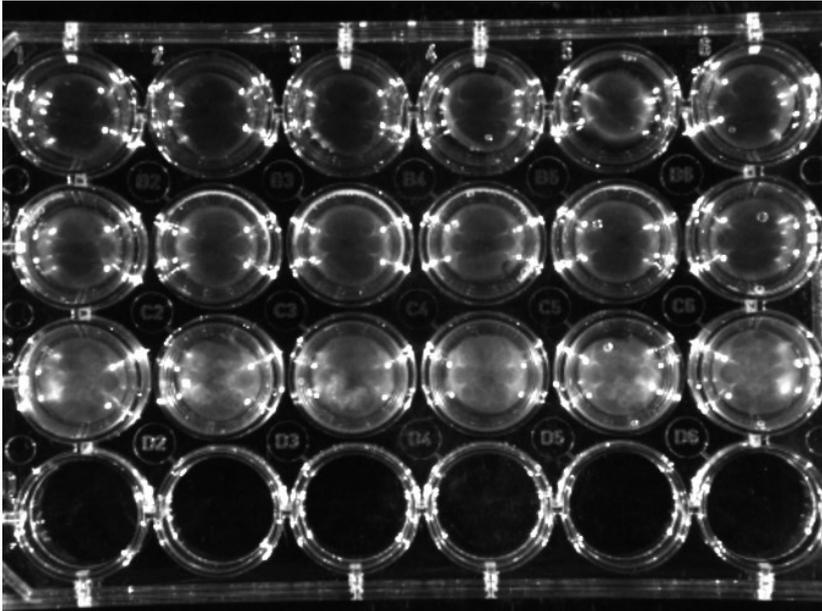


Abb. 7: Fotodokumentation von Kollagen I Matrizen mit enthaltenen Fibroblasten. In der oberen Reihe lediglich mit Zellmedium, in der zweiten Reihe mit zugesetztem Tabotamp und in der dritten Reihe mit zugesetztem Resorba Cell. Die letzte Reihe ist leer. Die Aufnahme zeigt die Matrizen 24 h nach Lösen vom Wellboden, aufgenommen mittels ChemiDoc MP bei einer Vergrößerung von 12,3 x 9,2.

2.2.4.3 Ausmessen der Matrizen

Um die Größenveränderungen der Matrizen im Zeitverlauf zu bestimmen, wurde als Parameter die Fläche jeder einzelnen Matrix gemessen. Dafür wurde mithilfe des Programms *AxioVision* jede einzelne Matrix in Pixel ausgemessen. Um diese Werte in Quadratmillimeter (mm^2) umrechnen zu können, wurden die Wells einer leeren 24 Wellplatte vermessen und mithilfe der Flächenangaben des Herstellers auf die Pixelwerte umgerechnet. Der so erhaltene Umrechnungsfaktor diente als Grundlage für die Berechnung der Flächen der Matrizen zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Die ermittelten Werte wurden tabellarisch erfasst und mithilfe des Programms *Graph Pad Prism* grafisch und statistisch aufgearbeitet.

2.2.5 Migrationsassay

2.2.5.1 Versuchsaufbau

Für den Migrationsassay wurde zunächst eine Zellsuspension mit $3,5 \times 10^3$ Zellen erstellt. Aus dieser wurden 70 μl in die zwei Kammern des μ -dish culture insert

pipettiert und anschließend für 24 h im Brutschrank inkubiert, sodass sich die Zellen am Boden absetzen konnten. Im Anschluss wurde das Kammersystem vorsichtig mit einer sterilen Pinzette vom Boden der Petrischale gelöst und diese mit 2 ml Kulturmedium aufgefüllt, in den entsprechenden Ansätzen wurde Medium mit erniedrigtem pH-Wert verwendet. Auf dem Boden der Petrischale blieben somit zwei mit Zellen besiedelte Kompartimente von 0.22 Quadratzentimeter (cm²) zurück. Dazwischen blieb ein 500 Mikrometer (µm) (+/- 50 µm) breiter, zellfreier Spalt, über den die Zellen in den folgenden 24 h aufeinander zuwanderten.

Je nach Ansatzgruppe wurden der Petrischale nun 1x1 cm große Stücke oxidierter Cellulose hinzugefügt.

2.2.5.2 Dokumentation

Unmittelbar nach den in 2.2.5.1 genannten Schritten wurden die Petrischalen unter einem Live Cell Mikroskop positioniert, wobei das Mikroskop über die gesamte Zeit im Brutschrank (37 °C / 5 % CO₂) stand.

Es wurde eine zehnfache Vergrößerung festgesetzt und eine Einstellung gewählt, bei der zentral der Spalt zwischen den beiden Seiten des Zellteppichs zu sehen war. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 24 h jede Stunde ein Bild angefertigt. Auf diese Weise wurde das Migrationsverhalten der Zellen dokumentiert.

2.2.5.3 Bildauswertung

Die so entstandenen Bilder wurden mithilfe der WimScratch Software ausgewertet, welche die mit Zellen überwachsene Fläche in jedem Bild erkannte und markierte. Somit konnte berechnet werden wie viele Prozent der im Bild sichtbaren Fläche mit Zellen bedeckt waren.

Abb. 8 zeigt exemplarisch wie der Versuch fotodokumentiert und ausgewertet wurde.

Die Ergebnisse wurden mithilfe von GraphPad Prism 5.0 grafisch und statistisch aufgearbeitet.

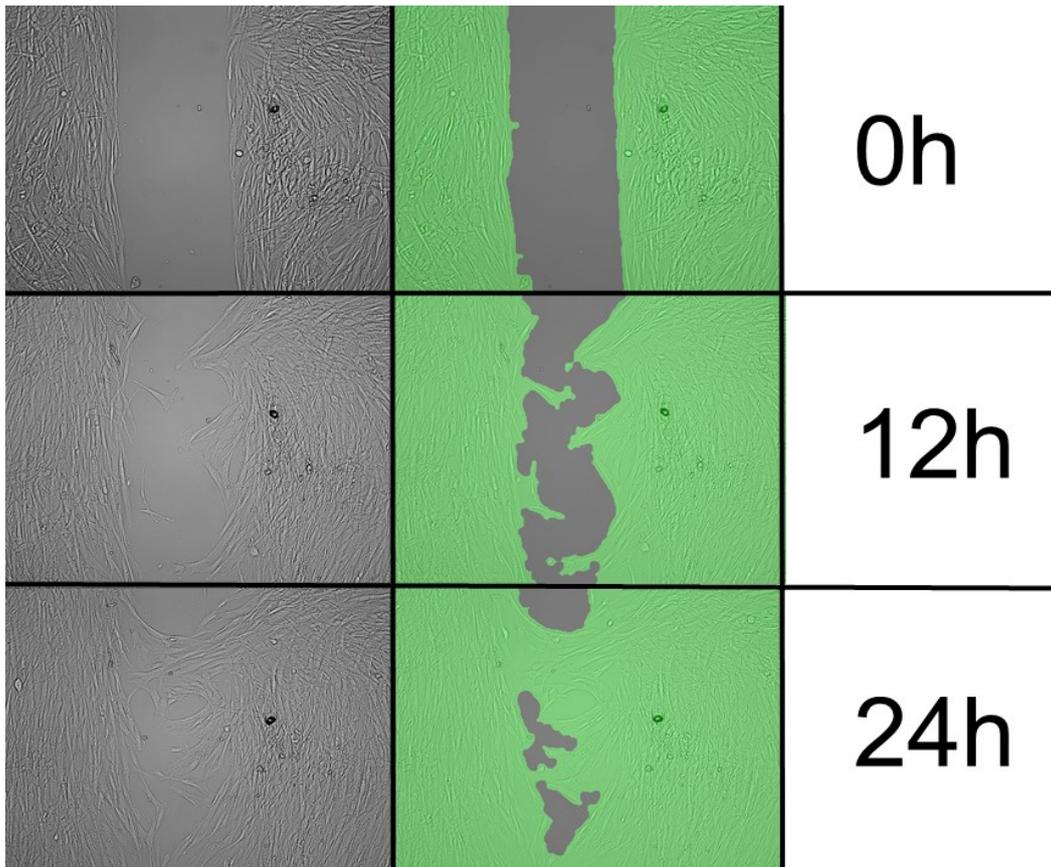


Abb. 8: Dokumentation des Migrationsverhaltens der Fibroblasten. Die Zellen sind zum Anfang der Messung in zwei Kompartimenten durch einen 500 μm breiten Spalt voneinander getrennt. In den folgenden 24 h wachsen sie zusehends aufeinander zu, wobei die prozentual zellfreie Fläche abnimmt. In der Mitte sieht man die entsprechenden Markierungen durch das Programm, wodurch die mit Zellen bedeckte Fläche berechnet werden kann. Anschließend können vergleichende Aussagen bezüglich des Migrationsverhaltens der Zellen unter Einfluss der oxidierten Cellulosematerialien gemacht werden. Die Aufnahmen entstanden mittels eines Live Cyclers Mikroskops bei zehnfacher Vergrößerung.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse pH-Messung

3.1.1 pH-Messung mit Zellkulturmedium

Zunächst wurde der pH-Wert über 14 Tage in Ansatzgruppen zu je 12 Wells mit einer initialen Zelldichte von 1×10^4 Zellen pro Well gemessen. Den Kontrollgruppen wurden je 3 ml Nährmedium, in den Gruppen mit oxidiertes Cellulose zusätzlich entweder ein 1x1 cm großes Stück Tabotamp oder Resorba Cell unmittelbar vor Beginn der Messung, zugesetzt.

Es zeigte sich, dass es in den Kontrollgruppen innerhalb der ersten 3 h zu einem Anstieg des pH-Wertes bis $8,07(\pm 0,053)$ kam.

Im Verlauf fiel der pH-Wert wieder ab, um nach 12 h ein relativ konstantes Niveau von $7,7(\pm 0,053)$ zu erreichen.

In den Untersuchungsgruppen mit Tabotamp ließ sich anfangs ein pH-Wert-Abfall bis auf Werte um $7,2(\pm 1,0)$ beobachten. Ein weiterer Abfall konnte innerhalb der ersten Stunde bis auf Maximalwerte um $7,04(\pm 0,08)$ beobachtet werden. Im weiteren Verlauf kam es zu einem stetigen Anstieg der pH-Werte auf bis zu $7,6(\pm 0,195)$. Nach ca. 24 h verblieben die pH-Werte auf einem konstanten Niveau um pH $7,5(\pm 0,028)$.

Der stärkste Abfall des pH-Wertes ließ sich in der Gruppe mit zugesetztem Resorba Cell beobachten. Hier sanken die pH-Werte in den ersten 4 h kontinuierlich bis $6,64(\pm 0,218)$ ab, um sich im Anschluss den pH-Werten der beiden anderen Gruppen anzunähern ($7,1(\pm 0,147)$). Auch hier wurde in der Folge ein relativ konstantes Niveau erreicht.

Die pH-Wert-Entwicklung über die Zeit ist grafisch und statistisch in *Abb. 9* aufgearbeitet. Zur besseren Übersicht wurden die Ansätze ohne Zellen nicht gezeigt.

In den Ansätzen bei denen keine Zellen in die Wells eingebracht worden waren, entwickelten sich die pH-Werte vergleichbar jenen mit Zellen. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen beobachten.

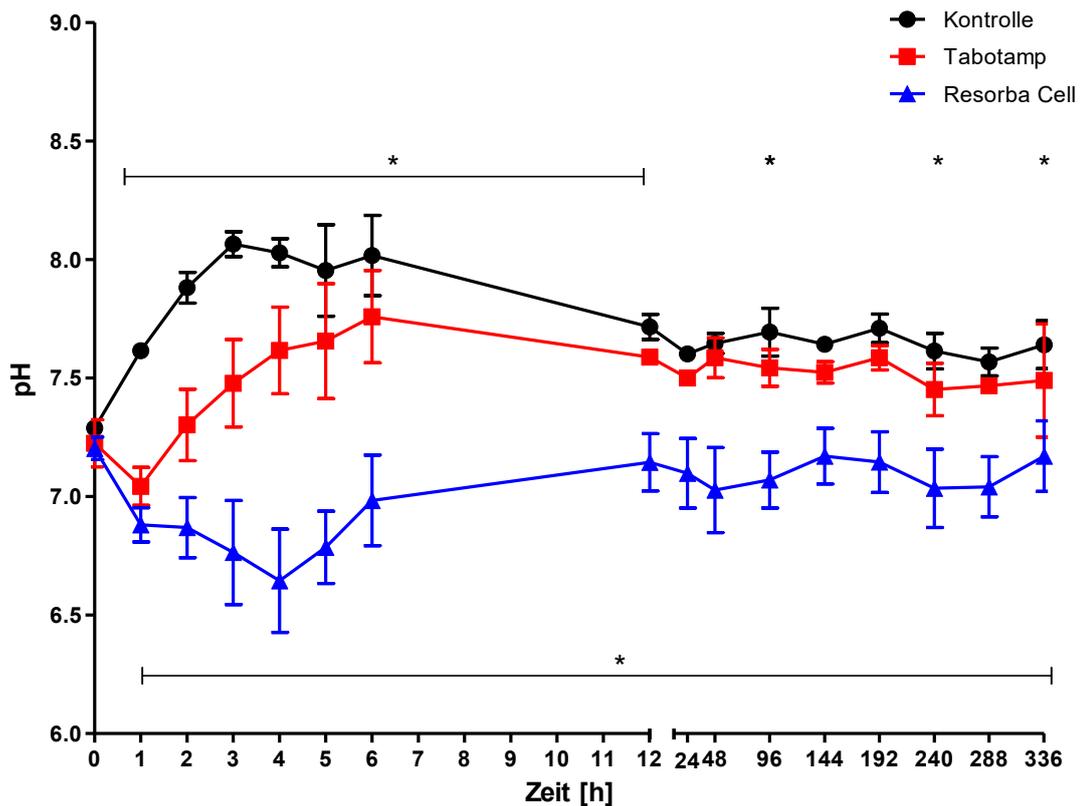


Abb. 9: pH-Wert-Entwicklung über 14 d mit zugesetzter oxidierter Cellulose. Nach initialem pH-Wert-Abfall in beiden Gruppen mit oxidierter Cellulose gleichen sich die Werte in der Gruppe mit Tabotamp im Verlauf zusehends denen der Kontrollgruppe an. Ansätze mit Resorba Cell nehmen einen konstant saureren Verlauf, wobei der anfängliche pH-Wert-Abfall deutlicher ausgeprägter ist. Signifikante Unterschiede zwischen Resorba Cell/Tabotamp und Kontrollen sind unterhalb der Graphen aufgetragen, signifikante Unterschiede zwischen der Tabotamp- und Kontrollgruppe oberhalb der Graphen. *p-Wert (p) < 0,05; one-way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

3.1.2 pH-Messung mit 0,9 % NaCl-Lösung

Da das Kulturmedium Zusätze mit Pufferkapazität enthält (bovines Kälberserum) wurden die Versuche zudem mit Ansatzgruppen durchgeführt, denen statt Nährmedium 0,9 % NaCl-Lösung zugesetzt worden war. Auch hier wurden die oxidierten Materialien hinzugegeben.

In ersten Versuchen zeigte sich, dass den Zellen in NaCl sämtliche Nährstoffe fehlen und sie rasch in Apoptose übergehen, sodass in folgenden Ansätzen auf vorherige Zellaussaat in die Wells verzichtet wurde.

Wie aus *Abb. 10* hervorgeht, lässt sich ein pH-Wert-Abfall in beiden Gruppen mit oxidierter Cellulose feststellen.

Die pH-Werte sanken bis auf Tiefstwerte um 2,4(+/-0,01) bei Resorba Cell bzw. 2,5(+/-0,082) bei Tabotamp.

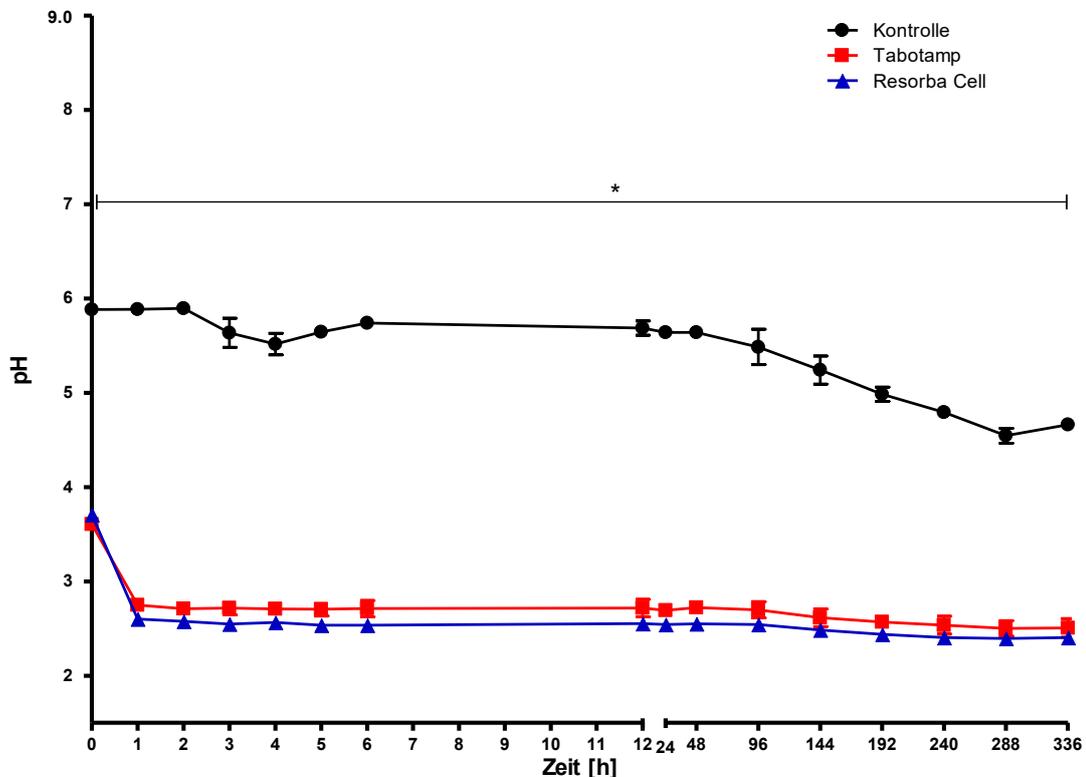


Abb. 3: pH-Wert-Entwicklung mit NaCl. Es zeigt sich ein stark ausgeprägter initialer pH-Wert-Abfall ins saure Milieu, sobald die oxidierten Cellulosematerialien zugesetzt werden. Im Anschluss bleibt das pH-Niveau konstant. Dabei zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Materialien untereinander, wohl aber für beide Materialien gegenüber der Kontrollgruppe. * $p < 0,05$; one-way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

3.1.3 pH-Messung mit angesäuertem Zellkulturmedium

In folgenden Versuchen wurde versucht, den möglichen Einfluss von Tabotamp und Resorba Cell auf Fibroblasten unabhängig von der pH-Wert-Entwicklung zu beurteilen. Dafür wurden Kulturmedien benötigt, in denen die pH-Wert-Entwicklung über die Zeit möglichst exakt der in den Versuchsgruppen entspricht. Ziel war es, die durchschnittlich tiefsten pH-Werte der jeweiligen Gruppen zu erreichen und zu halten.

In vorbereitenden Versuchen zur Dosisfindung an HCl, die dem Medium zugesetzt werden musste, wurde schließlich ein pH-Wert-Verlauf erreicht, der dem der Versuchsgruppen mit Tabotamp und Resorba Cell weitestgehend entsprach. Somit wurde ein Medium auf einen initialen pH-Wert von 7,0 für den

Vergleich mit den Tabotamp Gruppen und ein Medium mit pH-Wert 6,6 zum Vergleich mit den Resorba Cell Gruppen erstellt. Dabei wurden 10 % Abweichung pro Messzeitpunkt von der entsprechenden Gruppe mit oxidierte Cellulose akzeptiert.

Wie Abb. 11 zu entnehmen ist, wurden nur an zwei Messzeitpunkten in der Gruppe mit Medium pH 7,0 höhere pH-Werte gemessen als in der zu vergleichenden Gruppe (7,26(+/-0,021) zu 7,04(+/-0,08) nach 1 h und 7,37(+/-0,031) zu 7,30(+/-0,15) nach 2 h).

In der Gruppe mit Medium pH 6,6 kam es zu einem leichten Anstieg des pH-Werts auf ein höheres Niveau der zu vergleichenden Gruppe. Den größten Unterschied markierte hierbei der Messzeitpunkt nach 4 h, an dem die Versuchsgruppe mit Resorba Cell pH-Werte von 6,65(+/-0,218) aufwies im Vergleich zu 7,06(+/-0,04) in der Versuchsgruppe mit Medium 6,6. Im Verlauf gleichen sich die Werte jedoch wieder an.

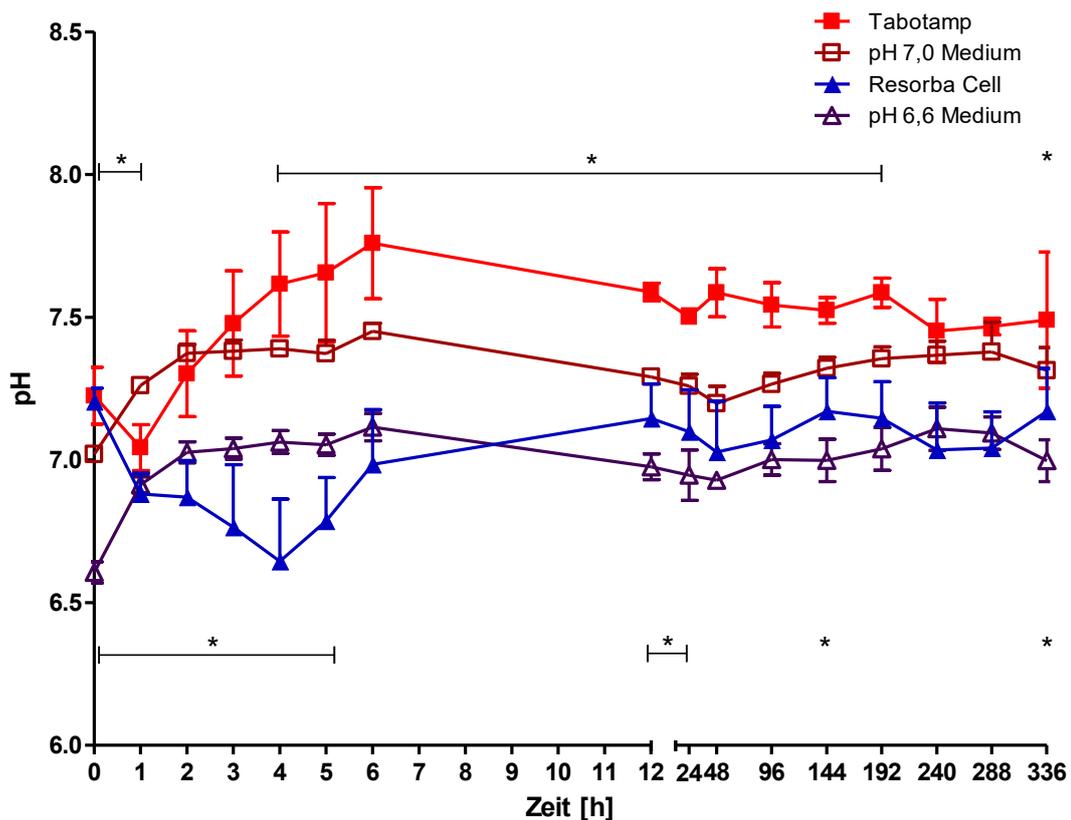


Abb. 4: pH-Wert-Entwicklung des angesäuerten Kulturmediums. Die durch die oxidierten Cellulosematerialien erzeugten Werte können überwiegend nachgebildet werden und erreichen über einen Großteil der Messzeitpunkte sogar ein minimal saureres Niveau. Dabei sind signifikante Unterschiede zwischen Tabotamp und dem pH-Wert 7,0 Medium über dem Graphen und Unterschiede zwischen Resorba Cell und pH-Wert Medium 6,6 unter dem Graphen aufgetragen. * $p < 0,05$; one-way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

3.2 Ergebnisse Zellviabilitätsassay

3.2.1 Zellwachstum in Zellkulturmedium

Um den Einfluss der oxidierten Cellulosematerialien auf das Zellwachstum zu messen, wurden 4×10^3 Zellen pro Well in 12 Wellplatten ausgesät und die Zellzahl zu den Zeitpunkten 7 und 14 Tage mithilfe des WST-1 Assay gemessen. Es zeigte sich, dass in den Ansätzen mit Tabotamp sowie Resorba Cell, stets eine signifikant geringere Zellzahl zu allen Messzeitpunkten errechnet werden konnte. Hierbei war auffällig, dass in den Ansätzen mit Tabotamp höhere Zellzahlen errechnet wurden, als in jenen mit Resorba Cell. Hier sank die Zellzahl zwischen Tag (d) 7 und 14 sogar leicht ab.

Zur übersichtlicheren Darstellung wurde anhand der errechneten Werte zu den Zeitpunkten nach 7 und 14 Tagen das durchschnittliche Zellwachstum pro Tag für die erste (0-7 Tage) und zweite Woche (7-14 Tage) berechnet. *Abb. 12* stellt die Ergebnisse schematisch dar.

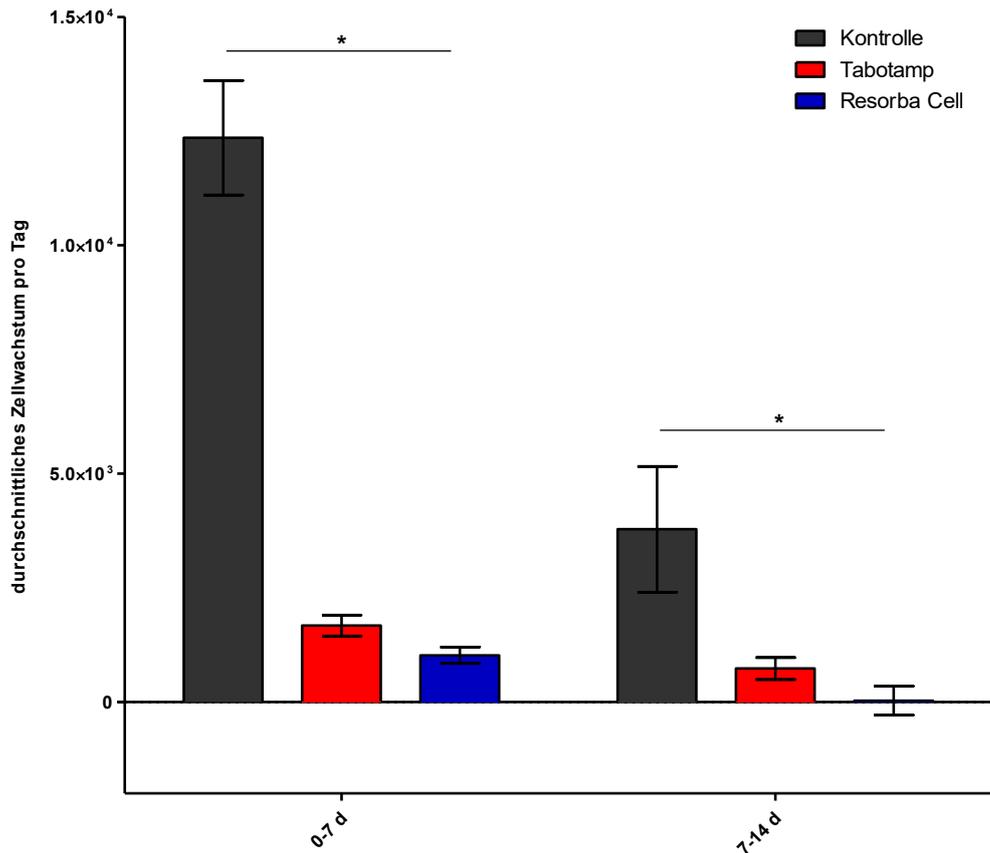


Abb. 5: Durchschnittliches Zellwachstum pro Tag in den Zeiträumen zwischen d 0-7 und d 7-14. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppen und den Gruppen mit oxidiertes Cellulose, wobei Ansätze mit Resorba Cell weniger Zellwachstum aufwiesen als Ansätze mit Resorba Cell. * $p < 0,05$; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Test.

3.2.2 Zellwachstum in angesäuertem Zellkulturmedium

Um Rückschlüsse ziehen zu können, ob die beobachteten Zellzahlveränderungen lediglich ein Resultat der pH-Wert-Erniedrigung waren (Siehe Kapitel 3.1.1), oder auch eine pH-Wert unabhängige Hemmung des Zellwachstums aus dem Einbringen der Materialien resultierte, wurden die Zellviabilitätsassays mit Kulturmedien der pH-Werte 7,0 bzw. 6,6 wiederholt.

Auch hier wurden die Zellzahlen zur vereinfachten Darstellung in das durchschnittliche Wachstum zwischen Tag 0 bis 7 und Tag 7 bis 14 umgerechnet. Im Vergleich zur Gruppe mit pH-Wert verändertem Medium (pH 7,7) zeigte die Versuchsgruppe mit Tabotamp ein signifikant besseres Zellwachstum.

Derselbe Effekt zeigte sich auch für Resorba Cell zwischen Tag 0 und 7. Das Zellwachstum stagnierte allerdings auch mit Resorba Cell als Medium mit pH 6,6 zwischen Tag 7 und 14 verwendet wurde.

Die Ergebnisse sind in *Abb. 13* grafisch aufgearbeitet zu sehen.

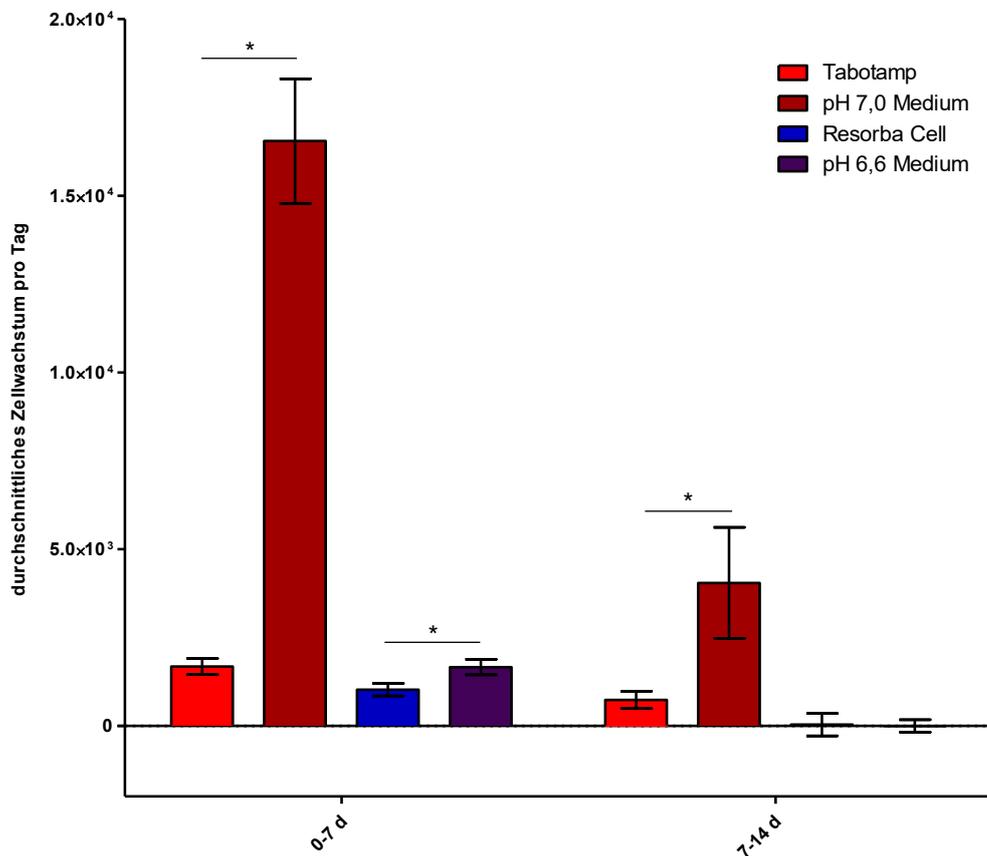


Abb. 6: Durchschnittliches Zellwachstum pro Tag zwischen d 0-7 und d 7-14, Vergleich angesäuertes Kulturmedium gegen oxidierte Cellulose. Die Versuchsgruppe mit Tabotamp zeigt eine signifikant größere Zellzahlzunahme in beiden Untersuchungszeiträumen verglichen mit der pH-Wert-veränderten Kontrolle. Gleiches konnte in der Resorba Cell Versuchsgruppe nur zwischen Tag 0 und 7 beobachtet werden. * $p < 0,05$; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Test.

3.3 Ergebnisse Kontraktionsassay

3.3.1 Kontraktionsassay mit Zellkulturmedium

Mittels Kontraktionsassay wurde untersucht inwieweit die Fähigkeit der Fibroblasten eine Kollagen I Matrix zu kontrahieren durch oxidierte Cellulose beeinflusst wird.

Hierbei wurde die Matrix, in der sich die Zellen befanden, vom Boden gelöst und unmittelbar danach sowie nach 24 und 48 Stunden abfotografiert und ausgemessen. Die oxidierten Cellulosematerialien waren zuvor in den Überstand des umgebenden Medium eingebracht worden.

Es zeigte sich, dass sich die Fläche der Matrizen, gemessen in mm^2 , in allen Ansatzgruppen über die Zeit veränderte und die Matrizen zusammenschrumpften. Dabei zeigte sich ein geringer Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Tabotamp, deren Matrizen von 24 h auf 48 h um 7,23 % bzw. 5,14 % schrumpften.

Die Änderung der Gesamtfläche war in der Resorba Cell Versuchsgruppe signifikant geringer. Hier schrumpften die Matrizen nach 24 h und 48 h um 1,23 %.

Abb. 14 zeigt diese Entwicklung grafisch aufgearbeitet.

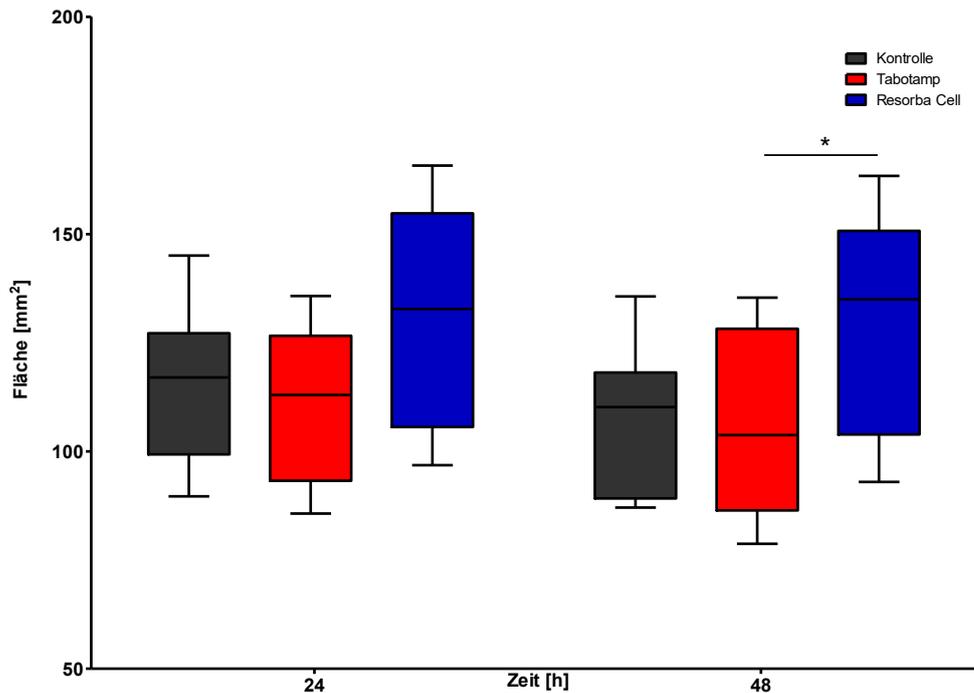


Abb. 14: Veränderung der Fläche von Kollagen I Matrizen. Die ausgehärteten Matrizen werden nach 24 h vom Boden ihrer Wells gelöst und nach 24 h bzw. 48 h ab fotografiert, um Veränderungen in der Fläche zu messen. Die Kontrollgruppe sowie die Gruppe mit zugesetztem Tabotamp unterscheiden sich kaum im Kontraktionsverhalten voneinander. Signifikante Unterschiede sind nach 48 h zwischen der Gruppe mit Tabotamp und Resorba Cell messbar. * $p < 0,05$; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Test.

3.3.2 Kontraktionsassay mit angesäuertem Zellkulturmedium

Auch hier wurden die Versuche ähnlich des Viabilitätsassays mit Kulturmedien der pH-Werte 7,0 und 6,6 wiederholt.

Die Ergebnisse sind in *Abb. 15* dargestellt.

Es zeigte sich, dass Matrizen der Resorba Cell Gruppe sowohl im Vergleich zu dem direkten Kontrollmedium mit pH-Wert 6,6 als auch zu der Kontrollgruppe schlechter kontrahierten. Gleiches gilt auch für den Vergleich mit der Tabotamp Versuchsgruppe bzw. der pH-Wert 7,0 Medium-Gruppe.

Die Werte zwischen Tabotamp und dem Medium mit pH-Wert 7,0 unterschieden sich hingegen nur geringfügig.

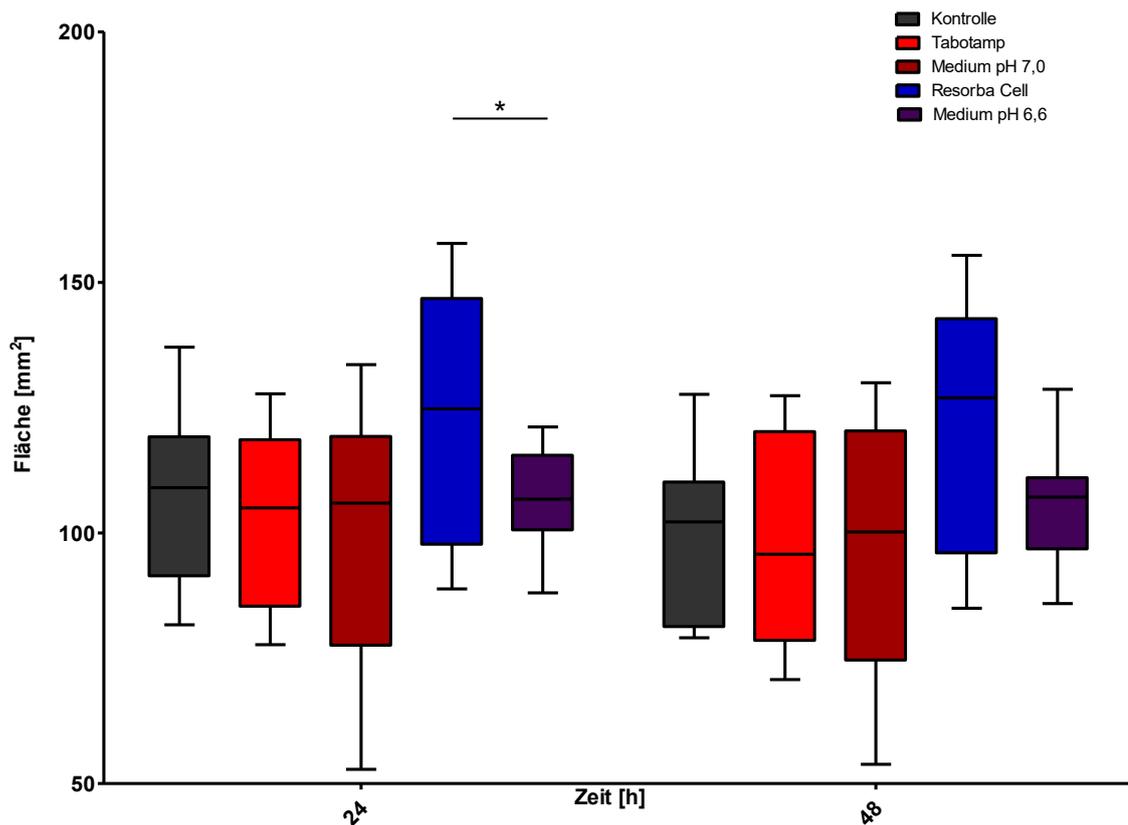


Abb. 15: Veränderung der Fläche von Kollagen I Matrizen verglichen mit der Kontrolle und den Kulturmedien mit angepassten pH-Werten. Die Kontrollgruppe enthält lediglich Matrizen in normalem Zellmedium. Die Kulturmedien mit pH-Wert 7,0 bzw. 6,6 werden angesäuert, um einen möglichen pH-Wert unabhängigen Einfluss der oxidierten Cellulosematerialien zu evaluieren. Die Kontrollgruppe sowie die Gruppe mit zugesetztem Tabotamp zeigen kaum Unterschiede im Kontraktionsverhalten verglichen mit der pH- Wert 7,0 Medium-Gruppe. Signifikante Unterschiede sind nach 24 h zwischen der Gruppe mit Resorba Cell und dem pH- Wert 6,6 Medium messbar. * $p < 0,05$; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Test.

3.4. Ergebnisse Migrationsassay

3.4.1 Kontrolle gegen oxidierte Cellulosematerialien

Ob die Zellen auch in ihrem Migrationsverhalten durch die beiden Hämotypika beeinflusst werden, sollte durch einen Migrationsassay gezeigt werden. Dabei sollten die Zellen einen vordefinierten Spalt von 500 μm innerhalb von 24 h überwachsen.

In der Kontrollgruppe wurde bereits nach 14 h eine Zellkonfluenz von über 90 % sichtbar. In den Gruppen mit Tabotamp und Resorba Cell waren zu diesem Zeitpunkt lediglich ~81 % bzw. ~78 % der Fläche von Zellen bedeckt. Zudem war,

anders als in den Kontrollansätzen, in diesen Gruppen nie ein kompletter Überwuchs des Spaltes erkennbar.

In den ersten 8 h ließen sich zwischen den Versuchsgruppen der Kontrolle sowie der Gruppe mit zugesetztem Tabotamp kaum Unterschiede im Zellmigrationsverhalten ausmachen. Zu diesem Zeitpunkt betrug die mit Zellen überwachsene Fläche durchschnittlich 79,8 % (+/-3,7) in der Kontrollgruppe bzw. 79,3 % (+/- 6,283%) in der Tabotamp Gruppe. In der Resorba Cell Gruppe waren nach 8 h hingegen nur 76,2 % (+/-2,973) der Fläche überwachsen.

In den folgenden Stunden wanderten die Zellen in den beiden oxidierten Cellulose Gruppen signifikant schlechter über den Zellspalt, sodass nach 24 h lediglich 88 % (+/-5,669) der Fläche in der Versuchsgruppe mit Tabotamp und 80,5 % (+/-4,213) in der Resorba Cell Gruppe überwachsen waren. In der Kontrollgruppe waren zu diesem Zeitpunkt 98,1 % (+/-2,361) des Spaltes überwachsen.

Abb. 16 zeigt die Flächenveränderungen über 24 h.

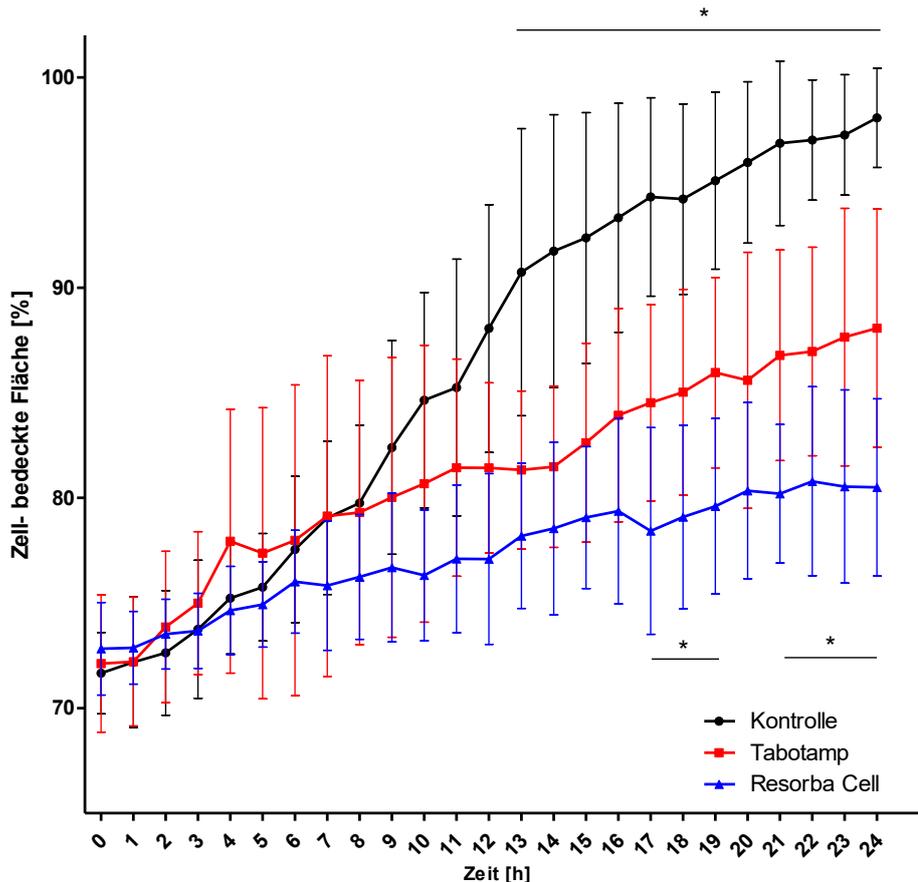


Abb. 16: Migrationsverhalten von Fibroblasten über einen 500 µm breiten Spalt. In beiden Versuchsgruppen mit oxidiertem Cellulose ist am Ende des Beobachtungszeitraums weniger Fläche überwachsen als in der Kontrollgruppe. Am Beginn des Beobachtungszeitraumes zeigt die Tabotamp Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe eine marginal bessere Zellmigration. Die Resorba Cell Gruppe zeigt über den gesamten Verlauf signifikant weniger überwachsene Fläche als die Tabotamp Gruppe. Hiervon ausgenommen sind die ersten beiden Stunden. * $p < 0,05$; one-way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

3.4.2 Angesäuertes Zellkulturmedium gegen oxidierte Cellulosematerialien

Verglich man nun die Gruppen mit oxidiertem Cellulose mit der Gruppe der entsprechend angesäuerten Medien, so zeigte sich, dass der Spalt in den ersten 6 h vergleichsweise ähnlich überwachsen wurde.

Nach 7 h ließ sich erkennen, dass in den Ansätzen mit den angesäuerten Vergleichsmitteln die Zellen wesentlich schneller über den Spalt wanderten als in den Ansätzen mit oxidiertem Cellulose.

Nach 24 h waren in der Gruppe mit Medium pH-Wert 7,0 96,8 % (+/-3,364) des Spaltes überwachsen, während es in der Versuchsgruppe mit Tabotamp 88,1 % (+/-5,669) waren. In der Gruppe mit Medium pH-Wert 6,6 waren 82,7 % (+/-7,224), in der Resorba Cell Gruppe 80,5 % (+/-4,213) des Spaltes bedeckt.

Besonders im Zeitraum nach 10 h wurde ein zunehmender Unterschied zwischen den Gruppen mit oxidierten Cellulose und den Gruppen mit angesäuerten Kulturmedien deutlich.

In *Abb. 17* sind die Ergebnisse des Migrationsassays nochmals als Graph zusammengefasst.

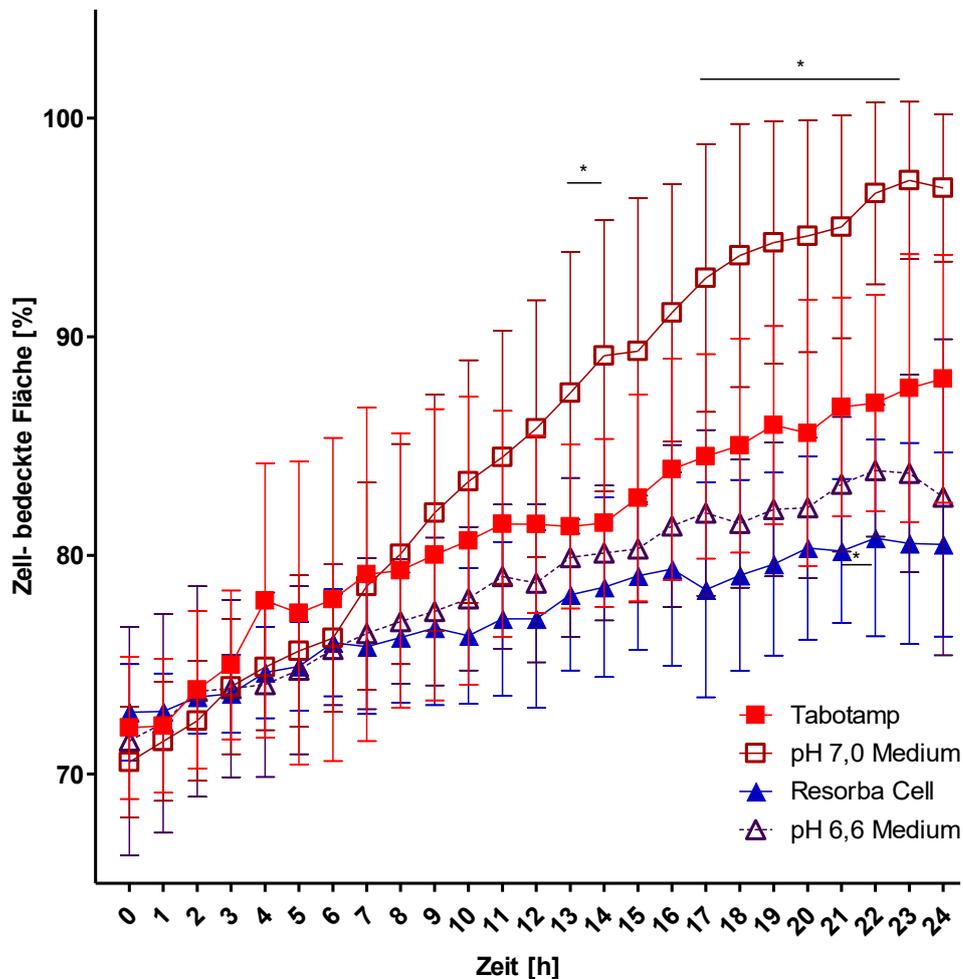


Abb. 17: Migrationsverhalten, Vergleich von oxidierten Cellulosematerialien und angesäuertem Kulturmedium. Die Gruppen mit oxidierten Cellulosematerialien zeigen nach 24 h weniger überwachsene Fläche, verglichen mit den pH-Wert veränderten Ansatzgruppen. In den Gruppen mit Tabotamp zeigt sich zudem ein signifikanter Unterschied zur Gruppe mit Medium pH 7,0. Die Resorba Cell Gruppe zeigt zu späteren Beobachtungszeitpunkten eine schlechtere Zellmigration. Die Unterschiede zur Gruppe mit pH-Wert 6,6 Medium sind nicht signifikant. * $p < 0,05$; one-way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

4. Diskussion

4.1 pH-Wert-Entwicklung

Oxydierte Cellulosematerialien entstehen aus der Oxidation primärer Alkohol Gruppen am Cellulose-Polymer, die dadurch zu Carboxylgruppen werden (65). Dieser Prozess erlaubt durch chemische Depolymerisation und enzymatische Prozesse den Abbau der Glukoseketten aus denen die Cellulose besteht.

Die dadurch entstehenden Abbauprodukte sind vor allem Glukose und Glukuronsäure (62). Durch die Glukuronsäure kommt es zu einem lokalen Abfall des pH-Wertes. Dieser Abfall konnte bereits *in vitro* als auch *in vivo* für unterschiedliche oxydierte Cellulosematerialien gezeigt werden (84).

Auch in den hier vorgestellten Versuchen konnte ein pH-Wert-Abfall für beide Materialien beobachtet werden, der besonders stark bei der Applikation in isotonischer Kochsalzlösung ausgeprägt war.

Hier wurden bereits nach einer Stunde starke pH-Wert-Abfälle auf Werte bis zu pH 2,34 beobachtet. Das ist vor allem auf die mangelnde Pufferkapazität von einfacher 0,9% NaCl-Lösung zurückzuführen.

Versuche mit ORC und ONRC in PBS konnten jedoch in einer früheren Studie einen vergleichbaren Abfall des pH-Wert auf durchschnittlich 1,8 bzw. 1,91 nach 60-minütiger Applikation für beide Materialien zeigen. Folglich scheint der Phosphatanteil in PBS kaum Einfluss auf die erzeugte Azidität durch die Materialien zu haben. Es bleibt jedoch zu beachten, dass die Autoren doppelt so große Stücke der Cellulosematerialien verwendeten im Vergleich zu dieser Arbeit (64).

Während sich der pH-Wert-Verlauf in 0,9% NaCl-Lösung für beide Materialien weitestgehend glich, zeigten sich im Gegensatz dazu im Zellkulturmedium mit und ohne Zellen deutliche Unterschiede.

So blieb der pH-Wert in den Ansätzen mit ONRC über den gesamten Beobachtungszeitraum auf einem niedrigeren Niveau. Eine deutlich unterschiedliche Entwicklung des pH-Wertes im Vergleich der beiden Materialien konnte insbesondere in den ersten vier Stunden beobachtet werden.

Während der pH-Wert jedoch in den Ansätzen mit ORC im weiteren Verlauf wieder anstieg und sich dem pH-Wert-Verlauf der Kontrollgruppe annäherte, fiel der pH-Wert in den Gruppen mit ONRC weiter ab. Erst nach fünf Stunden konnte

auch hier ein erneuter Anstieg gesehen werden. Dieser Unterschied könnte auf die unterschiedliche Ultrastruktur der ONRC zurückzuführen sein.

Wie in *Abb. 3* zu sehen ist, erscheinen die Fasern von ONRC offener und faseriger. Dadurch wird die Oberfläche der Materialien sowie die Menge an reaktiven Gruppen größer, die für die Freisetzung der sauren Komponenten verantwortlich sind. Folglich erschöpft sich die Pufferkapazität des Zellkulturmediums früher, wodurch der pH-Wert eher sinkt. Diese Beobachtungen konnten in Ansätzen mit NaCl-Lösung nicht gemacht werden. Ein Erklärungsansatz könnte in dem logarithmischen Aufbau der pH-Wert-Skala liegen. Die Puffer im Kulturmedium halten den pH-Wert am ehesten in der Mitte der Skala, wo Veränderungen der absoluten Menge an $[H^+]$ -Ionen weniger Einfluss auf eine pH-Wert-Änderung haben. An beiden Enden der Skala wirken sich jedoch Änderungen der $[H^+]$ -Ionenmenge stärker aus.

Um diesen Hypothese zu verifizieren, müssten in zukünftigen Experimenten die Messungen unabhängig von der Materialoberfläche durchgeführt werden. Um dies zu erreichen, müsste das Gramgewicht der Materialien bestimmt und die Oberflächenstruktur anschließend durch Mörsern zerstört werden. Auf diese Weise wäre die Freisetzung von sauren Gruppen unabhängig von der Oberfläche der Materialien untersuchbar.

Gegen diese Verfahrensweise spricht jedoch, dass die Materialien im klinischen Alltag der Größe nach und nicht nach Gewicht dosiert eingesetzt werden. Aus diesem Grund erscheint die gewählte Vorgehensweise dieser Arbeit alltagsnäher und damit klinikrelevanter zu sein.

Ein weiterer Erklärungsansatz für den stärkeren initialen pH-Wert-Abfall und saureren pH-Wert-Verlauf von ONRC könnten die Abbauprodukte der oxidierten Cellulose sein.

In früheren tierexperimentellen Arbeiten wurde gezeigt, dass Glukuronsäure den größten Anteil der Abbauprodukte von oxidierter Cellulose ausmacht. Nach Einbringen der Materialien in Ratten zeigte sich, dass nach 18 Stunden ca. 90 % der löslichen Glukuronsäure absorbiert war. Dies spricht für einen schnellen Abbau der Säure. Allerdings konnten nach dieser Zeit noch faserige Anteile der oxidierten Cellulose, die später durch Makrophagen phagozytiert werden, beobachtet werden (65).

Vor diesem Hintergrund erscheint der initiale pH-Wert-Abfall für beide Materialien vor allem auf das Freiwerden der Glukuronsäure zurückzuführen zu sein. Im späteren Verlauf könnten allerdings zunehmend die faserigen Anteile eine Rolle spielen. Wenn, wie in *Abb. 3* gezeigt, die Ultrastruktur beider Materialien verglichen wird, ist zu sehen, dass der Anteil faseriger, schwer abbaubarer Anteile in ONRC höher ist. So scheinen es vor allem diese Anteile zu sein, die den pH-Wert in späteren Phasen des Beobachtungszeitraums auf niedrigerem Niveau halten.

Ein zellulärer Eigeneffekt scheint nach Beobachtungen dieser Arbeit eher unwahrscheinlich, da sich die Kurvenverläufe der Gruppen mit und ohne Zellen weitestgehend für beide Materialien gleichen. Schlussfolgernd scheint Apoptose, induziert durch den niedrigen pH-Wert, nicht von Relevanz für die pH-Wert-Entwicklung zu sein.

In einem weiteren Schritt wurde versucht unabhängige, materialspezifische Einflüsse auf die pH-Wert Entwicklung herauszuarbeiten.

Es wurden hier zunächst Kontrollmedien erstellt, die den pH-Wert-Verlauf, der durch Tabotamp bzw. Resorba Cell erzeugt wird, möglichst genau imitieren, jedoch frei von oxidiertem Cellulose sind. Dafür wurde Salzsäure in normales Kulturmedium titriert, um dieses anzusäuern.

Ein anderer Lösungsansatz, die mit oxidiertem Cellulose versetzten Gruppen mittels Puffer auf das pH-Wert-Niveau der Kontrollgruppen zu setzen, wurde nicht verfolgt, da es bei klinischer Anwendung der Materialien am Patienten eher zu einer Auslastung der lokalen Pufferkapazität kommt. Daher erschien eine pH-Wert Senkung der Kontrollen durch Salzsäure praxisnäher.

Zudem scheint es denkbar, dass der Verbrauch von Pufferkapazität einen wichtigen Einfluss auf die beobachteten Ergebnisse hat, sodass beispielsweise die faserigen Anteile bei unterschiedlichen pH-Werten unterschiedliche Wirkung entfalten.

In einer Arbeit von *Bjorenson et al.* konnte gezeigt werden, dass auch in Körperflüssigkeiten wie Blutserum, Plasma und heparinisierendem Vollblut, eine deutliche pH-Wertsenkung durch ORC hervorgerufen wird, obwohl diese Blutbestandteile über diverse Puffersysteme z.B. über Proteine wie Hämoglobin als auch das $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3^-$ - bzw. $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ -System verfügen. Die Autoren folgerten vor allem aus den pH-Wertveränderungen des Serums durch oxidierte

Cellulose einen möglichen Einfluss auf den Heilungsprozess chirurgischer Wunden (85).

4.2 Zellwachstum

Das Zellwachstum während der Proliferationsphase trägt wesentlich zum regelrechten Wundverschluss bei. Um den Einfluss von oxidiertem Cellulose auf das Wachstum von Fibroblasten zu untersuchen wurde ein Viabilitätsassay verwendet, bei dem das Reagenz von vitalen Zellen verstoffwechselt wird. Je mehr Zellen vorhanden sind, desto mehr Reagenz wird umgesetzt. Hierbei gilt es zu beachten, dass wenige stark stoffwechselaktive Zellen eine größere Zellzahl vortäuschen können. Daher wurden für die Versuche stets Zellen der gleichen Passage und damit von gleicher Vitalität sowohl für die Kontrollgruppen, die Zellreihe als auch für die Ansätze mit oxidiertem Cellulose verwendet. So konnte der Einfluss der Materialien auf das Zellwachstum untersucht werden, da diese als einzige Einflussgröße während des Versuchs variiert wurden. Es zeigte sich, dass sowohl ORC als auch ONRC die Proliferation der Fibroblasten hemmten. Dieser Effekt war im Beobachtungszeitraum zwischen Tag 7 und 14 weniger deutlich als während der ersten Woche, jedoch in beiden Intervallen signifikant. Dies erscheint aufgrund des zunehmenden Verbrauches an Nährstoffen schlüssig.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in den Ansätzen mit den zugesetzten oxidierten Cellulosematerialien verglichen mit den angesäuerten Kontrollgruppen. Auch hier war die Zellproliferation in beiden Gruppen mit oxidiertem Cellulose signifikant schlechter.

Vor allem in der Versuchsgruppe mit Tabotamp sind die hemmenden Effekte während der ersten Woche deutlich, jedoch auch während der zweiten Woche noch vorhanden. In diesem zweiten Beobachtungsabschnitt zeigte sich für die Resorba Cell Gruppe kein Wachstum mehr. Diese Beobachtung könnte auf den niedrigeren pH-Wert in diesen Ansätzen zurückzuführen sein.

Fibroblasten in Zellkultur zeigen bei erniedrigtem pH-Wert eine schlechtere Proliferationskapazität. Dies ist auf hemmende Zell-Zell Kontakte wie auch auf eine abnehmende Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren bei saurerem pH-Wert zurückzuführen (86).

Dennoch legen die hier gezeigten Ergebnisse dar, dass die hemmende Wirkung der oxidierten Cellulosematerialien auf das Wachstumsverhalten der Zellen weitestgehend unabhängig vom pH-Wert ist.

In einer Arbeit von *Komori et al.* zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Hier wurde eine schlechtere Zellproliferation unter Einsatz von Surgicel® gezeigt, einem weiteren Material aus ORC, das sich in der klinischen Anwendung befindet. Neben reduzierten Fibroblastenzahlen kam es zudem zum Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen (67).

Im Gegensatz dazu zeigten *Hart et al.* eine gesteigerte Proliferation von Fibroblasten in Zellkultur wenn sie mit einer Mischung aus oxidierte Cellulose und Kollagen behandelt worden waren (78).

In dieser Arbeit wurde jedoch nicht klar zwischen der Wirkung des Kollagens und der oxidierten Cellulose auf die Zellen unterschieden. Aus diesem Grund erscheinen die Ergebnisse von *Komori* und *Hart* nur bedingt mit dieser Arbeit vergleichbar zu sein.

In der Literatur existieren jedoch auch widersprüchliche Daten. So konnten *Liu et al.* keinen Einfluss auf die Fibroblastenproliferation durch oxidierte Cellulose zeigen (80). *Akyol et al.* wiesen anhand von Tierexperimenten keinen signifikanten Einfluss oxidierte Cellulose auf die Zellproliferation nach (87).

Es sollte jedoch kritisch erwähnt sein, dass sich diese Studien mit epithelialen bzw. mukosalen Fibroblasten beschäftigten. Diese Gewebe haben zahlreiche Zell-Zell-Kontakte und eine hohe basale Proliferationsrate, wodurch die Zellen gegenüber externen Noxen resistenter sein könnten.

Es wurde bereits gezeigt, dass Fibroblasten aus unterschiedlichen Geweben und Gewebsschichten auch unterschiedlich auf externe Stimuli reagieren (88). Die Gewebe unterscheiden sich somit grundlegend in der Art der Fibroblastenorganisation in verschiedenen Bindegeweben, was für diese Arbeit im Speziellen und für die chirurgische Wundheilung im Allgemeinen relevant ist. Des Weiteren erscheint eine Mono-Zellkultur nur bedingt auf die Bedingungen im lebenden Organismus übertragbar zu sein. Dennoch stehen die hier gezeigten Ergebnisse im Widerspruch zu publizierten Studien, da sie einen deutlich proliferationshemmenden Effekt, losgelöst von der Änderung des lokalen pH-Wertes, beschreiben.

4.3 Kontraktionsverhalten

Die Umbauphase der Wundheilung ist durch die sogenannte Wundkontraktion geprägt, die die Wunde zusehends verschließt. Hierbei wandern überwiegend Fibroblasten in den Wundbereich ein und produzieren eine kollagen-, fibronektin- sowie zellreiche EZM (89).

Das Wandern der Zellen, sowie das bereitgestellte Kollagen, erzeugen durch Interaktion mit Fibroblasten Spannkraften im Granulationsgewebe, die dazu führen, dass Fibroblasten und Kollagenfibrillen parallel zueinander ausgerichtet werden.

Dies ist eine Voraussetzung für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (38). Diese Entwicklung wird zudem durch verschiedene Zytokine beschleunigt, jedoch sind die entstehenden traktilen Kräfte maßgebend für die Phänotyp-Änderung (90).

Das Modell der erst adhären, dann freischwimmenden, mit Fibroblasten besiedelten Kollagen Typ I Matrix stellt das Zusammenwirken von Fibroblasten und Kollagen im Granulationsgewebe in vitro nach und ist in der Literatur bereits beschrieben (42, 91, 92). Daher wurde es auch in dieser Arbeit verwendet.

Die Ergebnisse der Versuche zeigten 24 h nach Lösen der Matrizen eine weitestgehend gleiche Kontraktionsrate für die Kontroll- und Versuchsgruppen mit Tabotamp. Folglich konnte kein eindeutiger Einfluss der Materialien auf das Kontraktionsverhalten nachgewiesen werden. Dasselbe Ergebnis konnte auch nach 48 h beobachtet werden. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt kontrahierten die Matrizen der Versuchsgruppe mit Tabotamp im Mittel sogar ein wenig besser verglichen mit der Kontrollgruppe.

Abweichende und zum Teil gegenteilige Ergebnisse konnten für die Untersuchungsgruppe mit ONRC gewonnen werden. Die Matrizen dieser Gruppe waren sowohl nach 24 h als auch nach 48 h deutlich größer als in der Kontrollgruppe bzw. in den Ansätzen mit ORC.

Es bleibt festzuhalten, dass der pH-Wert auch in diesem Versuchsaufbau die Resultate nur geringfügig beeinflusste. So zeigten die Matrizen, die bei pH 7,0 bzw. pH 6,6 inkubiert worden waren, ein weitestgehend ähnliches Kontraktionsvermögen. Matrizen, die bei pH 6,6 untersucht wurden, hatten nach 48 h eine tendenziell größere Oberfläche.

Interessanterweise konnte bereits nach 24 h ein signifikanter Unterschied von Gruppen mit Resorba Cell zu Gruppen mit entsprechendem Vergleichsmedium mit pH-Wert 6,6 gezeigt werden.

Es stellte sich heraus, dass die Matrizen, die mit ONRC inkubiert worden waren eine schlechtere Kontraktion der Matrizen aufwiesen. Dieser Effekt konnte auch nach 48-stündiger Inkubationszeit gesehen werden.

Die Ergebnisse legen nahe, dass der beobachtete hemmende Effekt von Resorba Cell auf das Kontraktionsverhalten pH-Wert unabhängig ist, während Tabotamp keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktion nimmt.

Diese Beobachtung könnte erneut aus der faserigeren Ultrastruktur von ONRC resultieren. Ein möglicher Erklärungsansatz der Wirkungsweise könnte in diesem Fall durch Anlagerung der faserigen Strukturen an die Kollagenmatrix bestehen. Das könnte die Interaktion zwischen Cellulosematerialien und Matrizen blockieren und die Ausbildung der Traktionskräfte inhibieren.

Es wurde bereits gezeigt, dass Kollagenmatrizen mit weniger Zellen auch weniger kontraktionsfähig sind (93). Wendet man dies in Verbindung mit den Ergebnissen des Viabilitätsassays dieser Arbeit an, so ergibt sich ein weiterer hypothetischer Erklärungsansatz. Matrizen der Versuchsgruppe mit Resorba Cell könnten die Proliferation der in der Matrix enthaltenen Fibroblasten inhibieren und so die Kontraktionsfähigkeit reduzieren. Um diese Aussage zu stützen, wäre eine quantitative Zellbestimmung vor und nach der Applikation von oxidierte Cellulose auf die Matrizen nötig, die jedoch praktisch nicht umsetzbar ist, sobald die Zellen in der Matrix eingeschlossen sind.

Generell bleibt festzuhalten, dass das Modell der Fibroblasten besiedelten Kollagen Typ I Matrix *in vivo* Bedingungen nur bedingt nachahmt. Um detailliertere Erkenntnisse über den Einfluss der Materialien auf den Prozess der Wundkontraktion gewinnen zu können, wären Modelle mit multiplen Zelllinien nötig. Dieses poly- bzw. multizelluläre Zusammenspiel könnte zu einer Änderung der kontraktile Kräfte durch Fibroblasten führen und die Ergebnisse beeinflussen (92).

Ein weiterer Schwachpunkt dieser Methode ergibt sich aus der Tatsache, dass neben Kollagen Typ I auch Kollagen Typ III in der Wundkontraktion von großer Bedeutung ist (93, 94). Dieses Molekül findet allerdings bei dieser Methode keine Anwendung.

Zusammenfassend scheint ein hemmender Einfluss von ONRC vorhanden zu sein, der nicht maßgeblich auf die Veränderung des lokalen pH-Wertes zurückzuführen ist.

4.4 Zellmigration

Ein Gewebedefekt wird bereits kurz nach seiner Entstehung durch eine provisorische, extrazelluläre Matrix ausgefüllt die durch Zellen besiedelt und umstrukturiert wird.

Dafür wandern bereits in einer frühen Phase der Wundheilung Fibroblasten in das Areal ein. Dabei fungiert die gebildete EZM als ein Gerüst (95).

Um Zellmigration *in vitro* zu untersuchen, ist der „Scratch Assay“ ein etabliertes Modell. Hierbei wird bei konfluenter Zelldichte ein Spalt in den Zellrasen eingeritzt um eine artifizielle Wunde bzw. einen Defekt zu erzeugen. Dieser wird im weiteren Verlauf von den Zellen überwachsen (96).

Obwohl diese Technik simpel und kostengünstig umsetzbar ist, gibt es einige Schwachstellen. Aus diesem Grund wurden für die Versuche dieser Arbeit keine „Scratch“- sondern Migrationsassays verwendet. Ein Vorteil dieses Assay-Prinzips ist, dass ein Spalt mit definierter Größe zwischen zwei Zellteppichen entsteht, wohingegen bei Anwendung des „Scratch Assays“ die Spaltbreite variabel ist.

Des Weiteren werden beim „Scratch Assay“ Zellen so gegeneinander verschoben, dass sie sich an den Rändern des Spalts häufen bzw. übereinander schieben. Das könnte die Ergebnisse in der frühen Phase der Migration beeinflussen. Ein weiterer Aspekt dieser Technik ist, dass die Zellen verletzt werden können, wodurch beispielsweise pro-inflammatorische Zytokine freigesetzt werden.

Um jedoch lediglich das Migrationsverhalten, losgelöst von weiteren beeinflussenden Faktoren, zu untersuchen, ist der Migrationsassay ein etabliertes Modell mit reproduzierbaren Ergebnissen (97, 98).

Die Ergebnisse der Versuche dieser Arbeit zeigten eine langsamere Zellmigration in den Gruppen mit oxidiertem Cellulose. In Ansätzen mit ONRC konnte in materialvergleichenden Auswertungen eine signifikant schlechtere Zellmigration über den vordefinierten Spalt beobachtet werden. Es ist deshalb

vor allem für diese Form der oxidierten Cellulose von einem negativen Einfluss auf das Migrationsverhalten auszugehen.

In Messungen mit angepasstem pH-Wert konnte eine bessere Zellmigration, verglichen mit den Gruppen der oxidierten Cellulosematerialien, nachgewiesen werden. Deutlich wurde dieser Effekt insbesondere in Ansatzgruppen mit Tabotamp, jedoch ist für Resorba Cell tendenziell ein ähnlicher Trend erkennbar. Erneut liegt der Rückschluss nahe, dass es einen pH-Wert-unabhängigen, negativen Einfluss beider Materialien auf das Migrationsverhalten von Fibroblasten gibt.

In tierexperimentellen Arbeiten mit oxidierten Cellulosematerialien wurden teilweise gegensätzliche Ergebnisse beschrieben. So zeigten *Hart et al.*, dass Wunden von diabetischen Mäusen, behandelt mit einer Kombination aus oxidiertem Cellulose und Kollagen, einen beschleunigten Wundverschluss zeigten. Dies wurde auf eine erhöhte Zellzahl im Granulationsgewebe zurückgeführt und daraus ein positiver Einfluss auf das Migrationsverhalten abgeleitet (78).

Auch Versuche mit dermalen Fibroblasten und oxidiertem Cellulose an Patientinnen nach onkologischen Brustoperationen konnten einen positiven Einfluss von oxidiertem regeneriertem Cellulose auf die Zellproliferation und Migration zeigen (99).

Rassu et al. hingegen kommen zu dem Schluss, dass oxidierte regenerierte Cellulose einen schädlichen Einfluss auf die Wundheilung hat und mit einer lokalen Entzündungsreaktion statt gesteigerter Zellmigration einhergeht (100).

Bei allen genannten Studien handelt es sich jedoch um *in vivo* Studien, die nur bedingt auf das *in vitro* Modell dieser Arbeit übertragbar sind.

So könnten in Wundmodellen diabetischer Mäuse möglicherweise die für oxidierte Cellulose bereits nachgewiesenen antimikrobiotischen Effekte gegenüber einem möglichen hemmenden Einfluss auf die Wundheilung überwiegen. Generell gilt anzumerken, dass diese Modelle einen unterschiedlichen Ansatz verfolgen, da sie sich vor allem auf chronisch nicht-heilende Wunden konzentrieren. Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche fokussieren sich jedoch auf die direkte Wechselwirkung von oxidiertem Cellulose und Fibroblasten vor dem Hintergrund tiefer, chirurgisch zugefügter Wunden.

Zusammenfassend konnten negative Auswirkungen von oxidierten Cellulosematerialien auf das Migrationsverhalten beobachtet werden. Erneut erschien der Effekt unabhängig vom pH-Wert zu sein.

5. Schlussfolgerung

Oxydierte Cellulosematerialien sind aufgrund ihrer einfachen und schnellen Anwendbarkeit seit Jahrzehnten Bestandteil des chirurgischen Alltags.

Da sie für den menschlichen Körper resorbierbar sind, werden sie regelmäßig nach operativen Eingriffen *in situ* belassen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Blutstillung in der Regel bereits erfolgt.

Diverse Studien zeigten einen positiven Effekt der Materialien hinsichtlich der oberflächlichen kutanen Wundheilung in chronisch-entzündlichen Arealen auf (77-79). Um jedoch den Einfluss auf den Heilungsprozess von tieferen, chirurgischen Wunden zu eruieren, wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Einfluss von ORC und ONRC auf Fibroblasten, die ein zentraler Zelltyp beim Heilungsvorgang solcher Wunden sind, untersucht.

Die vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass es durch die Materialien zu einer Hemmung von wesentlichen Prozessen der Wundheilung wie Zellmigration, Zellwachstum und Kollagen-Kontraktion sowie einer deutlichen Beeinflussung des lokalen pH-Milieus kommt. Es stellte sich heraus, dass die gezeigten Effekte weitestgehend unabhängig von der beobachteten pH-Wert-Veränderung, erzeugt durch die beiden Materialien, sind.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche stellen Modelle zur Annäherung an tatsächliche Wundheilungsvorgänge im lebenden Organismus dar. Dennoch zeigen sie eindrücklich, dass die Materialien Fibroblasten unter Laborbedingungen, gegensätzlich zu diversen vorgehenden Publikationen, negativ beeinflussen.

Somit könnte sich für die klinische Anwendung der Rückschluss ergeben, die Materialien nach erfolgter Blutungsstillung nicht im Körper zurückzulassen, wobei es hierfür weiterer Forschungsarbeit mit komplexeren Wundmodellen bedarf. Es ergeben sich durch die erzeugte lokale pH-Wert-Senkung bakterizide Eigenschaften, die generell in der Wundheilung als vorteilhaft gelten (101). Dennoch gilt es den hier gezeigten negativen Einfluss auf die Zellproliferations- und Migrationseigenschaften dem gegenüber zu stellen.

Dabei wäre es interessant zu evaluieren, ob bereits eine kurze Applikationszeit der oxydierten Cellulose die Zellen beeinflusst, woraus sich praktische Rückschlüsse auf die klinische Handhabung ergeben könnten.

Einige Autoren raten bereits, die Materialien nicht *in situ* zu belassen, etwa weil sie das erzeugte pH-Wert-Niveau als nicht förderlich für die Wundheilung einstufen (60).

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse legen einen ähnlichen Rückschluss nahe, wenn auch nicht nur auf den Beobachtungen hinsichtlich der pH-Wert-Entwicklung basierend.

Auffallend war, dass der gezeigte Einfluss durch oxidierte Cellulose in den meisten Fällen pH-Wert-unabhängig war. Dies kann auf einen Einfluss der faserigen Bestandteile der Cellulose zurückzuführen sein, die am Ende des Abbauprozesses übrigbleiben. Hier gilt es in Zukunft diese besser zu untersuchen und herauszufinden, inwieweit die gemachten Rückschlüsse bestätigt werden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Arbeit einen Beitrag zum grundlegenden Verständnis der Wirkungsweise von ORC und ONRC im Hinblick auf zelluläre Eigenschaften wie Proliferation, Migration und Kontraktion gibt.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine*. 1999;341(10):738-46.
2. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-21.
3. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of dermatological science*. 2013;72(3):206-17.
4. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*. 2007;25(1):9-18.
5. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*. 2003;83(3):835-70.
6. Reed BR, Clark RA. Cutaneous tissue repair: practical implications of current knowledge. II. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1985;13(6):919-41.
7. Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science (New York, NY)*. 1997;276(5309):75-81.
8. Schafer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(8):628-38.
9. Drew AF, Liu H, Davidson JM, Daugherty CC, Degen JL. Wound-healing defects in mice lacking fibrinogen. *Blood*. 2001;97(12):3691-8.
10. Szpaderska AM, Egozi EI, Gamelli RL, DiPietro LA. The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;120(6):1130-7.
11. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of investigative dermatology*. 2007;127(3):514-25.
12. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *The New England journal of medicine*. 1989;320(6):365-76.
13. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *The American journal of pathology*. 1975;78(1):71-100.
14. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science (New York, NY)*. 1988;241(4866):708-12.
15. Leibovich SJ, Ross R. A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. *The American journal of pathology*. 1976;84(3):501-14.
16. Peters T, Sindrilaru A, Hinz B, Hinrichs R, Menke A, Al-Azzeh EA,

- et al. Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation. *The EMBO journal*. 2005;24(19):3400-10.
17. Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Experimental dermatology*. 1999;8(1):1-16.
 18. Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, et al. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *The Journal of investigative dermatology*. 1997;108(3):263-8.
 19. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*. 1996;87(7):1153-5.
 20. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *The American journal of pathology*. 2004;164(6):1935-47.
 21. Parks WC. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair and Regeneration*. 1999;7(6):423-32.
 22. Odland G, Ross R. Human wound repair. I. Epidermal regeneration. *The Journal of cell biology*. 1968;39(1):135-51.
 23. Florin L, Maas-Szabowski N, Werner S, Szabowski A, Angel P. Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 9):1981-9.
 24. Coulombe PA. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;121(2):219-30.
 25. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003;92(8):827-39.
 26. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology*. 1995;146(1):56-66.
 27. Guo S, DiPietro L. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*. 2010;89(3):219-29.
 28. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2004;9:283-9.
 29. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*. 2011;13:e23.
 30. Schreier T, Degen E, Baschong W. Fibroblast migration and

- proliferation during in vitro wound healing. *Research in Experimental Medicine*. 1993;193(1):195-205.
31. Gray AJ, Bishop JE, Reeves JT, Laurent GJ. A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. *Journal of cell science*. 1993;104 (Pt 2):409-13.
 32. Gailit J, Xu J, Bueller H, Clark RA. Platelet-derived growth factor and inflammatory cytokines have differential effects on the expression of integrins alpha 1 beta 1 and alpha 5 beta 1 by human dermal fibroblasts in vitro. *Journal of cellular physiology*. 1996;169(2):281-9.
 33. Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):143S-9S; discussion 50S-51S.
 34. Clark RA, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. *Journal of cell science*. 1995;108 (Pt 3):1251-61.
 35. Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T. In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. *Journal of molecular histology*. 2008;39(1):37-47.
 36. Majno G. The story of the myofibroblasts. *The American journal of surgical pathology*. 1979;3(6):535-42.
 37. Cherng S, Young J, Ma H. Alpha-smooth muscle actin (α -SMA). *J Am Sci*. 2008;4(4):7-9.
 38. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(5):349-63.
 39. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annual review of cell and developmental biology*. 1996;12:463-518.
 40. Harris AK, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. 1981.
 41. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *The American journal of pathology*. 2001;159(3):1009-20.
 42. Ehrlich HP, Rajaratnam JB. Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: an in vitro model of wound contraction. *Tissue & cell*. 1990;22(4):407-17.
 43. Welsch U, Sobotta J. *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen ; [online Zugang + interaktive Extras]*: Elsevier, Urban & Fischer; 2006.

44. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Archives of dermatology*. 1994;130(4):489-93.
45. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Human Skin Wounds: A Major and Snowballing Threat to Public Health and the Economy. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2009;17(6):763-71.
46. Diegelmann RF. Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2003;11(6):490-5.
47. Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK, Yager DR. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *The Journal of surgical research*. 1999;81(2):189-95.
48. Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, Benton R, Ladin D, Hou Z, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *The Journal of investigative dermatology*. 1995;104(2):236-40.
49. Gethin G. The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds uk*. 2007;3(3):52.
50. Greener B, Hughes AA, Bannister NP, Douglass J. Proteases and pH in chronic wounds. *Journal of wound care*. 2005;14(2):59-61.
51. Gethin GT, Cowman S, Conroy RM. The impact of Manuka honey dressings on the surface pH of chronic wounds. *International wound journal*. 2008;5(2):185-94.
52. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clinics in dermatology*. 2007;25(1):19-25.
53. Mendez MV, Stanley A, Park HY, Shon K, Phillips T, Menzoian JO. Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg*. 1998;28(5):876-83.
54. Kent KC, Bartek S, Kuntz KM, Anninos E, Skillman JJ. Prospective study of wound complications in continuous infrainguinal incisions after lower limb arterial reconstruction: incidence, risk factors, and cost. *Surgery*. 1996;119(4):378-83.
55. Lee ES, Santilli SM, Olson MM, Kuskowski MA, Lee JT. Wound infection after infrainguinal bypass operations: multivariate analysis of putative risk factors. *Surgical infections*. 2000;1(4):257-63.
56. Exton RJ, Galland RB. Major Groin Complications Following the Use of Synthetic Grafts. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2007;34(2):188-90.
57. Karl T, Woeste S. Prevention of inguinal wound healing disorders in vascular surgery. *Gefässchirurgie*. 2013;18(2):120-5.
58. Hedrick TL, Anastacio MM, Sawyer RG. Prevention of surgical site infections. *Expert review of anti-infective therapy*. 2006;4(2):223-33.

59. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR, Committee HICPA. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. *American journal of infection control*. 1999;27(2):97-134.
60. Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs*. 2005;8(3):137-42.
61. Frantz VK. Absorbable Cotton, Paper and Gauze : (Oxidized Cellulose). *Annals of surgery*. 1943;118(1):116-26.
62. Martina B, Kateřina Ko, Miloslava Rk, Jan G, Ruta M. Oxycellulose: Significant characteristics in relation to its pharmaceutical and medical applications. *Advances in Polymer Technology*. 2009;28(3):199-208.
63. Coseri S, Biliuta G, Simionescu BC, Stana-Kleinschek K, Ribitsch V, Harabagiu V. Oxidized cellulose--survey of the most recent achievements. *Carbohydrate polymers*. 2013;93(1):207-15.
64. Lewis KM, Spazierer D, Urban MD, Lin L, Redl H, Goppelt A. Comparison of regenerated and non-regenerated oxidized cellulose hemostatic agents. *European surgery : ACA : Acta chirurgica Austriaca*. 2013;45:213-20.
65. Pierce AM, Wiebkin OW, Wilson DF. Surgicel: its fate following implantation. *Journal of oral pathology*. 1984;13(6):661-70.
66. Alpaslan C, Alpaslan GH, Oygur T. Tissue reaction to three subcutaneously implanted local hemostatic agents. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 1997;35(2):129-32.
67. Komori YTM, Takada K, Kurosawa HNMEH. In vitro and in vivo evaluation of the biocompatibility and cytotoxicity of local hemostatic agents. *Jpn J Cardiovasc Surg*. 2004;33:382-6.
68. Spangler D, Rothenburger S, Nguyen K, Jampani H, Weiss S, Bhende S. In vitro antimicrobial activity of oxidized regenerated cellulose against antibiotic-resistant microorganisms. *Surgical infections*. 2003;4(3):255-62.
69. Dineen P. The Effect of Oxidized Regenerated Cellulose on Experimental Infected Splenotomies. *Journal of surgical research*. 1976;23(1977):114-6.
70. Scher KS, Coil JA, Jr. Effects of oxidized cellulose and microfibrillar collagen on infection. *Surgery*. 1982;91(3):301-4.
71. Schonauer C, Tessitore E, Barbagallo G, Albanese V, Moraci A. The use of local agents: bone wax, gelatin, collagen, oxidized cellulose. *European spine journal*. 2004;13 Suppl 1:S89-96.
72. Krizova P, Masova L, Suttner J, Salaj P, Dyr JE, Homola J, et al. The influence of intrinsic coagulation pathway on blood platelets activation by oxidized cellulose. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2007;82(2):274-80.
73. Sawada T, Nishizawa H, Nishio E, Kadowaki M. Postoperative

- adhesion prevention with an oxidized regenerated cellulose adhesion barrier in infertile women. *The Journal of reproductive medicine*. 2000;45(5):387-9.
74. Linsky CB, Diamond MP, Cunningham T, Constantine B, DeCherney AH, diZerega GS. Adhesion reduction in the rabbit uterine horn model using an absorbable barrier, TC-7. *The Journal of reproductive medicine*. 1987;32(1):17-20.
 75. Dineen P. Antibacterial activity of oxidized regenerated cellulose. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1976;142(4):481-86.
 76. Dineen P. The effect of oxidized regenerated cellulose on experimental intravascular infection. *Surgery*. 1977;82(5):576-9.
 77. Cullen B, Watt PW, Lundqvist C, Silcock D, Schmidt RJ, Bogan D, et al. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002;34(12):1544-56.
 78. Hart J, Silcock D, Gunnigle S, Cullen B, Light ND, Watt PW. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in wound repair: effects in vitro on fibroblast biology and in vivo in a model of compromised healing. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002;34(12):1557-70.
 79. Smeets R, Ulrich D, Unglaub F, Woltje M, Pallua N. Effect of oxidised regenerated cellulose/collagen matrix on proteases in wound exudate of patients with chronic venous ulceration. *International wound journal*. 2008;5(2):195-203.
 80. Liu SA, Cheng CC, Chen JS, Hung YW, Chen FJ, Chiu YT. Effect of oxidized regenerated cellulose on the healing of pharyngeal wound: an experimental animal study. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*. 2012;75(4):176-82.
 81. Jeschke MG, Sandmann G, Schubert T, Klein D. Effect of oxidized regenerated cellulose/collagen matrix on dermal and epidermal healing and growth factors in an acute wound. *Wound repair and regeneration*. 2005;13(3):324-31.
 82. Jose L. Osseous Reactions to Three Hemostatic Agents. *Journal of Endodontics*. 1985;11(2):75-83.
 83. Ito H, Onishi H, Shoin K, Nagatani H. Granuloma caused by oxidized cellulose following craniotomy. *Acta neurochirurgica*. 1989;100(1-2):70-3.
 84. Dimitrijevic SD, Tatarko M, Gracy RW, Linsky CB, Olsen C. Biodegradation of oxidized regenerated cellulose. *Carbohydrate research*. 1990;195(2):247-56.
 85. Bjorenson JE, Grove HF, Gloria List SM, Haasch GC, Peter Austin B. Effects of hemostatic agents on the pH of body fluids. *Journal of Endodontics*. 12(7):289-92.
 86. Froehlich JE, Anastassiades TP. Role of pH in fibroblast proliferation. *Journal of cellular physiology*. 1974;84(2):253-60.
 87. Akyol N, Akpolat N. Effects of intraoperative oxidated regenerated

- cellulose on wound healing reaction after glaucoma filtration surgery: a comparative study with Interceed and Surgicel. *Indian journal of ophthalmology*. 2008;56(2):109-14.
88. Varkey M, Ding J, Tredget EE. Fibrotic remodeling of tissue-engineered skin with deep dermal fibroblasts is reduced by keratinocytes. *Tissue engineering Part A*. 2014;20(3-4):716-27.
 89. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971;27(5):549-50.
 90. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *The Journal of cell biology*. 1994;124(4):401-4.
 91. Helary C, Ovtracht L, Coulomb B, Godeau G, Giraud-Guille MM. Dense fibrillar collagen matrices: a model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*. 2006;27(25):4443-52.
 92. Carlson MA, Longaker MT. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound repair and regeneration*. 2004;12(2):134-47.
 93. Ehrlich HP, Krummel TM. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound repair and regeneration*. 1996;4(2):203-10.
 94. Ehrlich HP. Wound closure: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye*. 1988;2(2):149-57.
 95. Trebault A, Chan EK, Midwood KS. Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochemical Society Transactions*. 2007;35(4):695-7.
 96. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protocols*. 2007;2(2):329-33.
 97. Umeki H, Tokuyama R, Ide S, Okubo M, Tadokoro S, Tezuka M, et al. Leptin promotes wound healing in the oral mucosa. *PloS one*. 2014;9(7):e101984.
 98. Fu X, Xu M, Liu J, Qi Y, Li S, Wang H. Regulation of migratory activity of human keratinocytes by topography of multiscale collagen-containing nanofibrous matrices. *Biomaterials*. 2014;35(5):1496-506.
 99. Rassa PC, Serventi A, Giannardi E, Ferrero I, Tava P. Use of oxidized and regenerated cellulose polymer in oncological breast surgery. *Annali italiani di chirurgia*. 2013;84(ePub).
 100. Krishnan LK, Mohanty M, Umashankar PR, Lal AV. Comparative evaluation of absorbable hemostats: advantages of fibrin-based sheets. *Biomaterials*. 2004;25(24):5557-63.
 101. Sprangler D. In vitro antimicrobial activity of Oxidized Regenerated Cellulose Against Antibiotic-Resistant Microorganisms. 2003.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der Wundheilung.....	7
Abb. 2: Oxidation von Cellulose.	11
Abb. 3: Mikroskopische Aufnahmen von oxidiertem nicht-regenerierter Cellulose und oxidiertem regenerierter Cellulose.	12
Abb. 4: Vorbereitung der oxidierten Cellulosematerialien.....	24
Abb. 5: Schemazeichnung des Zellviabilitätsassay	28
Abb. 6: Kontraktionsassay-Prinzip.....	30
Abb. 7: Fotodokumentation von Kollagen I Matrizen mit enthaltenen Fibroblasten.	31
Abb. 8: Dokumentation des Migrationsverhaltens der Fibroblasten	33
Abb. 9: pH-Wert-Entwicklung über 14 d mit zugesetzter oxidiertem Cellulose..	35
Abb. 10: pH-Wert-Entwicklung mit NaCl.....	36
Abb. 11: pH-Wert-Entwicklung des angesäuerten Kulturmediums.	37
Abb. 12: Durchschnittliches Zellwachstum pro Tag in den Zeiträumen zwischen d 0-7 und d 7-14.	39
Abb. 13: Durchschnittliches Zellwachstum pro Tag zwischen d 0-7 und d 7-14, Vergleich angesäuertes Kulturmedium gegen oxidierte Cellulose. ..	40
Abb. 14: Veränderung der Fläche von Kollagen I Matrizen.	42
Abb. 15: Veränderung der Fläche von Kollagen I Matrizen verglichen mit der Kontrolle und den Kulturmedien mit angepassten pH-Werten.....	43
Abb. 16: Migrationsverhalten von Fibroblasten über einen 500 µm breiten Spalt	45
Abb. 17: Migrationsverhalten, Vergleich von oxidierten Cellulosematerialien und angesäuertem Kulturmedium.	46

Danksagung

Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Hubert Schelzig danke ich für die Möglichkeit in seiner Klinik diese Doktorarbeit erstellen zu können und für die herzliche Mitbetreuung als Doktorvater. Darüber hinaus möchte ich mich für das große Vertrauen in meine Person und die besondere Unterstützung bedanken.

Herrn PD Dr. med. Florian Simon danke ich sehr für die Möglichkeit in seinem Labor die Versuche durchführen zu dürfen. Ich danke zudem dafür, dass ich die Ergebnisse auf Kongressen vorstellen konnte, wodurch ich wertvolle Erfahrungen machen durfte.

Herrn PD Dr. med. Alexander Oberhuber danke ich für die Überlassung des praxisnahen und spannenden Themas. Seine Anregungen und kritische Reflexion waren für die Entwicklung des Projektes enorm wichtig.

Herrn Dr. med. Markus Udo Wagenhäuser danke ich vielmals für die intensive Betreuung. Seine enthusiastische Einstellung zur Forschungsarbeit war sehr inspirierend und weckte auch in mir die Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten. Der freundschaftliche Umgang und die unkomplizierte Kommunikation waren einmalig.

Besonders möchte ich Frau Dr. rer. nat. Wiebke Ibing danken, die mich in die Grundlagen der Laborarbeit einführte und mit ihren Ideen, vor allem im Hinblick auf die Umsetzbarkeit von Experimenten, wesentlich zum Fortschritt der Arbeit beigetragen hat. Ihre differenzierten Anmerkungen sowie moralischer Beistand halfen sehr bei der Anfertigung und Vollendung dieser Arbeit.

Zudem danke ich Frau Astrid Hoffmann für ihre zahlreichen Ratschläge zum Arbeiten im Labor, wodurch sie mit ihrer Erfahrung einen wesentlichen Beitrag zu meinem Lernzuwachs leistete. Ihre freundliche Art war nahezu ansteckend.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei allen Doktoranden des Gefäßbiologischen Labors für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre. Dadurch wurde das Labor zu einem Ort, den ich gerne aufsuchte. Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Frau cand. med. Laura Timbul, die stets für aufbauende Gespräche bereitstand.

Weiterhin möchte ich meiner Mutter, meinem Vater, meiner Schwester und meinem Bruder für die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums, auf die ich mich immer verlassen konnte, danken.

Frau cand. med. Pireyatharsheny Sivasubramaniam danke ich dafür, auch in schwierigen Phasen immer an meiner Seite gestanden zu haben. Ich bin dankbar für den Rückhalt, wie es ihn nur einmal geben kann.

Eidesstattliche Versicherung

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

Düsseldorf den 08.06.2017

Joscha Udo Nikolaus Mulorz