

Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.- Prof. med. Hubert Schelzig

Anwendung und Effektivität von gelatinebasierten Hämostyptika auf  
die Fibroblasten in der Wundheilung

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

vorgelegt von

Waseem Garabet

2019

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. Alexander Oberhuber

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

## Widmung

An meinen Vater, der mich dazu motiviert hat,  
aber es nicht mehr erleben konnte

Teile dieser Arbeit wurden zur Publikation angenommen:

Wagenhäuser M, Garabet W, van Bonn M, Ibing W,  
Mulorz J, Hyun RY, Spin J, Dimopoulos D, Oberhuber A, Schelzig H, Simon F

Time-dependent effects of cellulose and gelatin-based hemostats on cellular  
processes of wound healing

Archives of Medical Science

## Zusammenfassung

Lokal applizierbare Hämostyptika kommen bei chirurgischen Eingriffen regelmäßig zum Einsatz. Wundheilungsstörungen nach chirurgischen Eingriffen sind ein häufiges klinisches Problem. Eine essentielle Rolle in der Wundheilung spielen die Fibroblasten, wobei sie durch spezifische Subprozesse wie Migration, Proliferation, Viabilität, Kontraktion und die Produktion regulativer Wachstumsfaktoren den Wundheilungsprozess steuern.

Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, ob das Hämostyptikum GELITA TUFT-IT® (TUFT-IT®), das als Gelatine-Fibrillar für eine kontrollierte Blutstillung eingesetzt wird, die Fibroblastenfunktion beeinflusst. Hierzu wurden die Viabilität, die Proliferation, die Migration und die Kontraktion der Fibroblasten in Anwesenheit von TUFT-IT® zu unterschiedlichen Einwirkzeiten in-vitro untersucht. Auch der Einfluss auf den pH-Wert in der Zellkultur sowie die Expression wundheilungsrelevanter Wachstumsfaktoren (VEGF, TGF- $\beta$ , b-FGF und TNF- $\alpha$ ) wurden überprüft. Die resultierenden Daten zeigten, dass die Fibroblastenviabilität, -migration und -kontraktion durch TUFT-IT® nicht beeinflusst werden. Die Anwendung von TUFT-IT® hatte ebenso keinen Einfluss auf den pH-Wert der Zellkultur mit Fibroblasten. Nur die Fibroblastenproliferation wurde durch Anwendung von TUFT-IT® nach 7 Tagen signifikant gehemmt.

Durch die Anwendung von TUFT-IT® wurde die Expression des VEGF signifikant gefördert, während es auf die Expression von anderen untersuchten Wachstumsfaktoren keinen Einfluss hatte.

Nach Zusammenschau der Ergebnisse erscheint Gelatine (TUFT-IT®) - ausgenommen seiner Wirkung auf die Fibroblastenproliferation nach siebentägiger Anwendung - keine hemmende Wirkung auf die zelluläre Subprozesse der Wundheilung auszuüben. Daher könnte Gelatine (TUFT-IT®) von Vorteil für die chirurgische Wundheilung sein.

## Abstract

Hemostats are regularly used in surgical procedures. Wound healing disorders after surgery are a common clinical problem. Fibroblasts play an essential role in wound healing, controlling the wound healing process through specific sub-processes such as migration, proliferation, viability, contraction and the production of regulatory growth factors.

The aim of this study was to investigate the effect of the hemostat GELITA TUFT-IT® (TUFT-IT®), which is used as a gelatin fibrillar for controlled hemostasis, on fibroblasts. The viability, proliferation, migration and contraction of fibroblasts in the presence of TUFT-IT® at various exposure times were investigated in vitro. Its influence on the pH value in cell culture and the expression of growth factors relevant for wound healing (VEGF, TGF- $\beta$ , b-FGF and TNF- $\alpha$ ) were also investigated. The results showed that fibroblast viability, migration and contraction are not affected by TUFT-IT®. The application of TUFT-IT® also had no influence on the pH value of the cell culture with fibroblasts. Only fibroblast proliferation was significantly inhibited by the use of TUFT-IT® after 7 days.

The application of TUFT-IT® significantly promoted the expression of VEGF and did not influence the other growth factors investigated.

In summary, gelatin (TUFT-IT®) - with the exception of its effect on fibroblast proliferation after seven days of use - does not appear to have any inhibitory effect on the cellular sub-processes of wound healing. Gelatin (TUFT-IT®) could therefore be advantageous for surgical wound healing.

# Abkürzungsverzeichnis

**°C** Grad Celsius

**%** Prozent

**Σ** Sigma (Summenzeichen)

**α-SMA** Alpha-smooth muscle actin

**μg** Mikrogramm

**μl** Mikroliter

**μm** Mikrometer

**μM** Mikromolar

**bzw.** Beziehungsweise

**ca.** zirka

**cm** Zentimeter

**cm<sup>2</sup>** Quadratzentimeter

**CO<sub>2</sub>** Kohlenstoffdioxid

**d** Tag(e)

**DPBS** Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

**ddH<sub>2</sub>O** doppelt destilliertes, steriles Wasser

**DMEM** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO** Dimethylsulfoxid

**EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure

**EGF** Epidermal Growth factor

**ELISA** Enzyme-linked Immunosorbent Assay

**ECM** extrazelluläre Matrix

**FCS** fetal calf serum (fetales Kälberserum)

**FGF** fibroblast growth factor

**g** Erdbeschleunigung

**g** Gramm

**h** Stunde(n)

**IGF** Insulin-like growth factor

**IL** Interleukin

**M** Molar

**mg** Milligramm

**min** Minuten

**ml** Milliliter

**mm** Millimeter

**mm<sup>2</sup>** Quadratmillimeter

**mM** Millimolar

**MMPs** Matrixmetalloproteinasen

**n=** Probenanzahl

**NaCl** Natriumchlorid

**ng** Nanogramm

**NHDF** adulte normal human dermal Fibroblasts

**nm** Nanometer

**O<sub>2</sub>** Sauerstoff

**ONRC** Oxidierte nicht-regenerierte Cellulose

**ORC** Oxidierte regenerierte 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- $\beta$**  transforming growth factor beta

**TIMPs** tissue inhibitors of metalloproteinases

**TNF-  $\alpha$**  Tumor-Nekrose-Faktor alpha

**U** Unit (Einheit)

**u.a.** unter anderen

**US** united states (amerikanisch)

**VEGF** vascular endothelial growth factor

**Vf** Verdünnungsfaktor

**z.B.** zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Physiologie der Wundheilung</i>	1
1.1.1 Phasen der Wundheilung	2
1.1.2 Die Rolle der Wachstumsfaktoren in der Wundheilung	7
1.1.3 Die Rolle der Extrazellulären Matrix in der Wundheilung	8
1.1.4 Die Rolle der Fibroblasten in der Wundheilung	9
1.1.5 Die Rolle von Kollagen in der Wundheilung	10
1.2 <i>Wundheilungsstörungen</i>	11
1.2.1 Überblick und wichtige Faktoren	11
1.2.2 Postoperative Wundheilungsstörungen	12
1.3 <i>Gelatine und Gelatinebasierte Hämostyptika</i>	13
1.3.1 Gelatine	13
1.3.2 Gelatinebasierte Hämostyptika	14
1.3.3 Effekte der gelatinebasierten Hämostyptika auf die Wundheilung	15
<b>2. Fragestellung</b>	<b>17</b>
<b>3. Material</b>	<b>18</b>
3.1 <i>Hämostyptikum</i>	18
3.2 <i>Zellline und Medium</i>	18
3.3 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	19
3.4 <i>Chemikalien</i>	20
3.5 <i>Laborgeräte</i>	21
3.6 <i>Software</i>	22
3.7 <i>ELISA</i>	22
<b>4. Methoden</b>	<b>23</b>
4.1.1 Auftauen der Zellen	23
4.1.2 Zellkultivierung	23
4.1.3 Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauerzählkammer	24
4.1.4 Zellkonservierung	24
4.2 <i>Aufbau der Versuche</i>	25
4.2.1 Versuchsvorbereitungen	25
4.2.2 Zellviabilitätsassay	25
4.2.3 Proliferationsassay	26
4.2.4 Migrationsassay	26
4.2.5 pH- Wert Bestimmung und Beobachtung des TUFT-IT® Zerfalls	27
4.2.6 Kontraktionsassay	29
4.2.7 Scratch assay	30
4.2.8 Zellernte und Proteinisolation	30
4.2.9 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford:	31
4.2.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
4.3 <i>Statistische Auswertung</i>	33
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>34</b>
5.1 <i>Einfluss auf die Zellviabilität (Viabilitätsassay)</i>	34
5.2 <i>Einfluss auf die Zellproliferation</i>	37
5.3 <i>Einfluss auf die Zellmigration</i>	39

5.4	<i>pH-Messungen und TUFT-Zerfall</i> .....	41
5.4.1	<i>pH-Messungen von Zellkulturmedium unter TUFT-IT® Applikation</i> .....	41
5.4.2	<i>pH-Messungen von Zellkulturmedium mit Zellen ohne und mit Zugabe von TUFT-IT®</i> .....	42
5.4.3	<i>TUFT-IT® Zerfall im Zellkulturmedium</i> .....	44
5.5	<i>Kontraktionsassay</i> .....	45
5.6	<i>ELISA-Ergebnisse</i> .....	47
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>49</b>
6.1	<i>Zellviabilität und -proliferation</i> .....	49
6.2	<i>Zellmigration</i> .....	52
6.3	<i>pH-Messungen</i> .....	54
6.4	<i>Zellkontraktion</i> .....	56
6.5	<i>Die Wirkung auf Wachstumsfaktoren (ELISA)</i> .....	57
<b>7.</b>	<b>Schlussfolgerung</b> .....	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>64</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>65</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Physiologie der Wundheilung

Der Terminus Wunde (lateinisch vulnus, griechisch trauma) wird als eine Gewebedurchtrennung von Haut, Schleimhäuten oder Organen definiert. Woraus eine Zerstörung der Barriere resultiert, die durch die menschliche Haut als Schutz vor schädlichen Einflüssen aus der Umwelt gebildet wird. Der Organismus versucht diese Zerstörung durch Reparaturmechanismen zu beheben.

Diese Reparaturmechanismen werden als Wundheilung bezeichnet und umfassen in Phasen ablaufende physiologische Vorgänge zur Regeneration von zerstörtem Gewebe bzw. zum Verschluss einer Wunde, insbesondere zur Neubildung von Bindegewebe und Kapillaren.

Die Physiologie des Wundheilungsprozesses besteht aus einem Gesamtkomplex zellulärer Interaktionen, innerhalb derer die intrinsische und extrinsische Gerinnungskaskade, die Regulation des pH-Wertes in der Wunde, sowie spezifische Zytokine und Wachstumsfaktoren eine tragende Rolle spielen[1].

Der Verlauf der Wundheilung lässt sich in mehrere koordiniert ablaufenden und interagierenden Vorgänge gliedern: Hämostase, Entzündungsphase, Proliferationsphase u.a. Bildung von Granulationsgewebe und Angiogenese, Reepithelisierung und Remodellierungsphase[2].

### 1.1.1 Phasen der Wundheilung

- *Hämostase:*

An den Wänden der verletzten Gefäße haften sich umgehend Thrombozyten an. Am Ende der Gerinnungskaskade katalysiert das Enzym Thrombin die Synthese von langkettigen Fibrinpolymeren aus wasserlöslichen Fibrinogenpeptiden[3]. Die Thrombozyten werden dabei förmlich in ein dreidimensionales Fibrinnetzwerk eingewoben, in das auch andere Blutzellen (z.B. Erythrozyten, neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) aufgenommen werden. Das resultierende Blutgerinnsel füllt schließlich den gesamten Wundspalt aus und bildet eine provisorische Matrix für die nachfolgende Haftung, Wanderung und Proliferation von Zellen zu Beginn des Reparatonsprozesses[4].

Durch Austrocknung der Oberfläche entsteht ein fester Wundschorf, der gleichsam als provisorischer „biologischer Verband“ die Wunde verklebt und schützt. Thrombozyten innerhalb des Blutgerinnsels sind nicht nur verantwortlich für die Hämostase, sie sezernieren auch zahlreiche Wundheilungsmediatoren (z.B. Platel-Derived Growth Factor (PDGF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Epidermal Growth Factor (EGF) und Transforming Growth Factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$ 1)[5, 6]. Diese Wachstumsfaktoren leiten die Wundheilungskaskaden ein, indem sie Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen ins Wundgebiet dirigieren und dort aktivieren. Ebenso wirken bestimmte Abbauprodukte der Extrazellulären Matrix (z.B. Kollagen- und Elastinfragmente) chemotaktisch[2, 7].

- *Entzündungsphase:*

Durch Zytokine und Wundheilungsmediatoren werden Leukozyten an die Verletzungsstelle rekrutiert. Infiltrierende neutrophile Granulozyten sezernieren proteolytische Enzyme und phagozytieren Bakterien und den Zelldetritus. Parallel dazu setzen sie Zytokine frei, die Makrophagen, Keratinozyten und Fibroblasten aktivieren. Abschließend werden sie mit dem Exsudat und Debris an der Wundoberfläche ausgeschieden oder von Makrophagen phagozytiert.

Auch Monozyten infiltrieren in das Wundgebiet und differenzieren durch die Bindung über Integrinrezeptoren an Kollagen- oder Fibronektinfragmente zu Makrophagen. Die Makrophagen setzen wiederum Kollagenasen, Matrixmetalloproteinasen und Elastasen zum Débridement frei und produzieren Nitritoxid und freie Sauerstoffradikale. Außerdem werden zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktor von ihnen sezerniert, die wiederum die Bildung von Granulationsgewebe aktivieren (s. Abbildung (1) ).

Zu diesen Zytokinen und Wachstumsfaktoren gehören z.B. Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-  $\alpha$ ), PDGF, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), TGF-  $\alpha$  und - $\beta$ , Interleukin1, Interleukin 6, IGF- $\beta$  und Fibroblast Growth Factor (FGF). Unterstützt werden sie, sowohl in der inflammatorischen als auch in der proliferativen Aufgabe, von T- und B-Lymphozyten und Mastzellen[2, 8-10].

Somit spielen Makrophagen eine essentielle Rolle bei dem Wundheilungsprozess. In diesem Rahmen zeigte eine tierexperimentelle Studie eine verlangsamte Wundheilung bei Tieren mit eliminierten Makrophagen[11].



⇒ Fibroblastenmigration:

Ca. 3 Tage nach der Verletzung beginnt die Fibroblastenmigration. PDGF, TGF- $\beta$  und bFGF stimulieren die Fibroblastenmigration [12]. Die Fibroblasten produzieren nun wichtige Matrixproteine wie Hyaluronsäure, Fibronectin, Proteoglykane und Präkollagen Typ 1 und Typ 3 [13].

⇒ Angiogenese:

Die Neovaskularisation wird ebenfalls durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- $\beta$ , bFGF und VEGF stimuliert. Anders als TGF- $\beta$ , das die Angiogenese hauptsächlich in den ersten 3 Tagen der Wundheilung aktiviert, scheint VEGF erst ab dem 7. Tag auf die Angiogenese zu wirken [14]. Andere Faktoren wie Hypoxie oder ein saurer pH-Wert können ebenfalls die Angiogenese stimulieren[7].

⇒ Kontraktion:

Migrierende Fibroblasten üben Zugkräfte auf die Kollagenmatrix aus und produzieren Kollagen.

Während der zweiten Woche der Wundheilung differenzieren sich die Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche durch große Bündel von actinhaltigen Mikrofilamenten gekennzeichnet sind. (Myo-)fibroblasten sezernieren TGF- $\beta$ 1, Fibronectin und  $\alpha$ -smooth muscle actin. Parallel bauen sie Kollagen und andere Komponente der extrazellulären Matrix (ECM) durch Proteasen ab. Dieser komplexe Prozess erstreckt sich über die Proliferations- und Remodellierungsphase und führt zur Kontraktion der Kollagenmatrix mit entsprechendem Wundverschluss [15].

In der Proliferationsphase erzeugen letztendlich die Fibroblasten und Endothelzellen das Granulationsgewebe. In der Abbildung (2) ist die Proliferationsphase bis zur Bildung von Granulationsgewebe schematisch dargestellt.



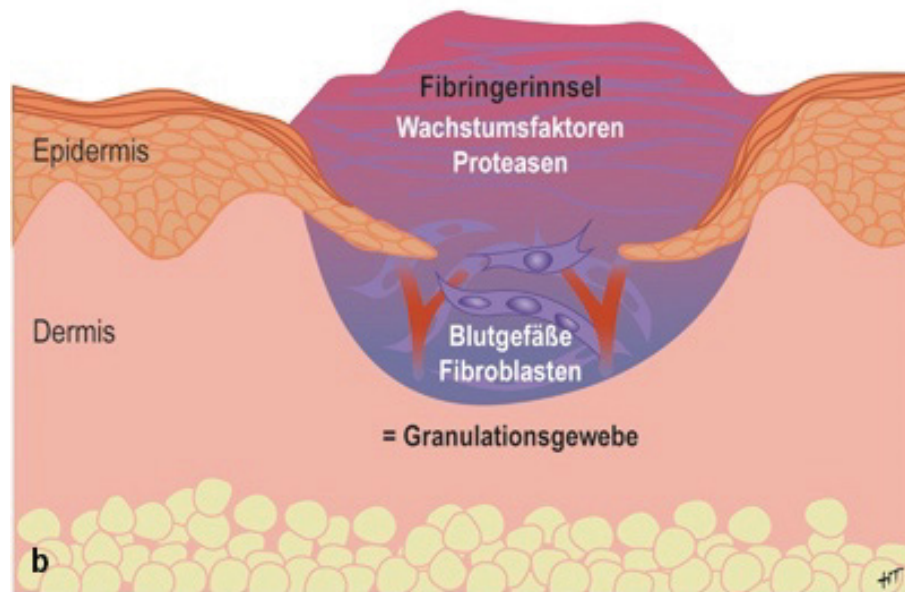


Abbildung (2) Schematische Darstellung der Wundheilung während der Proliferationsphase [10].  
(Adaptiert nach[7])

- *Remodellierungsphase:*

Die letzte Phase der Wundheilung ist die Umbauphase, welche für die Narbenbildung verantwortlich ist. Sie kann bis zu 2 Jahre dauern. Das Ziel ist hierbei ein Gleichgewicht zwischen Abbau- und Synthesemechanismen in der Wunde zu bewahren, um eine komplette Abheilung zu erreichen.

In dieser Phase wird Kollagen Typ III zunehmend abgebaut und durch Kollagen Typ I ersetzt. Die Kollagensynthese wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 und FGF reguliert.

Während der Remodellierung kommt es zu Reduktion der Hyaluron- und Fibronektinsäuren, die von Zellen und plasmatischer Metalloproteinase abgebaut werden.

Die Kollagenfasern werden dicker und parallel angeordnet, was zu einer erhöhten Zugfestigkeit des Gewebes führt.

Durch die Apoptose von Fibroblasten und deren Differenzierung zu Myofibroblasten kommt es zur Bildung der Narbe. Die Myofibroblasten, die  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) stark exprimieren, spielen bei der Wundkontraktion eine entscheidende Rolle.

Der lokale Metabolismus passt sich unter Ausbildung einer mehr oder minder großen Narbe schließlich der Umgebung vollständig an[2, 16, 17].

### 1.1.2 Die Rolle der Wachstumsfaktoren in der Wundheilung

Der Wundheilungsprozess wird durch eine Vielzahl von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen gesteuert.

Wachstumsfaktoren sind konstitutiv vorliegende Mediatoren, die auf Fibroblasten wirken, um die Wundheilung zu modulieren, indem sie die Proteinproduktion, die Synthese von Extrazellulärer Matrix und die Apoptose stimulieren. Sie sind in der Lage, zelluläre Funktionen endokrin, parakrin, autokrin oder intrakrin zu beeinflussen[9].

Die essentielle Rolle der Wachstumsfaktoren und Zytokine als Regulatoren der Wundheilung wurde durch die Expression multipler Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen der Hautwunden nachgewiesen[18].

Die Wachstumsfaktoren in der Wundheilung werden in fünf Hauptgruppen gegliedert: PDGF, wozu auch der VEGF gehört, EGF, FGF, TGF und IGF. Im Folgenden wird über die Rolle der wichtigsten Wachstumsfaktoren berichtet.

PDGF wird von Blutplättchen, Makrophagen, thrombinstimulierten Endothelzellen, glatten Muskelzellen geschädigter Arterien, Fibroblasten, sowie durch epidermale Keratinozyten sezerniert. Er weist eine chemotaktische Wirkung bei der Zellmigration auf. Zusätzlich fördert er die Proliferation von Fibroblasten und die Produktion von extrazellulärer Matrix. Schließlich regt PDGF die Fibroblasten an, Kollagen-Matrizen zu kontrahieren[19]. So zeigte eine In-vivo-Studie, dass die direkte Anwendung von PDGF in Ratten zu einer verstärkten Bildung von Granulationsgewebe führte[20].

VEGF gehört zur PDGF-Familie und spielt in der Angiogenese eine wichtige Rolle. Es ist in der Lage proliferative und chemotaktische Reaktionen von Endothelzellen hervorzurufen[21].

EGF wirkt chemotaktisch und stimuliert die Funktion der Epithel- und Endothelzellen sowie der Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Er aktiviert ebenso die Angiogenese und die Kollagensynthese[20, 22].

Bei FGF unterscheidet man zwei verschiedene Formen: eine saure (acid) (aFGF) und eine basische (bFGF) Form. Beide sind zu 50% homolog. Sowohl aFGF als auch bFGF stimulieren die Endothelzellproliferation und tragen zur Angiogenese bei.

Zusätzlich stimuliert bFGF die Kollagensynthese, Wundkontraktion, Epithelisierung und Fibronectin- und Proteoglycansynthese[22].

Ebenso hat TGF- $\beta$  eine positive Wirkung auf die Wundheilung. Es aktiviert die Angiogenese, die Proliferation und die Kollagensynthese der Fibroblasten[23]. Außerdem stimuliert es die Ausschüttung anderer Wachstumsfaktoren (FGF, PDGF, TNF- $\alpha$  und IL-1) durch Monozyten, wirkt auf Makrophagen chemotaktisch und reguliert deren Produktion autokrin. Auch über die Regulation von Kollagenasen, Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) und Fibronectinsynthese spielt es eine wichtige Rolle in der Wundheilung[24, 25].

### 1.1.3 Die Rolle der Extrazellulären Matrix in der Wundheilung

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist die größte Komponente der Hautschicht und die Synthese von ECM ist ein Schlüsselmerkmal der Wundheilung.

Bestandteile der ECM spielen eine wichtige Rolle in der normalen Wundheilung und eine Zerstörung von ECM-Komponenten beeinträchtigt die Heilung. Dies hat zur Entwicklung neuer Therapien geführt, die darauf abzielen, die Zerstörung von ECM zu reduzieren oder beschädigte ECM wiederherzustellen[26].

Im Zusammenhang mit der Wundheilung kann die ECM in vier Hauptgruppen unterteilt werden: (1) Strukturproteine wie die Kollagene und Elastin; (2) Adhäsive Glycoproteine wie Fibronectin, Vitronectin und Laminin; (3) Glycosaminoglycane wie Hyaluronan und Proteoglycane, Syndecans, Glypicane und Perlecan und (4) matrizelluläre Proteine wie Thrombospondin 1 und 2, Tenascin C und X und Osteopontin[27].

Zwischen der ECM und den Wachstumsfaktoren der Wundheilung herrschen sowohl direkte als auch indirekte Interaktionen, die das Ziel haben, Wachstumsfaktoren zu aktivieren oder zu hemmen.

Direkte physikochemische Wechselwirkungen zwischen Wachstumsfaktoren und Komponenten der ECM können die Effektivität vieler Wachstumsfaktoren aktivieren oder hemmen und somit letztendlich den Wundheilungsprozess beeinflussen. Zum Beispiel bindet sich Decorin, ein Proteoglycan der ECM, an TGF- $\beta$  und beeinflusst dessen Aktivität durch eine negative Rückkopplung. TGF- $\beta$  stimuliert dagegen die Synthese von Decorin[28]. Indirekte Interaktionen zwischen der ECM und den Wachstumsfaktoren erfolgen über Integrin-Rezeptoren, die für die Zelladhärenz verantwortlich sind. Darüber hinaus können Teilkomponente von ECM-Proteinen, die als Matrikine bezeichnet werden, direkt mit Zytokin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren[29, 30].

Auch Wachstumsfaktoren regulieren die ECM, indem sie Zellen stimulieren, die die Produktion von ECM-Komponenten erhöhen oder die Produktion von Matrix-abbauenden Proteasen und ihren Inhibitoren regulieren. Zusammenfassend sind ECM-Wachstumsfaktor-Wechselwirkungen bidirektional und voneinander abhängig[27].

### 1.1.4 Die Rolle der Fibroblasten in der Wundheilung

Fibroblasten sind spindelförmige Zellen, die aus mesenchymalen Zellen stammen. Sie bilden eine heterogene Zellpopulation, die eine wichtige Rolle bei der Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Elastin, Glykoproteine wie Fibronectin und Glykosaminoglykanen spielt. Die Fibroblasten sind in der Lage, ein komplexes ECM-Netzwerk, zu organisieren.

Sie sezernieren, wie andere in der Wundheilung beteiligte Zelltypen (Endothelzellen, Makrophagen), auch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) wie Kollagenasen und ihre Inhibitoren tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). In Kombination mit der ECM-Synthese reguliert das Gleichgewicht zwischen diesen Proteasen und ihren Inhibitoren die mechanischen Hauteigenschaften und den ECM-Umbau, nicht nur in der gesunden Haut, sondern auch in Wunden.

Während der Wundheilung wandern die Fibroblasten in die verletzte Zone, proliferieren und synthetisieren ECM-Komponente. Anfänglich verwenden Fibroblasten die fibrinvernetzenden Fasern, die am Ende der entzündlichen Phase gut ausgebildet sind, um über die Wunde zu wandern und anschließend an Fibronectin zu haften. Das Kollagen lagert sich vermehrt in dem Wundgrund ab, was zur Bildung eines komplizierten ECM-Netzwerkes führt, an dem die Fibroblasten haften können, ihre Migration fördern und die endgültige Bildung des Granulationsgewebes ermöglichen[31]. Die Fibroblasten modifizieren später unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  zu Myofibroblasten. Aufgrund ihrer starken kontraktilen Kräfte spielen die Myofibroblasten eine aktive Rolle bei der Wundkontraktion [32]. Die (Myo-) Fibroblasten sind für die Produktion von ECM-Komponenten, einschließlich Kollagene und Elastin, verantwortlich, die der ECM Stärke und Widerstandsfähigkeit verleihen.

### 1.1.5 Die Rolle von Kollagen in der Wundheilung

Kollagen bestimmt als Strukturprotein die mechanischen Eigenschaften des Bindegewebes und bildet im Rahmen der Wundheilung die Basis eines widerstandsfähigen Wundverschlusses. Das stabförmige Kollagenmolekül besteht aus drei Polypeptidketten ( $\alpha$ -Ketten), die zu einer Tripelhelix verknüpft sind. Die Enden der  $\alpha$ -Ketten bilden kurze, globuläre Abschnitte, die nicht an der Helixbildung beteiligt sind und als Telopeptide bezeichnet werden. Es lassen sich verschiedene Kollagentypen differenzieren (Typ I/ II/III/IV etc.), die im Körper ein charakteristisches Verteilungsmuster aufweisen. [33].

Während der Hämostase und Inflammationsphase bewirkt Kollagen die physikalische Blutstillung, die Absorption des Wundexsudats mit entzündungsinduzierenden Proteasen und Zytokinen und damit die Reinigung der Wunde und die Änderung des Wundmilieus. In der Granulationsphase entwickeln die Kollagensysteme ein heilungsförderndes feuchtes Wundklima, bewirken Fibroblastenstimulation, gesteigerte Kollagensynthese, Granulationsanregung und damit Stimulierung der Reparatur. In der Epithelisierungsphase wird die Migration und Proliferation epidermaler Zellen und damit die Reepithelisierung beschleunigt[34].

### 1.2 Wundheilungsstörungen

#### 1.2.1 Überblick und wichtige Faktoren

Wunden, die eine beeinträchtigte Heilung aufweisen, haben im Allgemeinen die normalen Heilungsphasen nicht überstanden. Nicht heilende Wunden betreffen etwa 3 bis 6 Millionen Menschen in den Vereinigten Staaten und führen zu enormer ökonomischer Belastung mit geschätzten Gesamtkosten von mehr als 3 Milliarden US-Dollar pro Jahr[35].

Weltweit leiden circa ein bis zwei Prozent der Bevölkerung an Wunden mit gestörtem Heilungsverlauf, oft auf dem Boden einer zugrunde liegenden Erkrankung. Trotz Therapie der Grunderkrankung zeigt sich ein Teil der Wunden therapieresistent, da in der Wunde ein Milieu entstanden ist, das keine geordnete Ausbildung eines Granulationsgewebes und Epithelisierung zulässt.

Werden physiologische Wundheilungsmechanismen durch lokale Störfaktoren oder Grunderkrankungen behindert, resultieren Wundheilungsstörungen auf verschiedenen Ebenen. So kann die Kontrolle der entzündlichen Aktivität gestört sein, das Granulationsgewebe formiert sich nicht, die Wunde wird nicht kleiner, eher größer[36].

Zudem kann der Wundheilungsprozess sowohl von lokalen als auch von systemischen Faktoren negativ beeinflusst und gestört werden. Zu den lokalen Faktoren gehören z.B. mangelnde Sauerstoffversorgung des Wundgebietes und Infektionen. Systemische Faktoren sind Alter, Geschlechtshormone, Diabetes Mellitus, Alkohol, Rauchen, Stress sowie Medikamente und Vitamine[37].

Bei einer Infektion können sowohl Bakterien als auch Endotoxine die Inflammationsphase verlängern, was zu einem erhöhten Spiegel von MMPs und somit zum Abbau von ECM abbauen führen kann [35, 38].

Eine ausreichende Sauerstoffversorgung ist für eine optimale Wundheilung unerlässlich. Bei akuten Wunden werden viele Aspekte des Wundheilungsprozesses durch Hypoxie beeinflusst. Hypoxie kann die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch Makrophagen, Keratinozyten und Fibroblasten stimulieren. Als Reaktion auf die Hypoxie werden

unter anderem folgende Zytokine produziert: PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, TNF- $\alpha$  und Endothelin-1. Sie sind entscheidende Promotoren der Zellproliferation, Migration und Angiogenese in der Wundheilung [39].

### 1.2.2 Postoperative Wundheilungsstörungen

Wundheilungsstörungen haben einen großen Einfluss auf das Outcome und die stationäre Verweildauer von Patienten nach chirurgischen Eingriffen und damit auch ein großes sozioökonomisches Gewicht [32].

Postoperative Wundinfektionen stellen in Deutschland mit ca. 16% die dritthäufigste nosokomiale Infektionsrate in Akutkrankenhäuser dar[17].

In der Gefäßchirurgie sind insbesondere die inguinalen Zugangswege von Bedeutung, deren Nähe zur kontaminierten Anogenitalregion und den netzartig verlaufenden subkutanen Lymphgefäßen, welche die Wundheilung nachhaltig beeinträchtigen können[40]. Eine sich hieraus entwickelnde Wundinfektion kann rasch in die Tiefe fortschreiten und auf das implantierte (alloplastische) Patch- oder Bypassmaterial übergreifen. Derartige tiefe Gefäß- (prothesen-) infektionen können zu einer septischen Arrosionsblutung, einem Bypassverschluss oder septischen Embolien führen und gefährden nachhaltig das Revaskularisationsergebnis[41].

Auch sollte große Sorgfalt bezüglich der verwendeten ggf. in situ verbleibenden Materialien betrieben werden. So gehört unter anderem eine situativ angepasste Anwendung von Hämostyptika zur Prophylaxe, um die Wahrscheinlichkeit einer postoperativen Wundheilungsstörung möglichst gering zu halten[42].



### 1.3 Gelatine und Gelatinebasierte Hämostyptika

#### 1.3.1 Gelatine

Gelatine ist ein gereinigtes Protein, welches durch partielle Hydrolyse von Kollagen gewonnen wird.

Es unterscheidet sich in seine Struktur erheblich von herkömmlichen Eiweißen. Wie Kollagen besteht es zu ca. einem Drittel aus der Aminosäure Glycin. Auffällig ist auch der hohe Gehalt an Prolin und dem als Proteinbaustein ungewöhnlichen Hydroxyprolin. Die unausgewogene Aminosäurezusammensetzung verleiht der Gelatine einen nur geringen biologischen Wert als Nahrungsprotein.

Die Peptidketten der Gelatine besitzen, wie auch die des Kollagens, eine einzigartige helikale Struktur, die in ihren Abmessungen nicht mit der  $\alpha$ -Helix herkömmlicher Proteine identisch ist. Im Kollagen sind jeweils drei dieser Helices ihrerseits miteinander verdrillt und kovalent quervernetzt. Bei der alkalischen, nicht jedoch in vollständigem Ausmaß bei der sauren Hydrolyse, werden diese Quervernetzungen aufgebrochen, sodass einkettige Polypeptide entstehen[43]. Die Herstellung der Gelatine erfolgt durch Hydrolyse von Kollagen, hauptsächlich aus Schweineschwarten (vorzugsweise für Typ A verwendet) oder aus Kalbs- und Rinderhäuten sowie vorbehandelten Schlachtviehknochen (vorzugsweise für Typ B).

Typ A entsteht bei der Hydrolyse mit Säuren und besitzt einen isoelektrischen Punkt bei pH 7-9. Typ B entsteht durch eine alkalische Hydrolyse und besitzt einen isoelektrischen Punkt bei pH 4.7-5[43]. In der Abbildung (3) sind die zwei Methoden zur Gelatineextraktion aus kollagenhaltigen Geweben dargestellt.

Neben der Verwendung der Gelatine als Nahrungsmittel wird die historische Verwendung der Gelatine als fiebersenkendes und blutungsstillendes Medikament zusammengefasst. Auch als Bestandteil von Wundverbänden findet die Gelatine Verwendung[44].



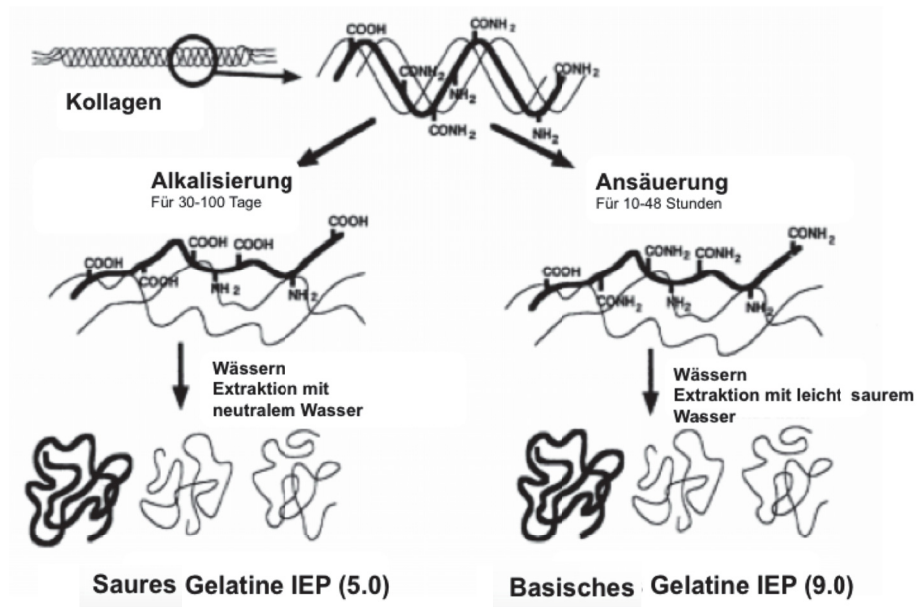


Abbildung (3) Zwei Methoden zur Gelatineextraktion aus kollagenhaltigen Geweben (adaptiert nach [45])

## 1.3.2 Gelatinebasierte Hämostyptika

Gelatine stimulieren die Hämostase durch die Aktivierung von Thrombozyten und die Bildung einer mechanischen Tamponade. Sie sind in der Regel resorbierbar und wasserunlöslich.

Gelatinebasierte Hämostyptika wurden erstmals in den 1940er Jahren eingeführt. Seit ihrer Einführung haben sie sich in ihrer grundlegenden Form nur sehr geringfügig weiterentwickelt[46].

Gelatinebasierte Hämostyptika wurden häufig und effektiv bei anorektalen Operationen, Neurochirurgie, Nasenbluten und urologischen Eingriffen verwendet.

In einem In-vitro-Blutungsmodell unter Verwendung menschlicher Venen wurde ein Gelatinebasiertes Hämostyptikum verwendet. Hier trat eine Hämostase in weniger als eine Minute nach dem Auslösen der Blutung auf. Das Hämostyptikum war innerhalb von 2 Wochen resorbiert[47].

### 1.3.3 Effekte der gelatinebasierten Hämostyptika auf die Wundheilung

Die Verwendung von Gelatine-basierten Hämostyptika kann verschiedene Nebenwirkungen hervorrufen.

In einer tierexperimentellen Arbeit wurde bei Kaninchen nach bilateraler Kraniotomie ein gelatinebasiertes Hämostyptikum subdural implantiert. Im Zeitverlauf nach 15, 43 und 92 Tagen zeigten sich keine Mortalität oder klinische neurologischen Symptome. Allerdings entwickelte sich eine granulomatöse Entzündung in dem umliegenden Gewebe[47].

In einer retrospektiven Studie wurde berichtet, dass die Krankenhausaufenthaltsdauer bei Frauen nach Sectio uteri mit intraoperativer Verwendung von gelatinebasiertem Hämostyptikum signifikant länger war. Diese konnte darauf zurückgeführt werden, dass eine Verzögerung bei der Wiederherstellung der Darmmotilität durch eine lokale Reaktion oder Dislokation des verwendeten Hämostyptikums verursacht wurde[48].

Senar et al. wiesen einen negativen Einfluss der Gelatine auf das Nervenaktionspotential nach Materialeinsatz im Rattennervengewebe nach[49]. In einer weiteren experimentellen in-vitro Studie wurde gezeigt, dass das Gelatinematerial für die Produktion von nativer ECM sowie für die TGF- $\beta$ 1-Produktion durch in situ gewachsene Fibroblasten gut geeignet ist[50].

Auch wurde die Gewebekompatibilität und die Wirkung von gelatinebasierten Hämostyptika in-vivo mit fibrinbasiertem Hämostyptikum verglichen. Bei der Anwendung zur Blutstillung im Lebergewebe konnte ein gelatinebasiertes Hämostyptikum die Blutung schnell stoppen, führte aber zur Bildung von Adhäsionen [51].

Eine weitere in-vivo Studie bedeckte den Leberstumpf nach Leberlappenresektion in einer Serie von 12 Tieren mit einem Gelatinematerial (hier Gelatineschwämme) für fünf bis zehn Minuten unter festem Druck. Es traten

keine sekundären Blutungen auf. Zwei Tiere verstarben an einer biliären Peritonitis. Es wurde berichtet dass die Gelatineschwämme die Wundheilung positiv beeinflusst haben[52]. Nach Verwendung der Gelatine bei tierchirurgischen Operationen an 44 Hunden und 6 Katzen wurden keine Überempfindlichkeitsreaktionen oder bestätigte postoperative Komplikationen im Zusammenhang mit der Verwendung von Gelatine während einer durchschnittlichen Nachbeobachtungszeit von 13 Monate festgestellt[53]. Dagegen zeigten Kang et al. 2012 in einer in-vivo Studie, dass das gelatinebasierte Hämostyptikum eine verzögerte Granulationsgewebbildung verursacht[54].

## 2. Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Hat das gelatinebasierte Hämostyptikum TUFT-IT® der Firma GELITA einen Einfluss auf die Proliferation, die Migration, die Kontraktion und die Zellviabilität humaner Fibroblasten?
  
- 2) Hat das Gelatine-basierte Hämostyptika TUFT-IT® einen Einfluss auf den pH-Wert des Zellmilieus?
  
- 3) Wird die Expression wesentlicher Wachstumsfaktoren (VEGF, TNF-  $\alpha$  TGF  $\beta$  und FGF-2) und somit deren Einfluss auf die Wundheilung durch die Anwesenheit des Gelatine-basiertem Hämostyptikums TUFT-IT® reguliert?

### 3. Material

#### 3.1 Hämostyptikum

Das Hämostyptikum GELITA TUFT-IT® (GELITA MEDICAL GmbH, Eberbach, Deutschland, s. Abbildung (4) ) wurde bei den Versuchen als Gelatine-basiertes Material eingesetzt.

Das Material wird laut dem Herstellerprotokoll aus 100% purer Schweinegelatine produziert, sei pH-neutral, wasserunlöslich und biologisch abbaubar, wobei eine vollständige Absorbierbarkeit nach 4 Wochen erreicht werden kann.



Abbildung (4) GELITA TUFT-IT®

<https://www.gelitamedical.com/Products/TUFT-IT®>

#### 3.2 Zelllinie und Medium

<b>Zelllinie</b>	<b>Medium</b>
NHDF (adulte <b>n</b> ormal <b>h</b> uman <b>d</b> ermal <b>F</b> ibroblasts) , Firma: Promocell	DMEM (1x) (Thermo Fischer Scientific) versetzt mit: 20% FCS 1% Penicillin/Streptomycin

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Autoklavierbeutel	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Einmalhandschuhe	Ansell (Brüssel, Belgien)
Falcon 50ml	Corning (New York, USA)
Kosmetiktücher	Tapira (Heidenheim, Deutschland)
Kryoröhrchen	Greiner Bio One (Kremsmünster, Deutschland)
Migrationsplatten (Cultre-Insert 2 well in $\mu$ Dish)	Sanford (Hamburg, Deutschland) ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Hecht-Assistant (Sondheim v. d. Rhön, Deutschland)
Nitrilhandschuhe	Ansell (Brüssel, Belgien)
Pipettenspitzen(1-10,10-200,10-1000 $\mu$ l)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettierhilfe Modell pipetus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Röhrchen (15, 50ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland); Greiner Bio One (Kremsmünster, Deutschland)
Serologische Pipetten (2,5,10,25ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterile Pinzette	B. Braun AG (Melsungen, Deutschland)
Sterile Schere	B. Braun AG (Melsungen, Deutschland)
Sterile Spatel	B. Braun AG (Melsungen, Deutschland)
Steriles Abdecktuch 45x75cm	Lohmann & Rauscher (Rengsdorf, Deutschland)
Zellkulturflaschen (T75, T175)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturplatten (12, 24, 96 well)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturschale (15 cm)	Greiner Bio One (Kremsmünster, Deutschland)

3.4 Chemikalien

<b>Chemikalien/Reagenzien/Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DPBS Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dulbecco's MEM (10x)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Ethanol 70%, 99,5%	Zentralapotheke Universitätsklinikum Düsseldorf (Düsseldorf, Deutschland)
fetales bovines Kälberserum (FCS)	PAN- Biotech (Aidenbach, Deutschland)
HI pH Bufferlösung pH 7.01, 4.01, 10.01	Hanna Instruments (Woonsocket, USA)
Isotone Natriumchloridlösung 0.9%	B. Braun AG (Melsungen, Deutschland)
Isopropanol	Zentralapotheke Universitätsklinikum Düsseldorf (Düsseldorf, Deutschland)
Kollagen Typ I, rat tail	Ibidi (München, Deutschland)
MTT (Thiazolylblau)	Carl Roth, (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (HCL), 1M	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Sodium Bicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ), 7,5%	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Trypan Blau 0,4%	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Trypsin 0.25%	Biochrom (Berlin, Deutschland)

## 3.5 Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugesystem Modell Vacusafe	Integra (Biebertal, Deutschland)
Arbeitsbank Modell Safe 2020	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Brutschrank Modell HeraCell 240	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Einkanalpipetten "Eppendorf Research" Volumen: 10,100,1000 µl	Eppendorf (Wessling-Berzdorf, Deutschland)
Gefrierschrank	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Stickstoff-Lagerungstank	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
IKA-Schüttler MTS 4	IKA-Labortechnik (Staufen bei Briesgau, Deutschland)
Kühlschrank	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Live Cycler Mikroskop Modell JuLi Br	NanoEnTek (Seoul, Korea)
Molecular Imager ChemiDoc™ MP System	Bio-Rad (Hercules, USA)
Multilabel Plate Reader Modell Victor X4	PerkinElmer (Waltham, USA)
Mikroskop Modell CKX41	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Notebook	Lenovo
pH- Meter Modell FE20	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Photometers NanoDrop	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Pipetten Modell Research plus 0.5-10, 10-100, 100-1000µl	Eppendorf (Wessling-Berzdorf, Deutschland)
Pipettus "Accurpette"	VWR (Radnor, USA)
Pipettus "neo Accupette 3-9905"	Neolab (Heidelberg, Deutschland)
Pipetus "HIRSCHMANN"	HIRSCHMANN (Eberstadt, Deutschland)
Tischzentrifuge "HERAEUS FRESCO 17 Centrifuge"	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tischzentrifuge "HERAEUS PICO 21" Centrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TissueLyser LT a	QiAGEN (Hilden, Deutschland)
Wasserbad Modell Wine one	Memmert (Schwabach, Deutschland)



### 3.6 Software

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
Axio Vision LE64	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Endnote X7	Thomson Reuters (New York, USA)
GraphPad 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)

### 3.7 ELISA

Für den Nachweis der Proteinregulation an den verschiedenen Zeitpunkten wurden folgende DuoSet ELISA Development System-Kits der Firma R&D Systems (Minneapolis,USA) verwendet.

<b>Protein</b>	<b>Katalog Nummer:</b>
human FGF basic (b-FGF)	DY233-05
human TGF- $\beta$ 1	DY240-05
human VEGF	DY293B-05
human TNF- $\alpha$	DY210-05

Zudem wurde das Puffer/Reagenzien-Kit DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 (Kat-Nr.: DY008) für die ELIAs von FGF basic, VEGF und TNF-  $\alpha$  verwendet. Für den ELISA von TGF-  $\beta$  wurde das Kit DuoSet Ancillary Reagent Kit 1 (Kat-Nr.: DY007) angewandt.

## 4. Methoden

### 4.1.1 Auftauen der Zellen

Die in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagerten Aliquote von jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen wurden zügig im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sich am Boden des 15 ml Röhrchens befindlichen Zellen wurden in 10 ml vorgewärmten Kulturmedium aufgenommen. Im Anschluss wurde das Pellet in eine T75 Zellkulturflasche überführt und bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 95%iger Luftfeuchtigkeit im Zellkulturbrutschrank inkubiert.

### 4.1.2 Zellkultivierung

Die Zellpassagierung erfolgte in der Regel alle 2-5 Tage bei einer Zelldichte von 80-90% Konfluenz, die täglich unter dem Mikroskop kontrolliert wurde.

Zunächst würden alle benötigten Reagenzien und Lösungen in einem Wasserbad auf  $37^\circ\text{C}$  temperiert. Anschließend folgte die Passagierung der Zellen unter einer sterilen Werkbank.

Zuerst wurde das verbrauchte Medium dekantiert. Daraufhin wurden die adhärennten Zellen mit 10 ml vorgewärmtem PBS in der Flasche vorsichtig gewaschen. Zum Lösen der Zellen aus der Zellkulturflasche wurde 2 ml Trypsin 0,25% auf die Zellen pipettiert und für ca. 3 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Anschließend erfolgte ein manuelles Klopfen zum Ablösen der Zellen von dem Flaschenboden.

Zum Abstoppen der Reaktion wurden 10 ml vorgewärmtes Medium zu der Zell/Trypsin-Lösung pipettiert. Um eventuell noch anhaftende Zellen zu lösen, wurde die Zellsuspension einige Male über den Zellkulturflaschenboden pipettiert, anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Nach der ersten Zentrifugation wurde das Medium dekantiert und das Zellpellet in 10ml PBS resuspendiert.

Es erfolgte eine zweite 5 minutige Zentrifugation bei  $200 \times g$ . Danach wurde das PBS dekantiert und das Zellpellet in 10 ml vorgewärmten Medium aufgenommen.

Zum Schluss wurde die Zellsuspension je nach der berechneten Zellzahl ausgesät.

Die weitere Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5%CO<sup>2</sup> und 95%iger Luftfeuchtigkeit im Zellkulturbrutschrank.

### 4.1.3 Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauerzählkammer

Die Zellen wurden wie in 4.1.2 beschrieben vom Zellkulturflaschenboden gelöst und zentrifugiert. Nachdem das so entstandene Zellpellet in Medium resuspendiert wurde, wurden 30 µl entnommen und mit 30 µl Trypanblau in einem 1,5 ml-Reagiergefäß vermischt. Um die Zellzahl zu bestimmen wurde das Zell- Trypanblaugemisch auf die vorbereitete Neubauer-Zählkammer gegeben und anschließend unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in den 4 Großquadranten der Zählkammer gezählt. Mit folgender Formel konnte anschließend die genaue Zellzahl pro ml bestimmt werden:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{4} * Vf * 10.000$$

$$Vf = \text{Verdünnungsfaktor} = 2$$

### 4.1.4 Zellkonservierung

Zur Konservierung wurden die Zellen zunächst wie in Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 vom Zellkulturflaschenboden gelöst, gewaschen, gezählt und in 2x10<sup>6</sup> Zellen pro ml aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min bei 200 x g) und in 1,5 ml Einfriermedium (70% DMEM, 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Abschließend wurde die Kryoröhrchen in einen Einfriermax eingebracht und hier mittels Isopropanol 1°C pro Minute kontrolliert heruntergekühlt und eingefroren. Am Folgetag konnten die Kryoröhrchen/Zellen in den Lagerungstank eingebracht werden. Die Lagerung erfolgte in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -160°C.

### 4.2 Aufbau der Versuche

#### 4.2.1 Versuchsvorbereitungen

In den Versuchsansätzen wurden in die entsprechenden Wells jeweils 1x1 cm große Stücke TUFT-IT® mit unterschiedlichen Applikationszeiten (5 min, 30 min, 60 min, 24 h, 7 d, 14 d) gegeben.

Die 1x1 cm großen Stücke TUFT-IT® 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 aufbewahrt

Im Anschluss daran wurden die Wellplatten, mit jeweils 12 Wells pro Versuchsgruppe, bis zu den Messzeitpunkten 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 7 bzw. 14 Tagen in Zellkulturbrutschrank inkubiert.

#### 4.2.2 Zellviabilitätsassay

Zunächst wurden in jedem Well einer 24 Well-Zellkulturplatte  $1 \times 10^5$  Zellen/Well in Medium ausgesät. Daraufhin wurden die Zellkulturplatte über Nacht im Zellkulturbrutschrank inkubiert, sodass die Zellen sich absetzen und am Boden der Wells adhärent werden konnten.

Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, jedes Well einmalig mit 3 ml sterilen, 37°C warmen PBS gewaschen und im Anschluss in jedes Well 3 ml frisches Medium gegeben. Anschließend wurde das Gelatinematerial wie im Kapitel 4.2.1 beschrieben dazu gefügt und je nach Versuchsansatz über die gewünschte Dauer im Zellkulturbrutschrank inkubiert.

Parallel dazu wurde aus einer MTT-Stocklösung (5mg/ml), welche bei -20°C aufbewahrt worden ist, eine MTT-Arbeitslösung (1:9) in Medium frisch verdünnt.

Um die Wells auszuwerten wurden das Medium in jedem Well entnommen und durch das gleiche Volumen MTT- Reagenz ersetzt. Im Anschluss wurden die Wellplatten erneut für 2h im Zellkulturbrutschrank bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit konnten die Mitochondrien lebender Fibroblasten das leicht rötliche

Tetrazoliumsalz in den dunkelroten Farbstoff Formazan umzuwandeln. Nach der Inkubation wird der Zellkulturplatteninhalt vorsichtig abgesaugt und anschließend wird in jeden Well 400 µl Isopropanol pipettiert.

Um eine gleichmäßige Verteilung des Formazan im Überstand zu gewährleisten wurden die Zellkulturplatten im Anschluss für 5 Minuten bei 500 rpm mit einem Schüttler bewegt.

Nun wurden die Zellkulturplatten spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm ausgewertet.

### 4.2.3 Proliferationsassay

Zunächst wurde in jedem Well einer 12 Well-Zellkulturplatte  $1 \times 10^5$  Zellen in 3 ml Medium ausgesät. Daraufhin wurden die Zellkulturplatten über Nacht inkubiert, sodass die Zellen sich absetzen und am Boden der Wells adhären konnten.

Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und im Anschluss in jedes Well 3 ml frisches Medium pipettiert. Dazu wurden Gelatinematerialien wie im 4.2.1 dazu gegeben.

An den zuvor festgelegten Messzeitpunkten (0, 3, 6, 12, 24 h 7d und 14d) wurde das Medium in jedem Well abgesaugt, jedes Well mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in jedem Well 500 µL Trypsin/EDTA 0,25%-Lösung (Gibco, ThermoFisher Scientific, USA) pipettiert und für 3 min bei 37°C inkubiert, sodass sich die Zellen von dem Wellboden ablösten. Danach wurde die Reaktion durch die Zugabe von 3 ml Medium pro Well gestoppt. Zum Schluss wurden die Zellen in jedem Well wie in 4.1.3 beschrieben gezählt und dokumentiert.

### 4.2.4 Migrationsassay

Aus einer Zellsuspension mit  $3,5 \times 10^3$  Zellen/ml wurden 70 µl in die zwei Kammern einer Migrationsplatte (µ- culture dish insert, ibidi,

Abbildung (5) ) pipettiert und anschließend über Nacht bei 37°C / 5%CO<sub>2</sub>/ 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert, sodass sich die Zellen am Boden adhären konnten.

Am nächsten Tag wurde das Insert vorsichtig mit einer sterilen Pinzette vom Boden der Petrischale gelöst und diese mit 3 ml Zellkulturmedium aufgefüllt. In den entsprechenden Ansatzgruppen wurden nun 1x1 cm große Stücke

## Methoden

TUFT-IT® mit Applikationszeiten 5 min, 30 min, 60 min und 24 h eingebracht (s. Kapitel 4.2.1). Unmittelbar nach der Zugabe des Zellkulturmediums und ggf. des TUFT-IT® wurden die Petrischalen unter einem Live Cell Imager (Firma NanoENTek, Seoul, Korea) im Zellkulturbrutschrank positioniert.

Nach dem Lösen der Inserts verbleiben zwei mit Zellen besiedelte Kompartimente von 0.22 cm<sup>2</sup> auf dem Boden der Petrischale zurück. Zwischen diesen verbleibt ein definierter 500µm (+/- 50µm) breiter, zellfreier Spalt, in welchen die Zellen in den folgenden 24 h migrieren können. Eine schematische Darstellung ist in Abb. 5 gezeigt.

Anschließend wurde über 24 h alle 3 Stunden ein Bild angefertigt und gespeichert.

Die zellbewachsene Fläche wurde mittels des Computerprogramms TScratch (CSElab ETH-Zürich, Schweiz) an den Zeitpunkten 0, 3, 6, 12 und 24 h ermittelt. Ausgewertet wurden die im Bild sichtbare mit Zellen bewachsene Fläche in Prozent.

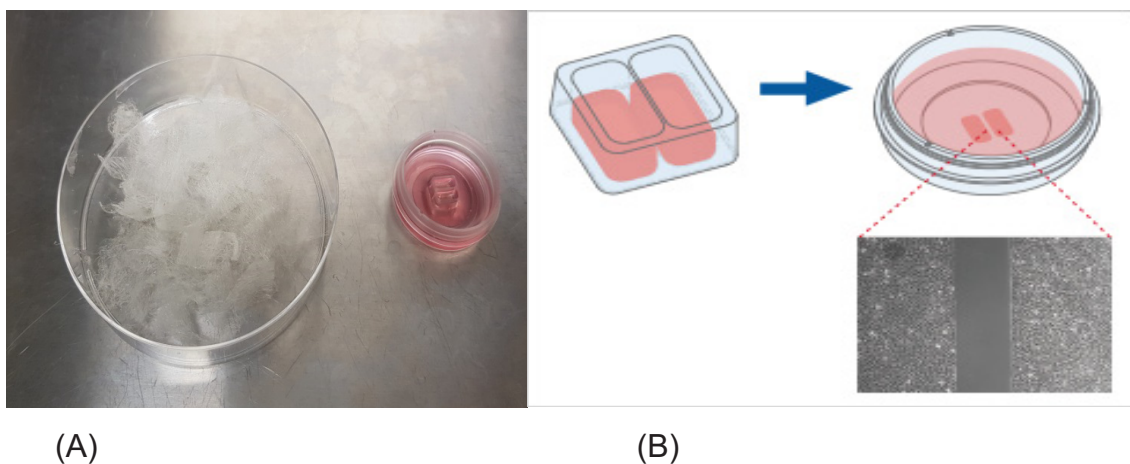


Abbildung (5) – (A): Gelita TUFT-IT® neben µ- culture dish insert, (B) µ- culture dish insert, ibidi  
Abbildung entnommen aus [www.ibidi.com](http://www.ibidi.com)

### 4.2.5 pH- Wert Bestimmung und Beobachtung des TUFT-IT® Zerfalls

In einer 12-Well Zellkulturplatte wurden pro Well  $1 \times 10^5$  Zellen in 1,5 ml Medium ausgesät. Über Nacht würden die Zellen im Zellkulturbrutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag waren die Zellen an dem Boden des Wells adhärirt. Das Medium wurde abpipettiert und jedes Well mit 2 ml PBS einmalig gewaschen. Anschließend wurden in jedes Well 3 ml neues Medium pipettiert.

In den Kontrollansätzen ohne Zellen wurde die gleiche Menge Medium in jedes Well einer neuen 12-Well Zellkulturplatte pipettiert.

Gemäß den geplanten Ansätzen wurden jeweils 1x1 cm große Stücke dem Medium der entsprechenden Wells mit Hilfe einer sterilen Pinzette (s. Kapitel 4.2.1) zugesetzt.

Letztendlich wurden die pH-Werte in insgesamt 4 Gruppen untersucht: 1) Nur Medium, 2) Medium + TUFT-IT®, 3) Zellen + Medium, 4) Zellen+ Medium+ TUFT-IT®.

Die Messungen erfolgte mit Hilfe eines pH-Meters Modell FE20, Firma Mettler-Torledo (Gießen, Deutschland) über einem Zeitraum von 14 Tagen, wobei die ersten 6 h stündlich und im Anschluss darauf nach 12 h, 24 h, 48 h, 7 und 14 Tage der pH-Wert bestimmt wurde.

Zur pH-Messung wurde die Messsonde des pH-Meters zunächst mit mittels standardisierten Pufferlösungen kalibriert, mit sterilem H<sub>2</sub>O gesäubert und in das Medium getaucht, ohne den Boden des Wells zu berühren. Nach erfolgreicher Messung eines Wells wurde die Sonde erneut mit sterilem Wasser gesäubert und anschließend mit einem sterilen Tuch abgetrocknet. Daraufhin konnte die nächste Messung erfolgen. Dieser Schritt war nötig, um eine etwaige Kontamination der Proben untereinander vorzubeugen.

Die ermittelten Werte wurden umgehend in einer Tabelle dokumentiert.

Zur Beobachtung des Zerfalls von TUFT-IT® im Zellkulturmedium wurde TUFT-IT® mit Trypsin blau angefärbt und in den Proben zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert.

### 4.2.6 Kontraktionsassay

Für diesen Versuch wurde eine Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml benötigt, welche wie in Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 beschrieben hergestellt worden ist. Die Zellsuspension wurde auf Eis gelagert. Parallel wurden die für den Versuch benötigten Reagenzien 10 Minuten auf Eis gekühlt.

In diesem Assay wurde nach dem Herstellerversuchsprotokoll vorgegangen.

In der folgenden Tabelle sind die Substanzen mit den genauen Volumina aufgeführt, um 3 Matrizen fertigzustellen und auszusäen. Somit wurde in jeder Matrix eine Menge von 1,5% Kollagen erreicht.

<b>Substanz</b>	<b>Volumen in <math>\mu</math>l</b>
10x DMEM	20
NaOH 1M	5
steriles H <sub>2</sub> O	81
NaHCO <sub>3</sub> 7.5%	4
Zellkulturmedium (1x DMEM, 20%FCS, 1% Pen/Strep)	50
Kollagen I, 5mg/ml	90
Zellsuspension ( $3 \times 10^6$ Zellen/ml)	50
$\Sigma$	<b>300</b>

Anschließend wurden jeweils 300 $\mu$ l der entstandenen Lösung in ein Well einer 24 Wellplatte luftblasen-frei pipettiert.

Zur Auspolymerisierung der Matrizen wurde die Platte für 30 min im Zellkulturbrutschrank inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach 30 Minuten wurde in jedes Well 3 ml Nährmedium pipettiert, anschließend wurden TUFT-IT® Stücke von 1x1 cm, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, hinzugefügt. In der Platte wurden parallel Kontrollgruppen ohne Hämostyptikum mitgeführt.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit im Zellkulturbrutschrank wurden die Matrizen vorsichtig mit einem sterilen, abgerundeten Spatel vom Boden gelöst und zur Dokumentation des Ausgangsumfangs ein Foto der Matrizen aufgenommen. Im Anschluss folgte eine erneute Inkubation im Zellkulturbrutschrank über 24 h,



woraufhin eine weitere Dokumentationskontrolle erfolgte. Die abschließende Fotodokumentation erfolgte nach 48h Inkubation.

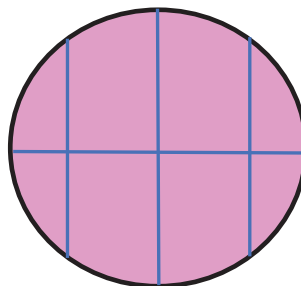
Für die Fotodokumentation wurden die Zellkulturplatte zentral unter die Kamera des Imaging Systems (ChemiDoc MP, BioRad) gestellt und mit einer Vergrößerung von 12.3 x 9.2 abfotografiert.

Nach Bearbeitung und Anpassung durch das Programm Image Lab wurde das Verhältnis der von Matrize bedeckten Fläche zur Gesamtfläche in Programm Axio Vision LE64 der Firma Zeiss gerechnet. Die Bilder wurden mit folgender Einstellung bearbeitet: High: 65535, Low: 51765, Gamma 1.18.

### 4.2.7 Scratch assay

Zunächst wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen in einer 15cm Zellkulturplatte mit 15ml Medium ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. In dieser Zeit setzten sich die Zellen ab und adhärten.

Am nächsten Tag wurde die Platte mit der Spitze einer 100µl Pipettenspitze (Sarstedt, Deutschland) 4x geritzt (s. Abbildung (6) ), je nach Versuchsansatz wurde anschließend TUFT-IT® auf die Zellen gegeben. Je nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet.



*Abbildung (6) Darstellung einer Petrischale im Scratch-Assay. Die Platte wird mit einer 100 µl Pipettenspitze wie dargestellt geritzt.*

### 4.2.8 Zellernte und Proteinisolation

Das Medium wurde vollständig von der Zellkulturplatte – ohne die Zellen zu schädigen - gesaugt. Anschließend wurde der Zellrasen dreimalig vorsichtig mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen, welches jedes Mal komplett abgesaugt wurde. Nun wurde auf Eis gearbeitet. Hierbei wurden 500 µl RIPA-Puffer zur Lyse der Zellen direkt auf den Zellrasen pipettiert und gleichmäßig verteilt. Zur weiteren

Ernte der Zellen wurden diese mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und die gesamte Flüssigkeit in einer Ecke zusammengeschoben. Die Zell-RIPA-Lösung wurde abschließend in ein 2 ml Reagiergefäß überführt und eine sterile Metallkugel dazugegeben. Die Protein-/Zell-Lösung wurde nun bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach dem auftauen der Probe auf Eis, wurde die Lösung in den Tissue Lyser der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) bei 50Hz für  $2 \times 10$  sec. homogenisiert.

Daraufhin wurde die Lösung für mindestens 30 Minuten bei 17 000g bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der klare Überstand, welcher das Protein enthält, wurde in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt.

Abschließend wurde die Proteinkonzentration im Überstand wie in dem folgenden Kapitel beschrieben bestimmt. Die Proteinlösung wurde mit Proteinase Inhibitor versetzt, in mindestens 4 Aliquots aufgeteilt und im  $-80^{\circ}\text{C}$  Schrank eingefroren.

### 4.2.9 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford:

Zunächst wurde das Bradford-Reagenz „Bio-Rad Proteinassay“ im Verhältnis 1:5 mit sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  für maximal eine Woche gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe wurden 20  $\mu\text{l}$  Probe mit 1 ml Bradford Reagenz in einem 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm mittels des Photometers NanoDrop, Thermo Fischer Scientific (Waltham,USA).

Das Absorptionsmaximum des ungebundenen Farbstoffes liegt bei dieser Methode bei 470nm. Durch eine Komplexbildung des Farbstoffes mit dem Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm, welches von uns detektiert und notiert wurde. Anhand einer zuvor durchgeführten Standardreihe mit Bovine Serum Albumin (BSA) konnte die Konzentration des Gesamtproteins in der Probe bestimmt werden.

### 4.2.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde weitestgehend nach den Protokollangaben der Firma R&D Systems für die jeweiligen DUOSet-ELISA-Development Systems für TGF- $\beta$ 1, VEGF, FGF basic und TNF- $\alpha$  durchgeführt. Es wurden jeweils 1,5  $\mu$ g gesamt Protein eingesetzt.

Nach Herstellerangaben wurden zunächst der jeweilige Capture-Antikörper(AK) in der angegebenen Konzentration (VEGF: 1  $\mu$ g/ml; TNF- $\alpha$ : 4  $\mu$ g/ml; TGF- $\beta$ 1: 2  $\mu$ g/ml FGF-basic 2  $\mu$ g/ml) in Plate Coating buffer (PBS pH 7,2) hergestellt. Dieser wurde mit Hilfe einer Multipette (Firma: Eppendorf) mit 100  $\mu$ l AK-Lösung/Well auf je eine 96-Well Platte pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimalig mit je 400  $\mu$ l Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS pH 7,2) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Platten auf einem sauberen und saugfähigen Tuch ausgeklopft. Anschließend wurden die Platten mit Reagent Diluent (1% BSA in PBS pH 7,2) im Falle der VEGF, FGF-basic und TNF- $\alpha$ - ELISAs oder mit Bock Buffer (5% Tween 20 in PBS pH 7,2) für dem TGF- $\beta$ 1-ELISA für eine Stunde bei RT blockiert. Zwischenzeitlich wurde der jeweilige Standard nach Herstellerprotokoll in Reagent Diluent (VEGF, FGF-basic und TNF- $\alpha$ ) oder PBS (TGF- $\beta$ 1) verdünnt und eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Nach erneut dreimaligem Waschen der Platten wurden die Proben (1,5  $\mu$ g gesamt Protein) oder der jeweilige Standard in einem Volumen von je 100  $\mu$ l auf die vorbereiteten Platten pipettiert. Nun folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

Am nächsten Tag würden die Platten zunächst für 1 h bei RT erwärmt. Anschließend drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und gut auf Papier ausgeklopft. Der Detection Antikörper wurde in die angegebenen Arbeitskonzentration mit Reagent Diluent verdünnt (VEGF 100 ng/ml; TNF- $\alpha$ : 50 ng/ml; TGF- $\beta$ 1: 300ng/ml; FGF-basic 0,25  $\mu$ g/ml) und 100  $\mu$ l in die jeweiligen Wells pipettiert. Nun folgte eine erneute Inkubation für 2 h bei RT. Nach einem weiteren dreimaligen Waschen der Platten wurden 100  $\mu$ l der Arbeitskonzentration von Streptavidin-HRP (1:40 in Reagent Diluent) auf die Platten pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen der Platten. Darauf wurden 100  $\mu$ l der Substrat-Lösung

(1:1 Color Reagent A [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] mit Color Reagent B [Tetramethylbenzidin]) in jedes Well der 96-Well Platte pipettiert und für 10-20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Stop-Solution (2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) beendet und für 3 min bei 300 rpm auf dem Schüttler gemischt. Die Detektion erfolgte in dem Plate Reader VICTOR X4 (Firma Berkin-Elmer) bei 450 nm. Zum Ausgleich von eventuellen Platten Ungenauigkeiten wurde zudem bei 570 nm gemessen. Die Absorptionen 570 nm wurde von der Absorption 450 nm subtrahiert. Die Steigung der Standardreihe wurde berechnet, eine Steigung von 0,9 wurde als adäquat angesehen.

### 4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GaphPad Prism5. Es wurde entweder ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrektur oder ein 2Way ANOVA mit Bonferroni Korrektur verwendet. Die ELISA-Ergebnisse wurden mit einer one-Way ANOVA mit Turkey-Post-Test analysiert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Einfluss auf die Zellviabilität (Viabilitätsassay)

Die Viabilität der Zellen hat einen großen Einfluss auf die Wundheilung. In der Proliferationsphase der tiefen Wundheilung bilden Fibroblasten Granulationsgewebe aus und sind für die Synthese der extrazellulären Matrix (ECM) und den Umbau verantwortlich. In diesem Zusammenhang stellt sich die Viabilität der Fibroblasten als wichtiger Faktor für die Wundheilung dar.

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des Umsatzes vom gelben MTT-Reagenz in das violette Formazan bei 570 nm photometrisch bestimmt (Kap. 4.2.2).

Die Versuchsergebnisse zeigten keinen Einfluss von TUFT-IT® in Abhängigkeit von den Applikationszeiten.

Bei den kürzeren Messzeitpunkten (0, 3, 6, 12, 24h) konnte nach einer Einwirkzeit von 5 min, 30 min und 60 min und bei permanenter Applikation kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Applikationsgruppe nachgewiesen werden

(s. Abbildung (7) ).

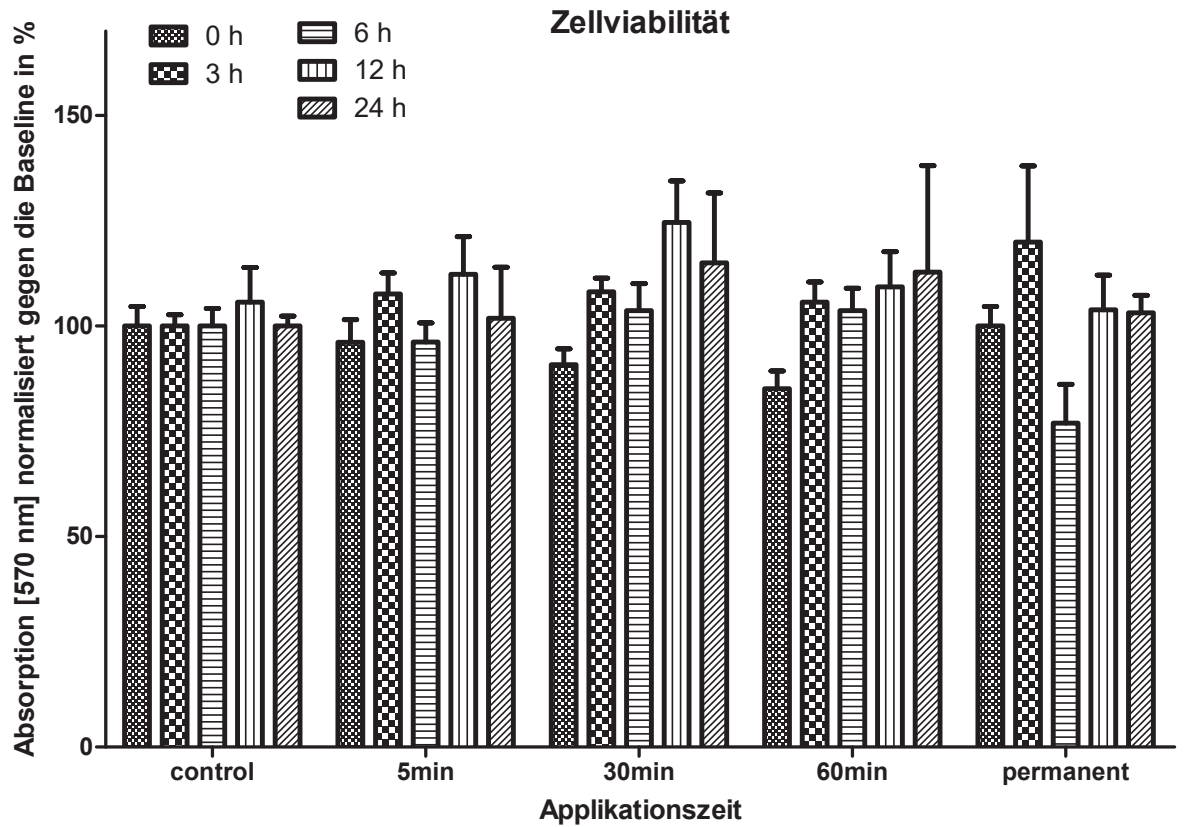


Abbildung (7) Fibroblastenviabilität nach TUFT-IT® Kurzapplikation

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Assay bei 570nm photometrisch bestimmt. Die Viabilitätsveränderung wurde mit 5, 30, 60 min oder permanenter TUFT-IT® Applikation zu den Messzeitpunkten 0, 3, 6, 12 und 24h bestimmt. Als Kontrolle dienen Zellen ohne TUFT-IT® Zugabe. Kontrollzellen zum Zeitpunkt 0h wurden gleich 100% gesetzt und zur Normalisierung verwendet. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Applikationsgruppe in den ersten 24 Stunden. (2-Way-ANOVA mit Bonferroni-Test; je n =12; NHDF= normale humane dermale Fibroblasten)

Auch zu den späteren Messzeitpunkten, nach 7 und 14 Tagen, zeigte TUFT-IT® keinen Einfluss auf die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (s. Abbildung (8) ).

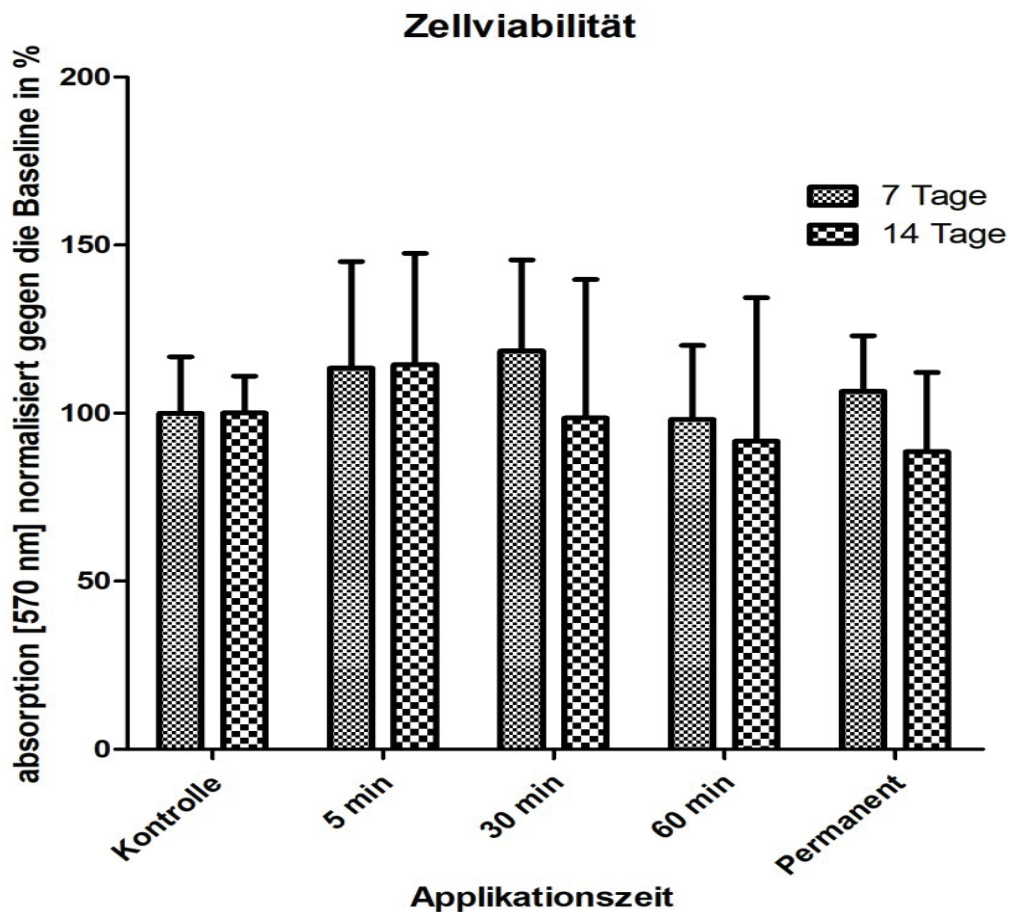


Abbildung (8) Darstellung der Fibroblastenviabilität mit Langzeit TUFT-IT® Applikation

Nach 7 und 14 Tagen wurde die Zellviabilität von TUFT-IT® behandelten (5, 30, 60 min und permanent) NHDF-Zellen unter Zuhilfenahme des MTT-Assay gemessen. Die Darstellung erfolgt in %, normalisiert gegen die Kontrolle (Zellen ohne TUFT-IT® Applikation) zum Zeitpunkt 0h. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Applikationsgruppe in der ersten und zweiten Woche. Die Zellviabilität blieb nach TUFT-IT®-Zugabe unverändert. (2-Way-ANOVA mit Bonferroni-Test; je n=12; NHDF= normale humane dermale Fibroblasten)

### 5.2 Einfluss auf die Zellproliferation

In der Wundheilung setzt nach der Entzündungsphase die Proliferationsphase ein. Diese ist durch die Bildung von Granulationsgewebe bezeichnet, welches maßgeblich von aktivierten Fibroblasten sezerniert wird.

In diesem Versuch soll der Einfluss von TUFT-IT® auf das Wachstum der Fibroblasten untersucht werden.

Wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben wurden die Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und zu den Messzeitpunkten 0, 3, 6, 12, 24 h sowie 7 und 14 Tage aus dem Well gelöst und in einer Neubauerzählkammer gezählt. Die Zellzahlen der lebenden, sowie der toten Zellen wurden dokumentiert. Als Kontrollen dienten Zellen ohne Zugabe von TUFT-IT®.

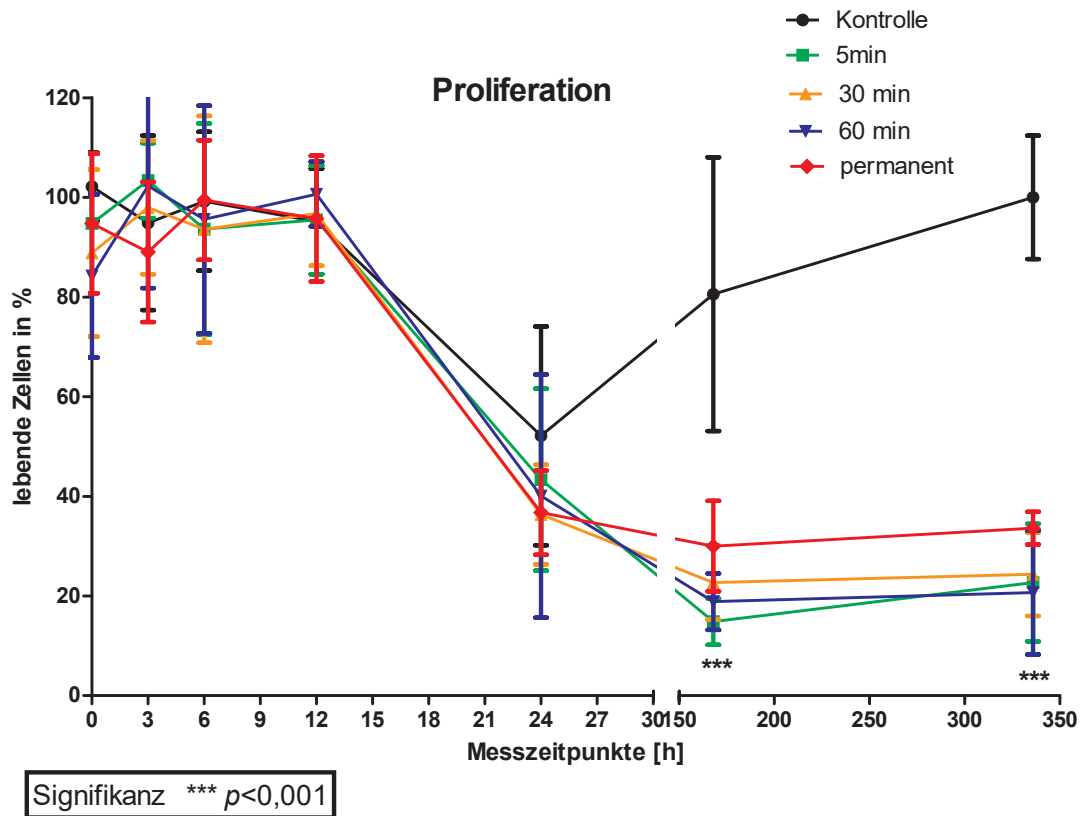
Zu den Messzeitpunkten der ersten 24 Stunden konnte kein signifikanter Unterschied in den verschiedenen Gruppen mit Applikationszeiten von 5 min, 30 min, 60 min und 24 Stunden und bei permanenter Anwesenheit von TUFT-IT® auf die Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Bei den längeren Messzeitpunkten, nach 7 und 14 Tagen, konnte bei allen Applikationszeiten ein signifikanter Abfall der Zellenzahl festgestellt werden ( $p < 0001$ ). So wurde bei einer Applikationszeit von 5 Minuten ein signifikanter Abfall der Zellzahl nach 7 und 14 Tagen nachgewiesen ( $p < 0001$ ). Die Zahl der lebenden Zellen ist bei 5 minutiger Applikation nach 7 Tage von  $94,8\% \pm 14\%$  auf  $14,8\% \pm 4,6\%$  und nach 14 Tage von  $94,8\% \pm 14\%$  auf  $22,7\% \pm 11,8\%$  der Ausgangszellzahl gesunken.

Auch ist durch die permanente TUFT-IT® Applikation die Zahl der lebenden Zellen nach 7 Tage signifikant von  $94,8\% \pm 14\%$  auf  $30\% \pm 9,1\%$  und nach 14 Tage von  $94,8\% \pm 14\%$  auf  $33,6\% \pm 3,3\%$  der Ausgangzahl gesunken.

In der Kontrollgruppe sank die Zellzahl nach einer Woche von  $100\% \pm 6,8\%$  auf nur  $80,5\% \pm 27,5\%$ . Nach 2 Wochen erholten die Zellen sich jedoch, sodass die Zellzahl in der Kontrollgruppe unverändert im Vergleich zur Ausgangszellzahl war (s. Abbildung (9) ).





\*\*\*Signifikanter Abfall der Proliferation nach 5, 30, 60 Minuten und nach permanenter Applikation von TUFT-IT® bei den Messzeitpunkten nach 7 und 14 Tagen ( $p < 0,001$ )

Abbildung (9) Fibroblastenproliferation mit und ohne TUFT-IT® Applikation

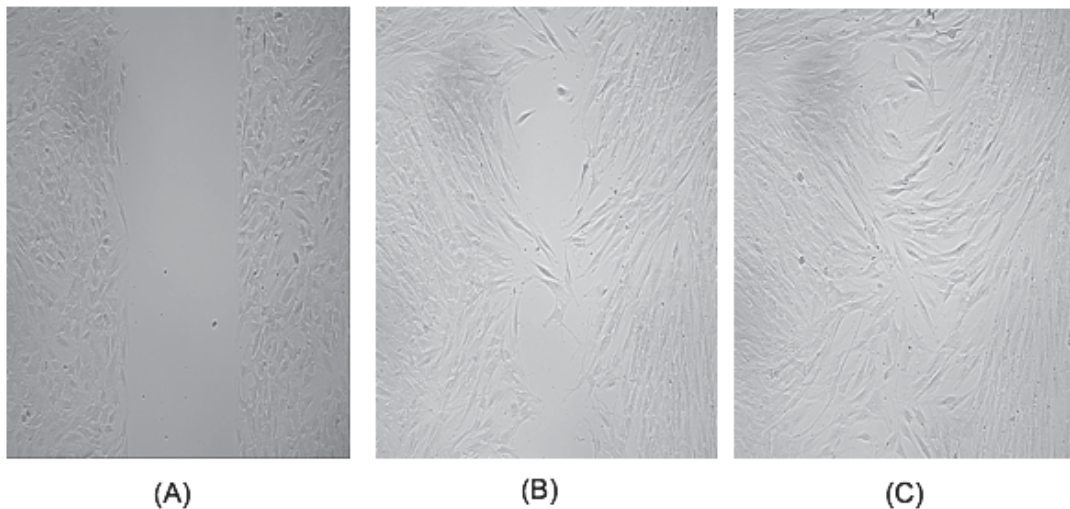
Dargestellt ist die Proliferation der NHDF- Zelllinie mit und ohne TUFT-IT® Gabe über die Zeit (0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 7 d, 14 d) mit den verschiedenen Applikationszeiten (5 min, 30 min, 60 min und permanenter Applikation). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Es zeigte sich, dass die Proliferation der Fibroblasten in den Kontroll- und Applikationsgruppen nach TUFT-IT®-Zugabe in den ersten 24 Stunden unverändert blieb. Nach 7 und 14 Tagen zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und Applikationsgruppen. Hierbei fiel die Proliferationsrate bei allen Applikationsgruppen ab. Die Applikationsgruppen untereinander zeigten jedoch einen signifikanten Unterschied. (Signifikanz \*\*\*  $p < 0,001$ . 2-Way-ANOVA mit Bonferroni-Test)

### 5.3 Einfluss auf die Zellmigration

Neben der Proliferation gehört die Fibroblastenmigration zur Proliferationsphase der Wundheilung. Diese setzt ca. 3 Tage nach der Verletzung ein und ist ein wesentlicher Teil der Wundheilung.

Das Migrationsverhalten der Zellen wurde wie im Kapitel 4.2.4 beschrieben bei diversen TUFT-IT®-Applikationszeiten (5 min ,30 min, 60 min und 24 h) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne TUFT-IT® untersucht.

Bei allen oben genannten Gruppen wurde keine signifikante Veränderung der Zellmigration nach Zugabe von TUFT-IT® im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen. Die höchste Migrationsrate wurde bei einer Applikationszeit von 60 Minuten registriert. Hierbei war die zellbedeckte Fläche nach 24 Stunden von 95,37% bis zu 99,75% durch migrierte Fibroblasten besiedelt (s. Abbildung (10) ).



*Abbildung (10) zeigt die registrierte Fibroblastenmigration nach 60 minutiger TUFT-IT®-Zugabe zu den verschiedenen Messpunkten: (A) Messzeitpunkt 0 Stunden, (B) Messzeitpunkt 12 Stunden und (C) Messzeitpunkt 24 Stunden*

Bei allen Versuchsgruppen war letztendlich die zellbedeckte Fläche der Migrationsplatte nach 24 Stunden über 90% bedeckt. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und Applikationsgruppen in Hinblick auf die Zellmigration (s. Abbildung (11) ).

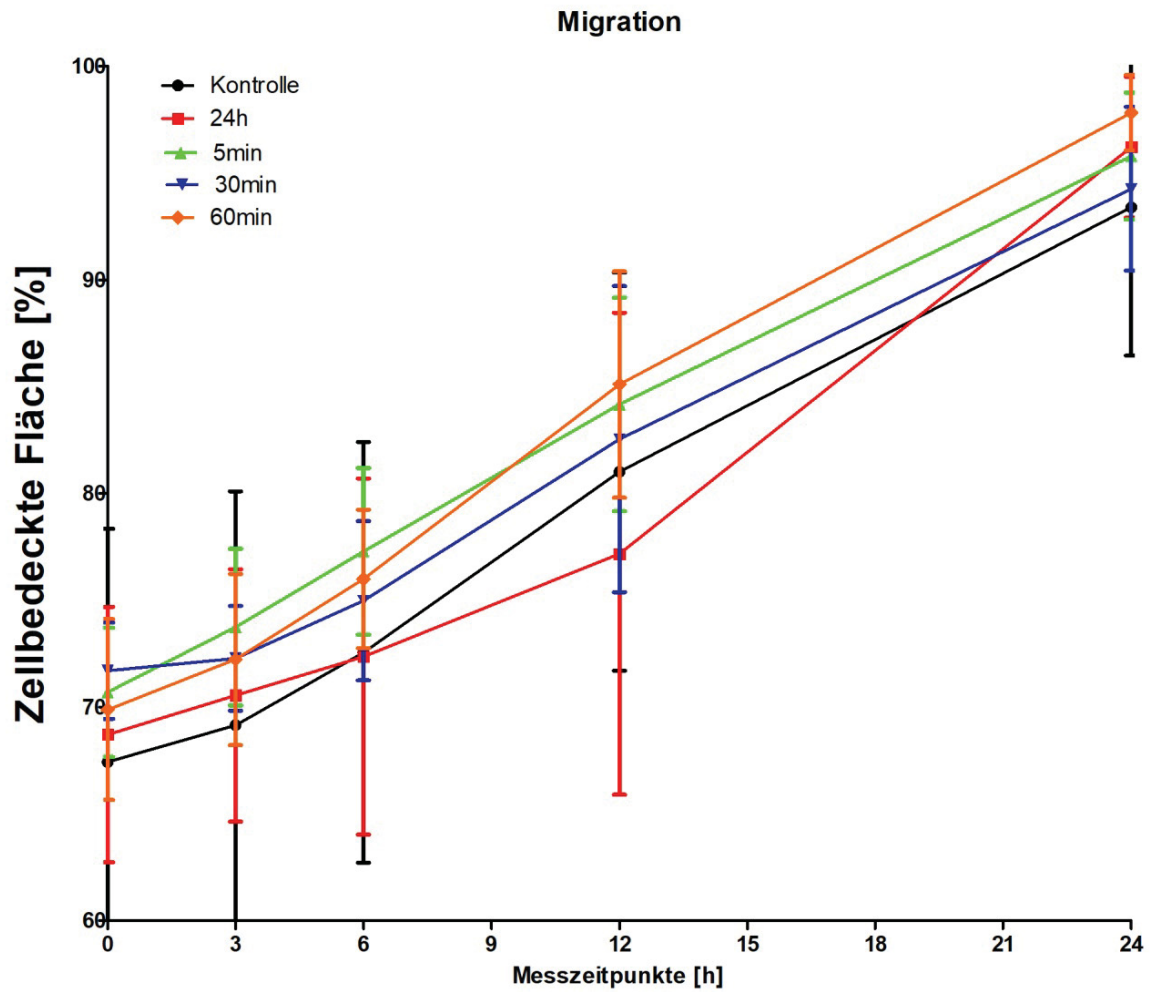


Abbildung (11) Einfluss von TUFT-IT® auf das Migrationsverhalten von Fibroblasten

Gezeigt wird die Migration der NHDF-Zellen über die Zeit (0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h) mit den verschiedenen Applikationszeiten: 0 min, 5 min, 30 min und 60 min. Die Zell-bewachsene Fläche wurde mittels des Programms t-scratch (CSElab ETH-Zürich) ausgewertet und ist in Prozent dargestellt. Eine voll bewachsene Fläche würde als 100% festgesetzt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und Applikationsgruppen über 24 Stunden. Die Zellmigration blieb nach TUFT-IT®-Zugabe unverändert. (2-Way-ANOVA mit Bonferroni-Test, je n=12)

### 5.4 pH-Messungen und TUFT-IT®-Zerfall

Es ist bekannt, dass Hämostyptika den pH-Wert im Zellmilieu verändern und somit eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung spielen können. Durch einen pH- Wert Abfall kann es zu einer Bakterizidität kommen. Zudem wird eine blutstillende Wirkung erreicht, in dem es zu einer unspezifischen Plättchenaggregation kommt, welche letztlich zur Bildung eines Thrombus führt. Ein negativer Einfluss auf den pH-Wert und die Wundheilung ist z.B. bei der Anwendung von oxidiertes Cellulose bekannt [42].

#### 5.4.1 pH-Messungen von Zellkulturmedium unter TUFT-IT® Applikation

Um den Einfluss von TUFT-IT® auf die Veränderung des pH-Wertes im Zellkulturmedium zu untersuchen, wurde die pH-Wert-Veränderung des Zellkulturmediums ohne Zellen bestimmt.

Bei den pH-Messungen von Zellkulturmedium zeigten die Messergebnisse der beiden Gruppen mit und ohne TUFT-IT®-Zugabe keinen signifikanten Unterschied.

In den ersten 12 Stunden blieb der durchschnittliche pH-Wert beider Gruppen leicht basisch bis maximal pH 8,6 bei der Mediumgruppe und bei einem pH-Wert von  $8,6 \pm 0,048$  bei der Gruppe mit Medium mit TUFT-IT® nach 3 Stunden. In den nächsten 36 Stunden fiel der pH-Wert in den Gruppen leicht ab, er blieb jedoch im leicht-basischen Bereich ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Bei den längeren Messzeitpunkten blieb er bei leicht-basischem Niveau weiterhin ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Zusammengefasst ergaben die pH-Messungen aller Untersuchungsgruppen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Im Verlauf blieben die pH-Werte im leicht-basischen Bereich (s. Abbildung (12) ).

### pH-Messung von Zellkulturmedium ohne Zellen

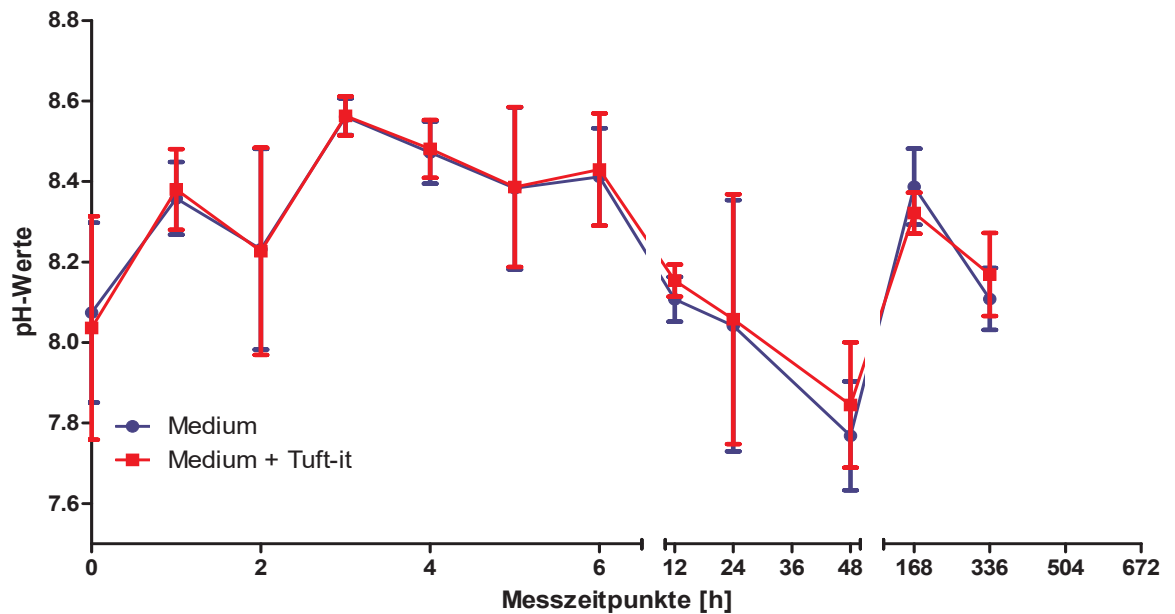


Abbildung (12) pH-Wert Messung von Zellkulturmedium nach TUFT-IT® Applikation im Vergleich zur Kontrolle

Dargestellt ist die Veränderung des pH-Wertes im Zellkulturmedium ohne Zellen zu den Messzeitpunkten 1-6 h Stündlich, 12 h, 24 h, 7 d und 14 d mit und ohne TUFT-IT® Applikation. Es zeigte sich keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und Applikationsmediumgruppen über 14 Tage. Der pH-Wert im Zellkulturmedium blieb nach TUFT-Zugabe unverändert. (1-Way-ANOVA mit Bonferroni-Test, je  $n=12$ )

#### 5.4.2 pH-Messungen von Zellkulturmedium mit Zellen ohne und mit Zugabe von TUFT-IT®

Um eine Veränderung des pH-Wertes im Zellkulturmedium mit Zellen auszuschließen wurde der pH-Wert des Zellkulturmediums mit Zellen bestimmt. Nach Zugabe von TUFT-IT® auf die kultivierten Zellen wurde der pH-Wert im Medium zu den Messzeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 Stunden gemessen. Als Kontrolle dienten Messungen von kultivierten Zellen ohne Zugabe von TUFT-IT® (s. Kap. 4.2.5).

Die Messungen erzeugten bei beiden Gruppen in den ersten 3 Messzeitpunkten einen leichten Anstieg des durchschnittlichen pH-Werts bis maximal pH 8,58. Danach fiel der pH-Wert leicht ab und verblieb zu allen Messzeitpunkten

innerhalb der untersuchten zwei Wochen leicht basisch ohne signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit TUFT-IT® (s. Abbildung (13) ).

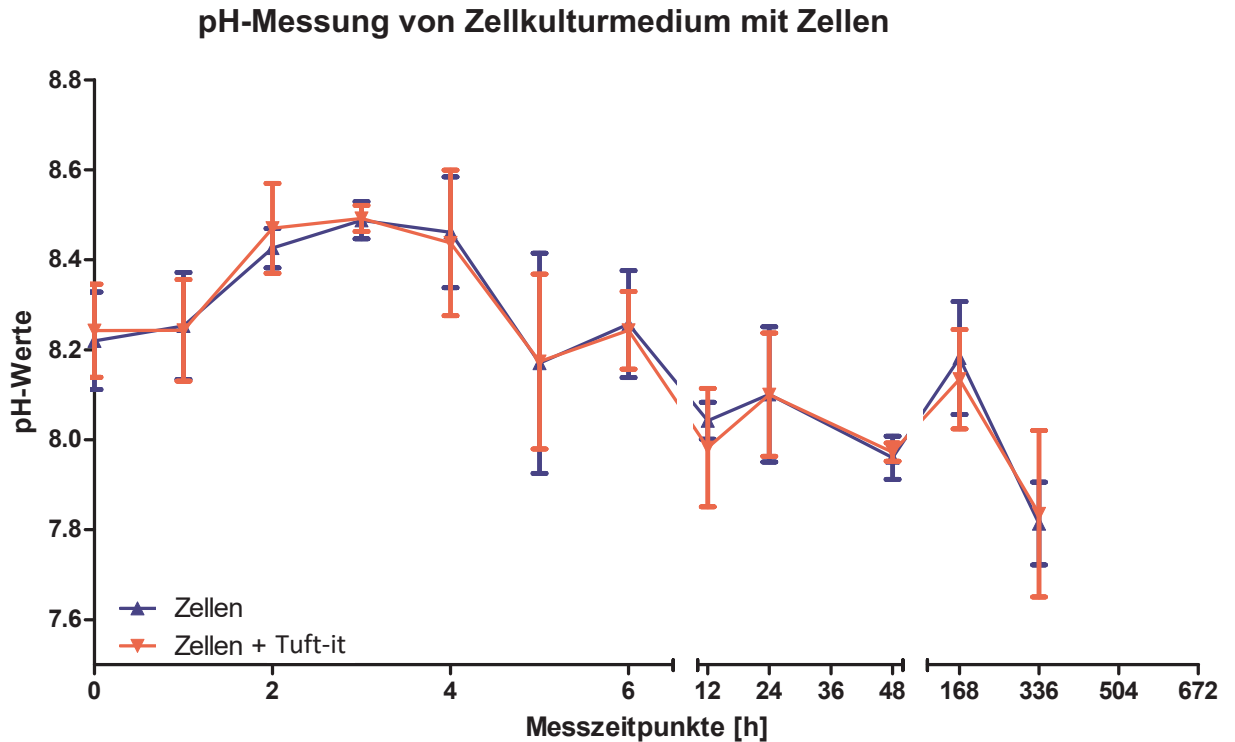
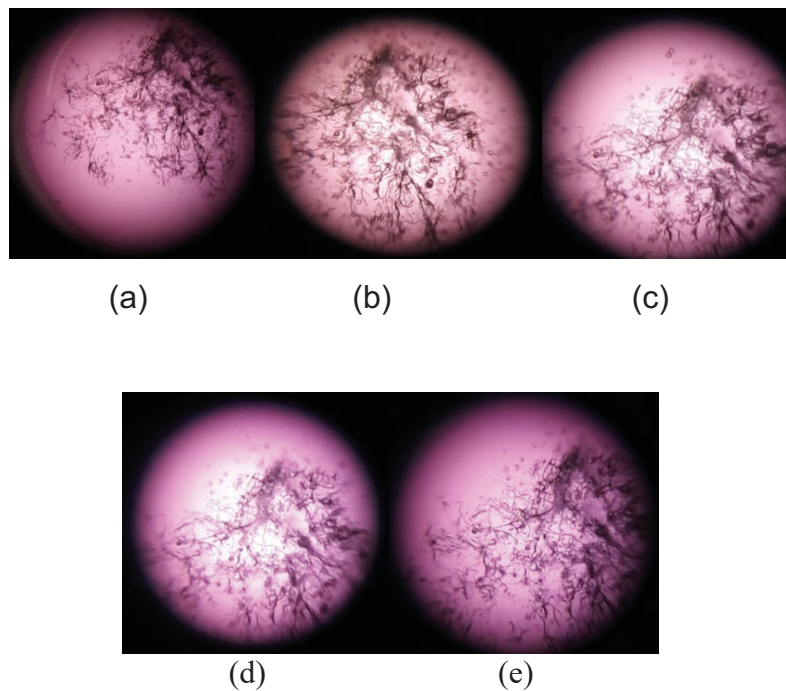


Abbildung (13) pH-Wertmessung von Zellkulturmedium mit Zellen nach TUFT-IT®-Applikation

Im Zellkulturmedium mit Fibroblasten wurde der pH-Wert an den Messzeitpunkten 1-6 h stündlich, 12 h, 24 h, 7 d und 14 d mit und ohne TUFT-IT® Applikation bestimmt und wird hier dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und Applikationszellgruppen über 14 Tage. Der pH-Wert blieb nach TUFT-IT®-Zugabe auf Fibroblasten unverändert. (1-Way-ANOVA mit Bonferroni-Test)

### 5.4.3 TUFT-IT® Zerfall im Zellkulturmedium

Zur Beobachtung des Zerfalls von TUFT-IT® im Zellkulturmedium wurde TUFT-IT® mit Trypsin blau angefärbt und in den Proben zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert. Die Stabilität und Integrität von TUFT-IT® veränderte sich nicht in den ersten 24 Stunden bei nicht signifikanten Veränderungen des pH-Wertes (s. Abbildung (14) ).



*Abbildung (14) zeigt den TUFT-IT® Zerfall nach 5 Sekunden (a), 3 Stunden (b), 6 Stunden (c), 12 Stunden (d) und 24 Stunden (e)*

### 5.5 Kontraktionsassay

In der späten Phase der Wundheilung differenzieren die Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche durch große Bündel von actinhaltigen Mikrofilamenten gekennzeichnet sind und kontrahieren können. So üben die Myofibroblasten Zugkräfte auf die Kollagenmatrix aus, was zur Kontraktion mit entsprechendem Wundverschluss führt.

Dieser natürliche Wundverschluss wird im Kontraktionsassay mittels einer Kollagenmatrix nachgebildet.

Zunächst wurden die Kollagen/Zell-Matrizen wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben vorbereitet und mit TUFT-IT® versetzt oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Zur Dokumentation des Matrixumfangs wurden Fotos der Matrizen nach dem Ablösen der Matrizen, 24 h und 48 h nach Inkubation aufgenommen. Die Auswertung der Fotos erfolgte durch das Programm Zeiss AxioVision, wobei das Verhältnis der von Matrize bedeckten Fläche zur Gesamtfläche berechnet wurde. Die resultierenden Werte wurden in den verschiedenen Gruppen nach TUFT-IT® Applikation zu den Kontrollgruppen verglichen.

Nach TUFT-IT® Applikation zeigte das Verhältnis der Matrix-Fläche zur Gesamtfläche innerhalb von 48 Stunden keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (s. Abbildung (15) ).



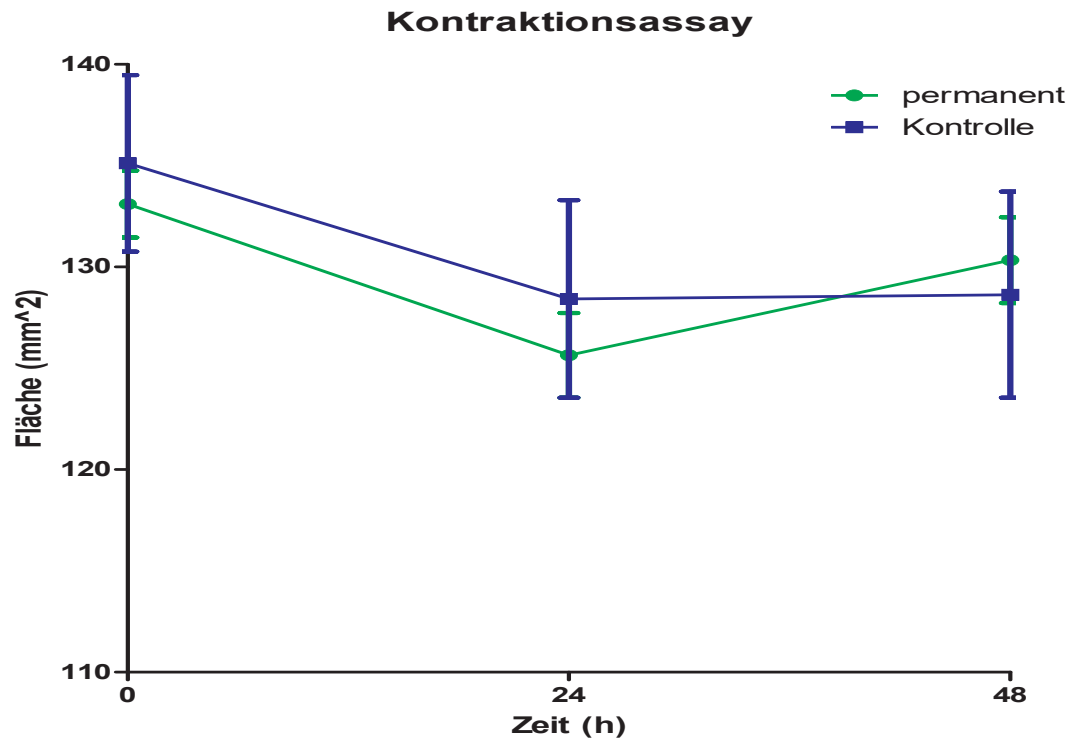


Abbildung (15) Darstellung der Kontraktionsfähigkeit von Kollagenmatrizen mit und ohne TUFT-IT® Applikation

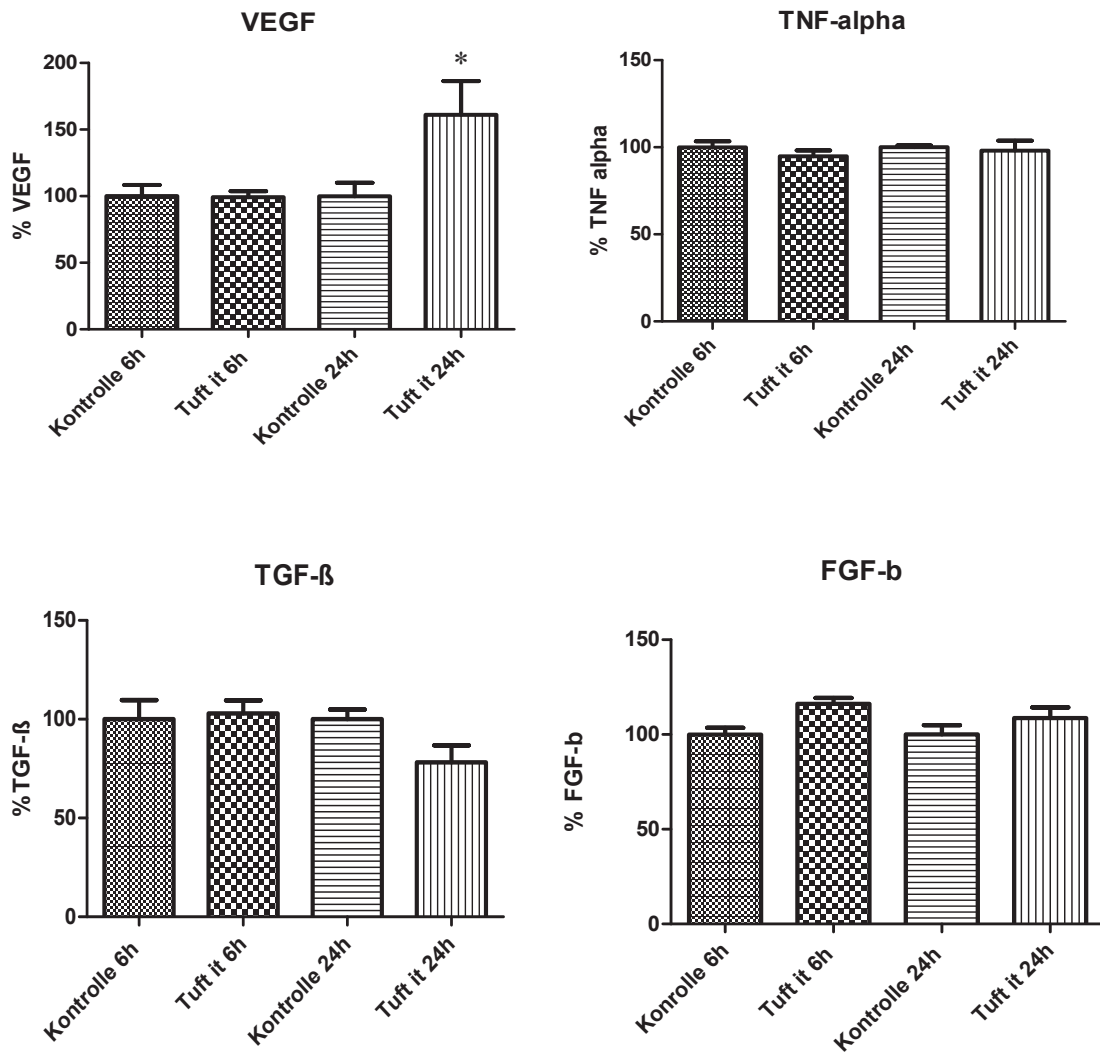
Gezeigt wird die Kontraktion der Zellmatrizen nach Fotobearbeitung mit High: 65535, Low: 51765, Gamma 1.18 im Vergleich von vor TUFT-IT® Applikation, 24 h und 48 h nach Applikation. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- (blaue Kurve) und Applikationsgruppe (grüne Kurve) innerhalb von 48 Stunden nachgewiesen. Die Kontraktion blieb nach TUFT-IT®-Zugabe unverändert (1-Way-Annova mit Bonferroni-Test, je n=12)

### 5.6 ELISA-Ergebnisse

Um den Einfluss des Gelatinematerials TUFT-IT® auf Wachstumsfaktoren zu untersuchen, wurden ELISA-Platten der einzelnen Proteine wie in Kapitel 4.2.7 beschrieben vorbereitet. Hierzu wurden die Wachstumsfaktoren VEGF, TGF- $\beta$ , FGF-b und TNF- $\alpha$  in Anwesenheit von TUFT-IT® zum Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe untersucht.

Die VEGF-Produktion wies keine wesentliche Veränderung nach sechs stündiger Anwendung von TUFT-IT® auf. Nach 24 Stunden stieg die VEGF Produktion um 61% im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an. Auch zeigte sich ein signifikanter Anstieg der VEGF-Expression im Vergleich der 24 h Applikation zur 6 h Applikation von TUFT-IT® ( $p < 0,05$ ). Die TNF- $\alpha$ -Konzentration blieb nach 24 Stunden unter TUFT-IT® im Vergleich zur Kontrollgruppe stabil. Bei der ELISA-Untersuchung auf die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ , FGF-b und TNF-alpha zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu der jeweiligen Kontrollgruppe.

TGF- $\beta$  ist nach 24-stündiger TUFT-IT® Anwendung um 19,5% abgesunken. FGF-b ist nach 6 Stündiger TUFT-IT® Anwendung leicht um 16% angestiegen, allerdings ohne Signifikanz (s. Abbildung (16) ).



\* Signifikanter Anstieg der VEGF-Konzentration nach 24 h bei permanenter Applikation von TUFT-IT® ( $p < 0,05$ )

Abbildung (16) Konzentration der verschiedenen Wachstumsfaktoren in Prozent nach TUFT-Applikation

Hier sind die Konzentrationsverhältnisse der Wachstumsfaktoren VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und FGF-b ohne und mit TUFT-IT® Applikation zu den Zeitpunkten 6 h und 24 h dargestellt. Lediglich zeigte VEGF nach 24 h einen signifikanten Konzentrationsanstieg im Vergleich zu den anderen Gruppen.

## 6. Diskussion

### 6.1 Zellviabilität und -proliferation

Zellviabilität und -Proliferation sind essentielle Phasen bei jeder Wundheilung. Um die Wirkung von TUFT-IT® auf die Wundheilung zu untersuchen ist die Durchführung eines Viabilitäts- (MTT-Assay) und Proliferationsassays unvermeidbar. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der MTT-Assay gewählt.

Die Proliferation wurde durch eine Zählung der Zellen mittels Neubauer Zählkammer nach Zugabe von TUFT-IT® bestimmt.

Während die Zellviabilität zu allen Zeitpunkten mit und ohne Zugabe von TUFT-IT® unbeeinflusst blieb, wurde die Proliferation nach 7 und 14 Tage TUFT-IT® Zugabe negativ beeinflusst.

Andere Studien zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Orlova et al. zeigten, dass die Zugabe von Gelatine die Proliferation der embryonalen Fibroblasten bei Mäusen stimuliert[55]. Ebenso zeigte eine in-vitro Studie von Priya et al. einen positiven Einfluss von gelatinehaltigem Kryogel auf Fibroblastenviabilität[56].

Eine weitere in-vitro Studie von Zeng et al. besagt, dass Mäusefibroblasten durch die Verwendung eines Hydrogels, welches aus Alginaten und Gelatine hergestellt wurde, eine stärkere Viabilität und Proliferation nach 7 und 14 Tage zeigten [57].

In einer in-vitro und in-vivo Studie von Cahú et al. wurden kombinierte Chitosan-Gelatine Wundauflagen untersucht. Die Viabilität von 3T3-Fibroblasten wurde nach 24 Stunden durch Applikation der gelatinehaltigen Wundauflage auf ca. 50 % reduziert[58]. In einer Vergleichsstudie wurden Alginate mit gelatinehaltigem Alginate-Hydrogel in-vitro untersucht; es zeigte sich eine signifikant positive Wirkung des gelatinehaltigen Alginate-Hydrogels sowohl auf die Viabilität als auch die Proliferation der normalen humanen dermalen Fibroblasten[59].

Der Vergleich zwischen der Wirkung von Alginate, Gelatine und Alginate-Gelatine auf Fibroblasten wurde in einer weiteren in-vitro Studie von Lewandowska et al. untersucht, wobei es eine bessere Viabilität der Fibroblasten in Anwesenheit von Gelatine nachgewiesen werden konnte[60].

Humane Fibroblasten reagierten in einer anderen in-vitro Studie ebenso mit einer verstärkte Viabilität als diese auf mikroporöse Schweinegelatinemikroperlen und in einem Bioreaktor (Cellspin) in serumfreiem Fibroblasten-Wachstumsmedium oder in DMEM-Medium mit 10% fetalem Kalbserum inkubiert wurden[61].

Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Kanokpanont et al., wobei eine gelatinehaltige Wundauflage untersucht wurde, unter dessen Anwendung eine verstärkte Fibroblastenproliferation erreicht werden konnte[62].

Passend zu unseren Ergebnissen der Proliferation zeigten Kang et al. in einer in-vivo Studie, die eine Hemmung der Bildung von Granulationsgewebe durch Gelatine zeigte [54].

Aus den Ergebnissen unserer Studie gelangt man zu dem Schluss, dass das Belassen von TUFT-IT® in der Wunde zu einer Hemmung der Fibroblastenproliferation führen kann. Man muss jedoch bedenken, dass die Fibroblasten über 7 Tage in der Kultur wachsen und sowohl der Platz als auch die Nährstoffe, es wurde kein Wechsel des Zellkulturmediums vorgenommen, begrenzt waren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, was die Hemmung der Zellproliferation durch andere, in dieser Arbeit nicht untersuchte, Zellreaktionen wie Stress, Apoptose und/oder Zellarrest injiziert wurde. Um dies genauer zu untersuchen und zu unterscheiden müssen weitere Tests, wie zum Beispiel ein Apoptose Assay, erfolgen.

Neben Gelatinematerialien werden auch andere Hämostyptika bei chirurgischen Eingriffen eingesetzt. Zu diesen gehören oxidierte regenerierte Cellulose (ORC) und oxidierte nicht- regenerierter Cellulose (ONRC). Da diese Hämostyptika ebenfalls einen Einfluss auf die Wundheilung haben könnten, ist es von großem Interesse zwischen den verschiedenen Hämostyptika zu vergleichen und zu diskutieren, wie sie in den jeweiligen Wundheilungsphasen wirken könnten.

Eine in-vitro Studie, die durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, zeigte, dass sowohl ORC als auch ONRC die Viabilität der Fibroblasten im Zeitraum von Tag 0 bis Tag 7 hemmten. Dieser Effekt war im zweiten Beobachtungszeitraum zwischen Tag 7 und 14 weniger deutlich jedoch in beiden Intervallen signifikant[42].

Allerdings findet man in der Literatur auch Arbeiten, die diesen Ergebnissen widersprechen; z.B. wurde in der Studie von *Liu et al.* kein Einfluss auf die Fibroblastenproliferation durch oxidierte Cellulose nachgewiesen[63]. Ebenso wiesen *Nuray et al.* anhand von Tierexperimenten keinen signifikanten Einfluss oxidiertes Cellulose auf die Zellproliferation nach[64].

Ein direkter Vergleich zwischen cellulose- und gelatinebasierten Hämostyptika wurde in einer in-vivo Studie durchgeführt. Hierbei wurden die Materialien bei 30 Mäusen verwendet und nach 3 und 28 Tagen untersucht. Nach 3 Tage stellte sich in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in Bezug auf Proliferation von Granulationsgewebe dar. Interessanterweise war die Proliferation in der Cellulose-Gruppe nach 28 Tage stärker ausgeprägt, während in der Gelatine-Gruppe eine verzögerte Proliferation gesehen werden konnte[54].

Zusammenfassend kommt man in Hinblick auf die verschiedenen Ergebnisse unserer und anderen Studien zum Fazit, dass gelatinehaltige Materialien keinen negativen Einfluss auf die Fibroblastenproliferation und -viabilität bei kürzeren Einwirkzeiten haben. Bei längeren Einwirkzeiten bestehen jedoch widersprüchliche Ergebnisse.

### 6.2 Zellmigration

Ca. 3 Tage nach der Verletzung beginnt die Fibroblastenmigration. PDGF, TGF- $\beta$  und bFGF stimulieren die Fibroblastenmigration[12]. Die Fibroblasten produzieren nun wichtige Matrixproteine wie Hyaluronsäure, Fibronectin, Proteoglykane und Präkollagen Typ 1 und Typ 3.

Unter Verwendung von TUFT-IT® ergab sich kein signifikanter Unterschied zu der Fibroblastengruppe ohne TUFT-IT® in Bezug auf die Zellmigration über 24 Stunden.

In einem Tierversuch wurde Gelatine bei Ratten mit Verbrennungswunden als Wundauflage verwendet. Dies führte zu einem wesentlichen Mangel an Fibronectin, welches als ein ausschlaggebender Grund für die gezeigte Verzögerung der Zellmigration und die Wundheilung dargestellt wird [65].

Eine weitere in-vitro Studie zeigte, dass die Fibroblastenmigration durch eine erhöhte Expression von MMP9 gehemmt wird[66]. Iyer et al. konnte 2012 zudem zeigen, dass die MMP9-Aktivität durch Gelatine gesteigert werden kann[67]. Ebenso zeigte die in-vitro und in-vivo Studie von Jaiswal et al., dass kombinierte Wundauflagen aus Gelatine-Nanofasern und Polyvinylalkohol-Hydrogel eine erhöhte MMP9-Expression begünstigen[68].

In Hinblick auf die Ergebnisse der oben genannten Studien kommt man in diesem Zusammenhang zu dem Schluss, dass gelatinehaltige Materialien die Fibroblastenmigration hemmen könnten.

Diesem Schluss widersprechen die Ergebnisse der in-vitro Studie von Zeng et al., die nachgewiesen haben, dass die Mäusefibroblasten durch die Verwendung eines aus Alginate und Gelatine kombinierten Hydrogels, zunehmende Migration über 14 Tage aufwiesen [57].

Wie bereits erwähnt wurde, stimuliert das FGF die Fibroblastenmigration während der Wundheilung. In einer in-vitro Studie von Nakajima et al. wurden kardiale Myocyten mit Gelatin Hydrogel behandelt. Es zeigte sich eine

signifikante Anreicherung an FGF in den mit Gelatine behandelten Zellen[69], was zu einer gesteigerten Migration führen würde.

Andererseits zeigte Wagenhäuser et al. in einer in-vitro Studie eine negative Wirkung auf die Zellmigration nach Anwendung von oxidiertes Cellulose. Nach 24 Stunden war die zellbedeckte Fläche nach oxidiertes regenerierter Cellulose (ORC)-Anwendung bei  $88.1\% \pm 5.7\%$  und nach oxidiertes nicht regenerierter Cellulose (ONRC)-Anwendung  $80.5\% \pm 4.2\%$  deutlich kleiner als bei der Kontrollgruppe  $98.1\% \pm 2.3\%$  [42].

Eine positive Wirkung oxidiertes Cellulose auf das Migrationsverhalten beschrieben Hart et al. bei Wunden von diabetischen Mäusen, die mit einer Kombination aus oxidiertes Cellulose und Kollagen behandelt wurden[70].

Die Daten von Wagenhäuser et al., die aus unserer eigenen Forschungsgruppe stammen, sind mit unseren Ergebnissen besser vergleichbar, weil in beiden Studien der gleiche Migrationsassay mit derselben Zelllinie unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wurde.



### 6.3 pH-Messungen

In der in unserem Labor durchgeführten in-vitro Studie von Wagenhäuser et al. 2016 wurde gezeigt, dass die Zugabe von ORC und ONRC in das Zellkulturmedium einen starken Abfall des pH-Wertes hervorruft[42]. Um dies bei der Zugabe des hier untersuchten Gelatinehaltigen Hämostyptikum auszuschließen, wurde der pH-Wert des Mediums sowohl mit und ohne Zugabe von TUFT-IT® als auch mit und ohne Zellen in einem Zeitraum von 14 Tage untersucht. Hier zeigte sich, dass TUFT-IT® keinen signifikanten Einfluss auf den pH-Wert des Mediums hat.

Diese Ergebnisse waren allerdings zu erwarten, da Gelatine von Typ A ihren isoelektrischen Punkt im Bereich von pH 7–9 hat und Zellkulturmedium mit einem pH-Wert von um die 7,4 in diesem Bereich fällt. Entsprechend waren unsere Ergebnisse der pH-Messungen nach TUFT-IT®-Zugabe auf die humanen Fibroblasten.

Laut Herstellerfirmen weisen die von Wagenhäuser et al. 2016 untersuchten ONRC und ORC Produkte eine bakteriostatische und keimvernichtende Eigenschaft auf. Dies könnte mit dem erniedrigten pH-Wertes in der Umgebung (in-vitro im Zellkulturmedium) zusammenhängen[42].

Eine Veränderung des pH-Wertes in der Umgebung kann sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die Migration, Proliferation und Viabilität von Fibroblasten und somit auf die Wundheilung haben.

In einer in-vitro Studie von Kruse et al. wurde der pH-Effekt auf die Fibroblasten untersucht, wobei die Zellviabilität, -proliferation und -migration bei verschiedenen pH-Werte (5,5-12,5) geprüft wurden[71].

Eine optimale Viabilität der Fibroblasten konnte bei pH-Werten von 7,5 bis 11,5 am ersten Tag, 8,5 bis 10,5 am dritten Tag und bei 8,5 am fünften Tag nachgewiesen werden.

Bei dem Proliferationsassay zeigte sich eine signifikant ansteigende Proliferationsrate bei basischen pH-Werten zwischen 8,5-9,5.

Der optimale pH-Wert für die Fibroblastenproliferation wurde bei 8,5 am ersten Tag, 8,5 und 9,5 am dritten Tag und 8,5 am fünften Tag registriert.

Sowohl bei basischen als auch sauren pH-Werten war die Fibroblastenmigration inhibiert. Die höchste Migrationsrate der Fibroblasten war bei einem pH-Wert von 7,5 nachweisbar.

In derselben Studie haben Kruse et al. in-vivo den pH-Effekt auf die Wundheilung bei Wistar-Ratten untersucht. Die optimalste Bedingung für eine unauffällige Wundheilung zeigte sich ebenfalls bei einem pH-Wert von 7,5. Bei einem saurem pH-Wert unter 6,5 war die Wundheilung verlangsamt, während bei einem basischem pH-Wert über 7,5 die Wundheilung nicht negativ beeinflusst war.

Zudem zeigte die in vitro-Studie von Sharpe et al. eine ansteigende Proliferations- und Migrationsrate von Fibroblasten bei leicht basischen pH-Werten[72].

In unserer Studie wurde nach TUFT-IT® Verwendung kein Einfluss auf den pH-Wert im Zellmilieu beobachtet. Ob TUFT-IT® eine positive oder negative Wirkung auf den pH-Wert in der Wunde und letztendlich auf die Wundheilung ausübt, ist nicht in der Literatur beschrieben und muss noch genauer untersucht werden. Nach unseren in-vitro Untersuchungen im Zellkulturmedium könnte man den Rückschluss ziehen, dass TUFT-IT® keine bis eine leicht basische Veränderung des pH-Wertes einer Wunde hervorrufen könnte. Dies kann jedoch nur mittels einer in-vivo Studie geklärt werden.

### 6.4 Zellkontraktion

Unsere Versuche ergaben keine signifikante Veränderung der Fibroblastenkontraktion nach TUFT-IT® Applikation über 24 und 48 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe und somit zeigte sich kein Einfluss auf den Fibroblastenkontraktion.

In der Literatur sind verschiedene Studien, die widersprechende Ergebnisse bzgl. der Wirkung von Gelatine auf die Wundkontraktion zeigten.

Die in-vitro und in-vivo Studie von Jaiswal et al. zeigte eine schnellere Kontraktion von Hautwunden in Wistar-Ratten, die mit kombinierten Auflagen aus Gelatine-Nanofasern und Polyvinylalkohol-Hydrogel behandelt wurden[68]. Als Kontrollen diente eine Gruppe ohne Wundauflage.

Nakajima et al. wiesen mittels einer in-vitro Studie sogar eine verstärkte Kontraktion von kardialen Myozyten nach Anwendung von gelatinehaltigem Hydrogel nach[69].

Eine in-vivo Studie von Schiefer et al. zeigte wiederum einen positiven Einfluss von Gelatine-Kollagen Material auf die Wundkontraktion[73].

Auch in einer anderen in-vivo Studie wurde ein kombiniertes Material aus Gelatine und Chitosan untersucht, wobei ebenso ein positiver Einfluss auf die Wundkontraktion über 14 Tage bei Wistar-Ratten nachgewiesen werden konnte[58].

Andere Ergebnisse zeigte eine in-vivo Studie von Nagelschmidt et al., in den drei intraperitonealen Injektionen von Gelatine (5 mg/kg Körpergewicht) bei Ratten erfolgten. In den ersten 3 Tage zeigte sich einen auffälligen Mangel an Fibronectin, dessen Konzentration am Tag 1 auf 36,3% im Vergleich zur Kontrollgruppe sank, was zu einer signifikanten Verzögerung der Wundkontraktion nach 7 und 14 Tage führte[65].

Wenn man auf unsere Versuchsergebnisse zurückblickt, kommt man zum Fazit, dass TUFT-IT® einen neutralen bzw. keinen negativen Einfluss auf die Fibroblastenkontraktion zu haben scheint.

Im Vergleich zu anderen Hämostyptika wie z.B. ONRC (Resorbacell) , die die Fibroblastenkontraktion negativ beeinflussen[42], beeinflusst Gelatine – in Betracht auf unserer Ergebnisse- die Wundkontraktion nicht.

### 6.5 Die Wirkung auf Wachstumsfaktoren (ELISA)

In unserer Studie ergaben die ELISA-Untersuchungen, dass das Gelatinematerial TUFT-IT® eine signifikante Erhöhung auf die Proteinexpression von VEGF hervorruft. Die anderen Wachstumsfaktoren TNF-  $\alpha$ , TGF- $\beta$  und b-FGF zeigten jedoch wurde keine Veränderung der Proteinexpressionen.

Unsere Studienergebnisse zeigten einen Anstieg der b-FGF Konzentration nach 24 stündiger Verwendung von TUFT-IT® um 16% der Ausgangsmenge. Obwohl dieses Ergebnis als nicht signifikant bezeichnet wurde, kann man davon ausgehen, dass das verwendete Gelatinematerial mindestens die b-FGF Expression nicht negativ beeinflusst. b-FGF stimuliert die Kollagensynthese, Wundkontraktion, Epithelisierung und Fibronectin- und Proteoglycansynthese[22].

Noch ausgeprägter als b-FGF Expression wurde die VEGF Expression von Gelatinematerialien reguliert. Hierbei stieg die VEGF Expression um 61% signifikant nach 24 stündiger Verwendung von TUFT-IT® im Vergleich zur Kontrollgruppe an. VEGF spielt eine essentielle Rolle in der Angiogenese[21], wobei es die Proliferation von postkapillären Endothelzellen durch die NO-Produktion und cGMP-Akkumulation stimuliert[74].

Im Gegensatz zu b-FGF und VEGF sink die TGF- $\beta$  Konzentration um 19,5 % nach 24 stündiger Verwendung von TUFT-IT® leicht ab. TGF- $\beta$  spielt eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, denn es aktiviert die Angiogenese, die Proliferation und die Kollagensynthese der Fibroblasten[23].

Literaturdaten über einen direkten Einfluss auf die Wachstumsfaktoren durch Gelatinematerialien während der Wundheilung wurden nicht gefunden. Allerdings gibt es Studien, die sich mit der Wirkung von Composite-Materialien aus Gelatine und Wachstumsfaktoren auf die Wundheilung beschäftigt haben.

In einer in-vivo Studie von Kawai et al. wurde die Fibroblastenproliferation nach der Implantation von freiem b-FGF und b-FGF in Kombination mit Gelatine-Mikrokügelchen in einem künstlichen Dermismodell untersucht. Die künstliche

Haut wurde auf Meerschweinchenrücken implantiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden an den Untersuchungstagen 1, 5, und 7 nachgewiesen. Es zeigte sich, dass die Fibroblastenproliferation bei der Implantation von mit b-FGF imprägnierten Gelatine-Mikrokügelchen signifikant schneller verlief als bei freiem b-FGF, woraus es geschlossen wurde, dass die Gelatine-Mikrokugel ein vielversprechendes Instrument zur Beschleunigung der b-FGF-induzierten Geweberegeneration in künstlicher Dermis ist[75].

In einer anderen in-vitro und in-vivo Studie von Suzuki et al. wurde das Gelatine-Gel als wirksamer Träger von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  und b-FGF verwendet und förderte die Angiogenese und die Bildung von Granulationsgewebe[76].

Jinno et al. untersuchten in einer Vergleichsstudie in-vivo den Unterschied zwischen der Wirkung von Kollagen-Gelatineschwamm und Kollagenschwamm auf die Wundheilung von Rattenrückenhaut. Beide Schwammtypen wurden mit b-FGF behandelt. Nach zweiwöchiger Anwendung zeigte sich eine signifikant größere Bildung von hautähnlichem Gewebe bei der Rattengruppe, die mit Kollagen-Gelatineschwamm und b-FGF behandelt wurden. Diese Studie wies wiederum nach, dass die Gelatinematerialien geeignete Träger für Wachstumsfaktoren sind und mit denen sich gut vertragen[77].

Zusammenfassend scheint Gelatinematerial in Hinblick auf unseren ELISA-Ergebnissen und den vorherigen Studien mit den Wachstumsfaktoren kompatibel zu sein oder mindestens keinen negativen Einfluss auszuüben. Allerdings würden Erweiterung der ELISA-Untersuchung auf andere Zytokine wie z.B.  $\alpha$ -SMA und gegebenenfalls Erhöhung der N-Zahl ein genaueres Bild über die Wirkung von Gelatinematerialien auf die Wachstumsfaktoren bei der Wundheilung verschaffen.

## 7. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des gelatinebasierten Hämostyptikum TUFT-IT® auf verschiedene subzelluläre Prozesse auf Fibroblasten in-vitro untersucht. Es sollte ein Überblick verschafft werden, wie Gelatinematerialien die Fibroblasten in der Wundheilung beeinflussen und ob die operative Anwendung von diesem Hämostyptikum im Vergleich zu anderen Hämostyptika von Vorteil sein könnte. Die Motive zu diesem Forschungsprojekt waren sich gegenseitig widersprechende Ergebnisse bisheriger Studien und fehlende oder nicht ausreichende Literaturdaten zu diesem Thema[53, 54].

Unsere Studienergebnisse zeigen, dass Gelatinematerialien keine oder mindestens wenig hemmende Wirkung auf die von uns untersuchten zellulären Prozesse in einer Fibroblastenkultur ausüben. Dies wird besonders im Vergleich zu anderen Hämostyptika wie ORC und ONRC deutlich. So konnten keine signifikanten Unterschiede, weder bei Kurzzeit noch bei Langzeit Applikation, von TUFT-IT® im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in der Zellmigration, der Zellviabilität, der Kontraktion nachgewiesen werden. Zudem wurde gezeigt, dass TUFT-IT® keinen Einfluss auf den pH-Wert des umgebenden Mediums hat. In unserer Studie wurde lediglich die Fibroblastenproliferation nach längeren Einwirkzeiten durch das gelatinebasierte Hämostyptikum gehemmt.

Um eine vollständigere Vorstellung über die Wundheilungsbeeinflussung durch gelatinebasierte Hämostyptika bilden zu können, sollten weitere Versuche in Betracht gezogen werden z.B. Tierversuche um den pH Wert des gelatinebasierten Hämostyptikums in der Wunde zu bestimmen oder Untersuchungen in Wundmodellen, in denen andere Zellen außer Fibroblasten und weitere zelluläre Mechanismen wie z.B. Apoptose miteinbezogen werden. Auch wären klinische Studien zur Ergänzung der experimentellen Arbeiten von Interesse, um das gesamte wissenschaftliche Bild zu vervollständigen.

Zusammenfassend ermöglicht unsere Studie einen Einblick in die subzellulären Prozesse während der Wundheilung unter Anwendung von gelatinebasierten Hämostyptika und somit ergibt sich nun die Möglichkeit, sich in dieses Thema durch weitere klinische oder experimentelle Forschungen zu vertiefen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Young, A. and C.-E. McNaught, *The physiology of wound healing*. Surgery (Oxford), 2011. **29**(10): p. 475-479.
2. Wild, T., M. Augustin, and E.S. Debus, *Biologie der Wundheilung*. Manual der Wundheilung: : Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung. 2007, Wien: Springer-Verlag. 1-2.
3. Mann, K.G., K. Brummel, and S. Butenas, *What is all that thrombin for?* Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. **1**(7): p. 1504-1514.
4. Enoch, S. and D.J. Leaper, *Basic science of wound healing*. Surgery (Oxford), 2005. **23**(2): p. 37-42.
5. Barsotti, M.C., et al., *Effect of Platelet Lysate on Human Cells Involved in Different Phases of Wound Healing (vol 8, e84753, 2013)*. Plos One, 2014. **9**(3).
6. Nurden, A.T., *Platelets and tissue remodeling: Extending the role of the blood clotting system*. Endocrinology, 2007. **148**(7): p. 3053-3055.
7. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
8. Singer, A.J. and R.A.F. Clark, *Mechanisms of disease - Cutaneous wound healing*. New England Journal of Medicine, 1999. **341**(10): p. 738-746.
9. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 12S-34S.
10. Mutschler, W., *[Physiology and pathophysiology of wound healing of wound defects]*. Unfallchirurg, 2012. **115**(9): p. 767-73.
11. Leibovich, S.J. and R. Ross, *The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum*. Am J Pathol, 1975. **78**(1): p. 71-100.
12. Schreier, T., E. Degen, and W. Baschong, *Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. A quantitative comparison between various growth factors and a low molecular weight blood dialysate used in the clinic to normalize impaired wound healing*. Res Exp Med (Berl), 1993. **193**(4): p. 195-205.
13. Velnar, T., T. Bailey, and V. Smrkolj, *The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms*. J Int Med Res, 2009. **37**(5): p. 1528-42.
14. Nissen, N.N., et al., *Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing*. Am J Pathol, 1998. **152**(6): p. 1445-52.
15. Van De Water, L., S. Varney, and J.J. Tomasek, *Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013. **2**(4): p. 122-141.
16. Gonzalez, A.C., et al., *Wound healing - A literature review*. An Bras Dermatol, 2016. **91**(5): p. 614-620.
17. Debus, E.S. and Gross-Frengels, *Interventionelle und operative Gefäßmedizin*. 2012, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag
18. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 835-70.
19. Heldin, C.H. and B. Westermark, *Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1283-316.
20. Grotendorst, G.R., et al., *Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats*. J Clin Invest, 1985. **76**(6): p. 2323-9.
21. Gale, N.W. and G.D. Yancopoulos, *Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development*. Genes Dev, 1999. **13**(9): p. 1055-66.



22. Lawrence, W.T. and R.F. Diegelmann, *Growth factors in wound healing*. Clin Dermatol, 1994. **12**(1): p. 157-69.
23. Roberts, A.B., et al., *Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4167-71.
24. Edwards, D.R., et al., *Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor*. EMBO J, 1987. **6**(7): p. 1899-904.
25. Wikner, N.E., et al., *Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin by human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1988. **91**(3): p. 207-12.
26. Schultz, G.S., G. Ladwig, and A. Wysocki. *Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds*. 2005.
27. Schultz, G.S. and A. Wysocki, *Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing*. Wound Repair Regen, 2009. **17**(2): p. 153-62.
28. Yamaguchi, Y., D.M. Mann, and E. Ruoslahti, *Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 281-4.
29. Tran, K.T., L. Griffith, and A. Wells, *Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing*. Wound Repair Regen, 2004. **12**(3): p. 262-8.
30. Wilgus, T.A., *Growth Factor-Extracellular Matrix Interactions Regulate Wound Repair*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2012. **1**(6): p. 249-254.
31. Vedrenne, N., et al., *The complex dialogue between (myo)fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing*. Pathol Biol (Paris), 2012. **60**(1): p. 20-7.
32. Oberringer, M., et al., *In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model*. J Mol Histol, 2008. **39**(1): p. 37-47.
33. Struck, H. and T. Pillukat, *[Collagen antibodies and their effect on wound healing]*. Langenbecks Arch Chir, 1989. **374**(1): p. 12-9.
34. Friess, W., T. Wild, and I. Metzmacher, *Die Bedeutung von Kollagen und Kollagenasen in der Wundheilung*, in *Manual der Wundheilung: Chirurgisch-dermatologischer Leitfadens der modernen Wundbehandlung*. 2007, Springer-Verlag: Wien. p. 89-97.
35. Menke, N.B., et al., *Impaired wound healing*. Clin Dermatol, 2007. **25**(1): p. 19-25.
36. Smola, H., et al., *Wundheilung und Wundheilungsstörungen: Moderne Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie*. Deutsche Ärzteblatt, 2001: p. 2802-2809.
37. Guo, S. and L.A. Dipietro, *Factors affecting wound healing*. J Dent Res, 2010. **89**(3): p. 219-29.
38. Edwards, R. and K.G. Harding, *Bacteria and wound healing*. Curr Opin Infect Dis, 2004. **17**(2): p. 91-6.
39. Rodriguez, P.G., et al., *The role of oxygen in wound healing: a review of the literature*. Dermatol Surg, 2008. **34**(9): p. 1159-69.
40. H., D., L.-A. A., and D.E. S., *Postoperative Komplikationen in der Gefäßchirurgie*. Der Chirurg, 2009.
41. T., K. and W. S., *Prevention of inguinal wound healing disorders in vascular surgery*. Gefäßchirurgie, 2013: p. 120-125.
42. Wagenhauser, M.U., et al., *Oxidized (non)-regenerated cellulose affects fundamental cellular processes of wound healing*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32238.
43. R., V., *Pharmazeutische Technologie*. 2010, Berlin: Deutscher Apotheker Verlag.
44. J., L., *Die Gelatine in der Medizin*, I.f.G.d. Medizin, Editor. 2007: Heidelberg.



45. Ikada, Y., *Biological Materials*. Integrated Biomaterials Science, ed. B. R. 2002, New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishing.
46. Sundaram, C.P. and A.C. Keenan, *Evolution of hemostatic agents in surgical practice*. Indian J Urol, 2010. **26**(3): p. 374-8.
47. Hajosch, R., et al., *A novel gelatin sponge for accelerated hemostasis*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2010. **94**(2): p. 372-9.
48. Ozer, A. and B. Kostu, *Use of Gelatin Sponge Affects Postoperative Morbidity In Cesarean Section Patients*. Med Sci Monit, 2017. **23**: p. 1141-1145.
49. Sener, I., et al., *The effect of hemostatic agents and tissue adhesive on injured peripheral nerve healing in rats - Part I. Electrophysiological study*. Adv Clin Exp Med, 2015. **24**(1): p. 23-9.
50. Moscato, S., et al., *Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine sponges*. Micron, 2008. **39**(5): p. 569-79.
51. Krishnan, L.K., et al., *Comparative evaluation of absorbable hemostats: advantages of fibrin-based sheets*. Biomaterials, 2004. **25**(24): p. 5557-63.
52. Jenkins, H.P., E.H. Senz, and et al., *Present status of gelatin sponge for the control of hemorrhage; with experimental data on its use for wounds of the great vessels and the heart*. J Am Med Assoc, 1946. **132**(11): p. 614-9.
53. Charlesworth, T.M., et al., *The use of haemostatic gelatin sponges in veterinary surgery*. J Small Anim Pract, 2012. **53**(1): p. 51-6.
54. Kang, B.S., Y.C. Na, and Y.W. Jin, *Comparison of the wound healing effect of cellulose and gelatin: an in vivo study*. Arch Plast Surg, 2012. **39**(4): p. 317-21.
55. Orlova, A.A., et al., *Relationship between gelatin concentrations in silk fibroin-based composite scaffolds and adhesion and proliferation of mouse embryo fibroblasts*. Bull Exp Biol Med, 2014. **158**(1): p. 88-91.
56. Priya, S.G., et al., *Bilayer Cryogel Wound Dressing and Skin Regeneration Grafts for the Treatment of Acute Skin Wounds*. ACS Appl Mater Interfaces, 2016. **8**(24): p. 15145-59.
57. Zeng, Q.O. and W.L. Chen, *The functional behavior of a macrophage/fibroblast co-culture model derived from normal and diabetic mice with a marine gelatin oxidized alginate hydrogel*. Biomaterials, 2010. **31**(22): p. 5772-5781.
58. Cahu, T.B., et al., *Evaluation of Chitosan-Based Films Containing Gelatin, Chondroitin 4-Sulfate and ZnO for Wound Healing*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017. **183**(3): p. 765-777.
59. Sarker, B., et al., *Evaluation of Fibroblasts Adhesion and Proliferation on Alginate-Gelatin Crosslinked Hydrogel*. Plos One, 2014. **9**(9).
60. Lewandowska-Lancucka, J., et al., *Alginate- and gelatin-based bioactive photocross-linkable hybrid materials for bone tissue engineering*. Carbohydrate Polymers, 2017. **157**: p. 1714-1722.
61. Liu, J.Y., et al., *High yields of autologous living dermal equivalents using porcine gelatin microbeads as microcarriers for autologous fibroblasts*. Cell Transplantation, 2006. **15**(5): p. 445-451.
62. Kanokpanont, S., et al., *An innovative bi-layered wound dressing made of silk and gelatin for accelerated wound healing*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **436**(1-2): p. 141-153.
63. Liu, S.A., et al., *Effect of oxidized regenerated cellulose on the healing of pharyngeal wound: An experimental animal study*. Journal of the Chinese Medical Association, 2012. **75**(4): p. 176-182.
64. Nuray, A. and A. Nusret, *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): p. 109-114.

65. Nagelschmidt, M., H. Fischer, and G.H. Engelhardt, *Reversal of Gelatin-Impaired Wound-Healing in Rats by Exogenous Fibronectin*. Journal of Surgical Research, 1992. **53**(5): p. 490-494.
66. Xue, S.N., J. Lei, and L. Yan, *The Biological Behaviors of Rat Dermal Fibroblasts can be Inhibited by High Levels of mmp9*. Diabetes, 2012. **61**: p. A608-A608.
67. Iyer, P., K.J. Walker, and S.V. Madihally, *Increased matrix synthesis by fibroblasts with decreased proliferation on synthetic chitosan-gelatin porous structures*. Biotechnology and Bioengineering, 2012. **109**(5): p. 1314-1325.
68. Jaiswal, M., et al., *Bi-Layer Composite Dressing of Gelatin Nanofibrous Mat and Poly Vinyl Alcohol Hydrogel for Drug Delivery and Wound Healing Application: In-Vitro and In-Vivo Studies*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2013. **9**(9): p. 1495-1508.
69. Nakajima, K., et al., *Gelatin Hydrogel Enhances the Engraftment of Transplanted Cardiomyocytes and Angiogenesis to Ameliorate Cardiac Function after Myocardial Infarction*. Plos One, 2015. **10**(7).
70. Hart, J., et al., *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*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2002. **34**(12): p. 1557-1570.
71. Kruse, C.R., et al., *The effect of pH on cell viability, cell migration, cell proliferation, wound closure, and wound reepithelialization: In vitro and in vivo study*. Wound Repair Regen, 2017. **25**(2): p. 260-269.
72. Sharpe, J.R., et al., *The effect of pH in modulating skin cell behaviour*. British Journal of Dermatology, 2009. **161**(3): p. 671-673.
73. Schiefer, J.L., et al., *Frequent Application of the New Gelatin-Collagen Nonwoven Accelerates Wound Healing*. Advances in Skin & Wound Care, 2016. **29**(2): p. 73-78.
74. Morbidelli, L., et al., *Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium*. Am J Physiol, 1996. **270**(1 Pt 2): p. H411-5.
75. Kawai, K., et al., *Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis*. Biomaterials, 2000. **21**(5): p. 489-499.
76. Suzuki, S., N. Morimoto, and Y. Ikada, *Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors*. J Biomater Appl, 2013. **28**(4): p. 595-606.
77. Jinno, C., et al., *A Comparison of Conventional Collagen Sponge and Collagen-Gelatin Sponge in Wound Healing*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 4567

## 9. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung (1) Schematische Darstellung der Wundheilung während der Entzündungsphase</i>	4
<i>Abbildung (2) Schematische Darstellung der Wundheilung während der Proliferationsphase</i>	6
<i>Abbildung (3) Methoden zur Gelatineextraktion aus kollagenhaltigen Geweben</i>	14
<i>Abbildung (4) GELITA TUFT-IT®</i>	18
<i>Abbildung (5) - <math>\mu</math>- culture dish insert, ibidi</i>	27
<i>Abbildung (6) Darstellung einer Petrischale im Scratch-Assay</i>	30
<i>Abbildung (7) Fibroblastenviabilität nach TUFT-IT® Kurzzeitapplikation</i>	35
<i>Abbildung (8) Fibroblastenviabilität mit TUFT-IT® Langzeitapplikation</i>	36
<i>Abbildung (9) Fibroblastenproliferation mit und ohne TUFT-IT® Applikation</i>	38
<i>Abbildung (10) Fibroblastenmigration nach 60 minutiger TUFT-IT®-Zugabe zu verschiedenen Messpunkten</i>	39
<i>Abbildung (11) Einfluss von TUFT-IT® auf das Migrationsverhalten von Fibroblasten</i>	40
<i>Abbildung (12) pH-Wertmessung von Zellkulturmedium nach TUFT-IT® Applikation im Vergleich zur Kontrolle</i>	42
<i>Abbildung (13) pH-Wertmessung von Zellkulturmedium mit Zellen nach TUFT-IT® Applikation</i>	43
<i>Abbildung (14) TUFT-IT® Zerfall in Zellkulturmedium</i>	44
<i>Abbildung (15) Kontraktion von Kollagenmatrizen mit und ohne TUFT-IT® Applikation</i>	46
<i>Abbildung (16) Konzentration der verschiedenen Wachstumsfaktoren in Prozent nach TUFT-IT® Applikation</i>	48

---

## 10. Danksagung

Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Hubert Schelzig möchte ich für die Möglichkeit zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit an seinem Lehrstuhl an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf meinen herzlichen Dank aussprechen. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für sein Vertrauen und seine ständige Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Alexander Oberhuber, der mit seinen Ratschlägen und Hinweisen zur Vollendung der Arbeit in dieser Form beigetragen und mit seiner fachlichen und persönlichen Unterstützung ein motivierendes Arbeitsumfeld geschaffen hat.

Bei Herrn PD Dr. Simon möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir als Laborleiter den Zugang zum Labor und somit zur Durchführung dieser experimentellen Arbeit ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Wiebke Ibing für die intensive Betreuung und gute Zusammenarbeit im Labor. Durch Ihre kompetente Hilfe, sowohl bei experimentellem Teil als auch bei Auswertung der Arbeitsergebnisse und Aufbau des Manuskripts, konnte diese Arbeit erledigt werden.

Herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Dr. med. Markus Udo Wagenhäuser, Dr. med. Joscha Mulorz und Frau Mia van Bonn für die Unterstützung bei dieser Arbeit im Labor.

Bei Frau Hoffmann möchte ich mich auch sehr für die Bereitstellung von Arbeitsmaterialien und vor allem für die hilfsbereite und kontaktfreudige Art bedanken.

Vor allem danke ich meiner Familie, meiner Schwester, meinem Bruder und insbesondere meiner Mutter, die mich während der ganzen Zeit tatkräftig unterstützt hat.