

Aus der Klinik für Orthopädie & Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Der Einfluss wässriger CO₂-Lösungen auf
wundheilungsrelevante Parameter humaner
Zellen der Cutis *in vitro*

Dissertation

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

vorgelegt von
Niklas Kai Döhmen
2021

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

gez.:

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

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

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Die physiologische Wundheilung ist ein komplexer Prozess und Störungen in diesem Bereich sind ein häufiges klinisches Problem. In der traditionellen Medizin werden im Rahmen der Balneotherapie (lat. *balneum* „Bad“) schon seit Langem kohlenstoffdioxidhaltige Bäder (>1000 mg CO_2/l) angewendet, um die Heilung chronischer Wunden zu verbessern. Es gibt keine aktuellen wissenschaftlichen Studien, die diese Wirksamkeit belegen können.

In dieser Arbeit sollte nun der Einfluss wässriger CO_2 -Lösungen auf wundheilungsrelevante Parameter humaner Hautzellen *in vitro* untersucht werden. Dazu wurden humane Keratinozyten und Fibroblasten aus der Cutis von Spendern isoliert. Außerdem wurde ein Endothelzellstamm verwendet.

In Kultur wurden diese Zellen intermittierend mit einer hochkonzentrierten kohlenstoffdioxidhaltigen Lösung behandelt. Dabei wurde sowohl die Behandlungsdauer als auch die CO_2 -Konzentration der verwendeten Lösung variiert. Im Anschluss wurde die Auswirkung in Hinblick auf wundheilungsrelevante Parameter untersucht. Insbesondere Toxizität, Zellmigration, Proliferation sowie Differenzierung wurden betrachtet.

Während sich keine direkte Toxizität feststellen ließ, zeigte sich eine signifikant verminderte Proliferationsaktivität der Zellen. Dabei war die CO_2 -Inkubationsdauer im Gegensatz zu der CO_2 -Konzentration von geringerer Relevanz für die beobachteten Effekte. Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten konnte durch CO_2 -Behandlung signifikant vermindert werden.

Zusammenfassend konnte in diesen *in vitro* Versuchen eine Abnahme der proliferativen Aktivität, der Migration und der Differenzierung festgestellt werden. Eine Toxizität im Sinne einer Apoptoseinduktion konnte nicht beobachtet werden. Die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte auf die Wundheilung *in vivo* konnten anhand der hier untersuchten Parameter nicht nachvollzogen werden. Möglicherweise bietet gerade die verminderte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten neue Perspektiven zur Behandlung von überschießenden Narbenkontrakturen, wie sie beispielsweise bei großflächigen höhergradigen Verbrennungen der Haut als Komplikation auftreten können. Auch fibrotische Störungen des Bindegewebes sowie der Organe sind potenzielle Anwendungsgebiete.

Summary

Physiological wound healing is a complex process and disorders are a common clinical problem. In traditional medicine, balneotherapy (lat. *balneum* "bath") has long used baths containing carbon dioxide (>1000 mg CO₂/l) to improve the healing of chronic wounds. There are no current scientific studies that can prove this effectiveness.

In this work, the influence of aqueous CO₂ solutions on wound healing relevant parameters of human skin cells will now be investigated *in vitro*. For this purpose, human keratinocytes and fibroblasts were isolated from the cutis of donors. Furthermore, an endothelial cell strain was used.

In culture these cells were intermittently treated with a carbon dioxide enriched solution. The duration of treatment and the CO₂ concentration of the solutions used were varied. Subsequently, the effect was investigated with regard to parameters relevant to wound healing. In particular toxicity, cell vitality, proliferation and differentiation were considered.

While no direct toxicity could be determined, a significantly reduced proliferation activity of the cells was observed. The CO₂ incubation time does not seem to play a major role, but the CO₂ concentration does. The differentiation of fibroblasts to myofibroblasts could be significantly reduced by CO₂ treatment.

In conclusion, a decrease in proliferative activity, migration and differentiation was observed in this *in vitro* experiment. No toxicity by apoptosis induction could be observed. The positive effects on wound healing *in vivo* described in the literature could not be reproduced using the parameters examined here. However, it is possible that the reduced differentiation of fibroblasts to myofibroblasts may offer new perspectives for the treatment of excessive scar contractures, which can occur as a complication in the case of extensive, high-grade burns of the skin. Fibrotic disorders of the connective tissue and organs are also potential areas of application.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AMB	Amphotericin B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	phosphat buffered saline with Ca ²⁺ and Mg ²⁺
ECM	extracellular matrix
EDA-FN	zelluläres Fibronectin mit alternativ gespleißter Domäne A
FACS	fluorescence-activated cell sorting
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
ICAM-2	Intercellular adhesion molecule 2 (CD102)
k	Kilo
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NO	Stickstoffmonoxid
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	phosphat buffered saline
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31)

rpm	rounds per minute
SFM	Serumfreies Medium
STS	Staurosporin
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline + Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β_1	tissue/transforming growth factor β_1
VEGF	vascular endothelial growth factor
xg	relative Zentrifugalkraft
α -sma	alpha-smooth-muscle-actin

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Die Haut.....	2
1.2 Wundheilung	4
1.2.1 Inflammationsphase	5
1.2.2 Proliferationsphase	6
1.2.3 Remodellierung.....	8
1.2.4 Transforming growth factor β_1 und Myofibroblasten	9
1.2.5 Vascular endothelial growth factor und Angiogenese	12
1.2.6 Pathologische Wundheilung.....	13
1.3 Balneologie	16
1.3.1 Der Bohr-Effekt	18
1.3.2 Vasodilatation	19
1.4 Ziele dieser Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Substanzen	22
2.1.2 Kit-Systeme.....	24
2.1.3 Puffer & Lösungen	24
2.1.4 Elektrophoresegele	25
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.6 Geräte	27
2.1.7 Antikörper.....	30
2.1.8 Software.....	30
2.2 Zellkultur	30
2.2.1 Spender	31
2.2.2 Zellkulturmedien.....	32
2.2.3 Austausch des Mediums	34
2.2.4 Passagieren von Zellen.....	34
2.2.5 Kryokonservierung von Zellen.....	35

2.2.6	Auftauen von Zellen	35
2.3	Isolation von Zellen aus der humanen Cutis	35
2.4	Bestimmung der Zellzahl/ Zellvitalität.....	36
2.4.1	Neubauer-Zählkammer	36
2.4.2	CellTiterBlue-Assay.....	37
2.4.3	DNA-Bestimmung	37
2.5	Fluoreszenzmikroskopie	38
2.6	Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate.....	38
2.7	Western-Blot zur Bestimmung der Zelldifferenzierung.....	39
2.7.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	40
2.7.2	Gelelektrophorese.....	41
2.7.3	Blotting	42
2.7.4	Ponceau-S-Färbung.....	42
2.7.5	Antikörpermarkierung.....	42
2.8	Angiogenese-Assay	43
2.9	pH-Messung.....	44
2.10	Carbothera™ K104	44
2.10.1	Inbetriebnahme von Carbothera™ K104.....	45
2.10.2	Herstellung von CO ₂ -Medium	46
2.10.3	Reinigung von Carbothera™ K104	46
2.11	CO ₂ -Behandlung.....	47
2.11.1	Proliferationstest – Einfluss der Inkubationsdauer	47
2.11.2	Proliferationstest – Einfluss der Anzahl der CO ₂ -Behandlungen.	47
2.11.3	Proliferationstest – Einfluss der CO ₂ -Konzentration.....	48
2.11.4	Migrationstest.....	48
2.11.5	Differenzierungstest	49
2.12	Statistische Auswertung.....	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Untersuchung der Methodik	51
3.1.1	pH-Werte von CO ₂ -Lösungen	51
3.1.2	Kurzfristige Zellzahlveränderungen.....	52
3.1.3	Linearität der relativen Zellzahlbestimmung.....	53
3.2	Die Apoptoserate nach CO ₂ -Behandlung.....	54
3.3	Der Einfluss wässriger CO ₂ -Lösungen auf die Proliferation	57

3.3.1	Proliferation von Fibroblasten	58
3.3.2	Proliferation von Keratinozyten	60
3.3.3	Proliferation von Endothelzellen.....	62
3.3.4	Proliferationsraten.....	64
3.4	Zellmigration nach wässriger CO ₂ -Behandlung	65
3.5	Der Einfluss wässriger CO ₂ -Lösungen auf die Differenzierung von Fibroblasten	67
3.6	Angiogenese der Endothelzellen	68
3.7	<i>CellTiterBlue</i> -Fluoreszenzsignale behandelter und unbehandelter Zellen	71
4	Diskussion.....	72
4.1	Zellzahleffekte und mögliche Ursachen	73
4.1.1	Azidifizierung.....	73
4.1.2	Absoluter Zellverlust und Quantifizierung.....	75
4.1.3	Beeinflussung des Zellmetabolismus	75
4.1.4	Interaktionen zwischen CO ₂ und <i>CellTiterBlue</i>	77
4.2	Antifibrotische Effekte	78
4.3	Lokale CO ₂ -Effekte	80
4.4	Kritische Betrachtung der Methodik	82
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	85
5	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	88
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	90

1 Einleitung

Jeden Tag finden unzählige Operationen oder akzidentelle Verletzungen statt, bei denen die Integrität der menschlichen Haut durchbrochen wird. Ein vom Operateur gesetzter Hautschnitt ist häufig der einzige Teil einer Operation, der nach dieser sichtbar bleibt. Oft kommt es jedoch genau in diesem Bereich zu pathologischen Wundheilungsstörungen. Diese können sich zum einen in nicht heilenden Wunden, zum anderen aber auch in überschießender Narbenbildung manifestieren. Deshalb muss man, wenn von einer Wundheilungsstörung gesprochen wird, beide Ausprägungen beachten.

Eine nicht heilende, das heißt chronische Wunde, ist definiert als Bereich der Haut, deren Integrität nicht mehr gegeben ist und welcher nicht innerhalb von acht Wochen wieder verheilt [1]. Die Gründe für die Manifestation einer chronischen Wunde sind vielfältig, dabei kann zwischen äußeren und inneren Ursachen unterschieden werden. Beispielsweise treten chronische Wundheilungsstörungen häufig als Folge von Infektionen oder Druck im Bereich des Wundgebietes auf. Auch eine Minderversorgung mit Sauerstoff, eine sogenannte Ischämie, oder metabolische Störungen können ursächlich sein [2]. Nicht selten führen chronische Wunden der unteren Extremitäten mit oben genannter Ätiologie zu einer Amputation entsprechender Gliedmaßen. Der Großteil der in Deutschland durchgeführten Amputationen ist die Folge einer chronischen Wundheilungsstörung [1].

Außerdem gibt es wie oben bereits erwähnt verschiedene pathologische Arten des Wundverschlusses. Diese sind überwiegend gekennzeichnet durch überschießende Wundkontraktionen und Bindegewebsproliferation im Rahmen der Wundheilung. Betrachtet man nicht allein die Haut, sondern auch fibrotische Erkrankungen anderer Organe wie die Leberzirrhose, die Lungenfibrose und die große Gruppe von fibrotischen Störungen des kardiovaskulären Organsystems, stellen fibrotische Erkrankungen eine der Haupttodesursachen der entwickelten Welt dar [3].

1.1 Die Haut

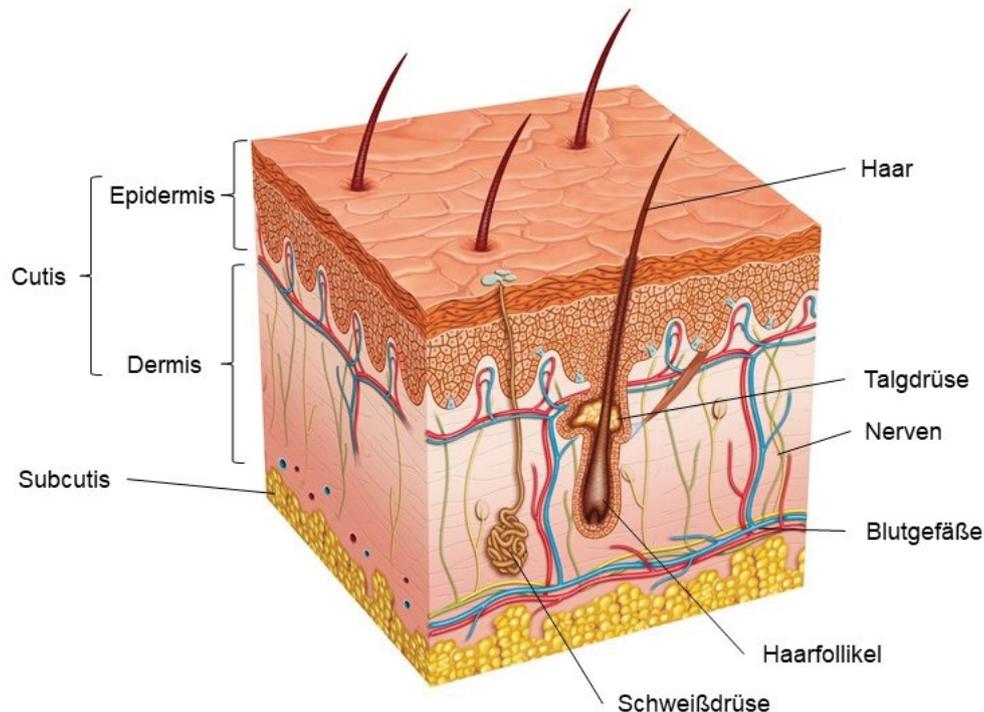


Abbildung 1 Schematischer Aufbau der Haut (Integumentum commune)

Modifiziert nach [ilusmedical/shutterstock.com](https://www.shutterstock.com)

Die Haut ist mit circa zwei Quadratmetern das größte Organ des Menschen und stellt die Barriere des Körpers zur Außenwelt dar. Sie trägt maßgeblich zur Integrität des Körpers bei und übernimmt wesentliche Funktionen im Bereich der Thermoregulation und des Flüssigkeitshaushalts. Außerdem besitzt sie eine Schrankenfunktion gegenüber exogenen Noxen, Strahlung und Mikroorganismen und ist entscheidend für die Wahrnehmung unserer Umgebung.

Die Cutis lässt sich in die Epidermis und Dermis einteilen. Die epitheliale Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen verhornenden Plattenepithel. Sie bildet die eigentliche Barriere des Organismus gegenüber der Umwelt. Dabei sind die Keratinozyten die vorherrschende Zellpopulation. Außerdem finden sich hier Melanozyten, dem Immunsystem angehörende Langerhans-Zellen und mechanosensorische Merkel-Zellen. Blutgefäße besitzt die Epidermis nicht.

Mikroskopisch lässt sich eine Vielschichtigkeit der Epidermis erkennen. Das *Stratum basale* ist die tiefste Schicht und folgt auf die Papillen der darunterliegenden Dermis. Sie beherbergt die sich teilenden epidermalen

Stammzellen. Deren Abkömmlinge wandern durch stetigen Nachschub angetrieben in das *Stratum spinosum* sowie das folgende *Stratum granulosum*. Die einzelnen Keratinozyten sind durch zahlreiche Desmosomen untereinander verbunden. Zusammen mit intrazellulären Keratinfilamenten bilden sie so einen widerstandsfähigen Komplex.

Die oberste Schicht der Epidermis ist das *Stratum corneum*, das die äußere Barriere bildet. Auf dem Weg Richtung Oberfläche bilden die Keratinozyten verschiedene Produkte, um dort eine feste Keratinschicht zu bilden. Auf diesem Weg verlieren die Keratinozyten ihren Kern und ihre Zellorganellen.

Das *Stratum corneum* wird umgangssprachlich auch als Hornhaut bezeichnet und ist ein Komplex aus toten, verhornten Zellbestandteilen. Diese werden mit der Zeit abgeschilfert und stetig durch aus der Tiefe heranrückende Zellen ersetzt.

Die Dermis, auch Lederhaut genannt, verleiht der Cutis ihre mechanische Stabilität. Sie besteht zum einen aus dem *Stratum papillare*, das in der Peripherie an das *Stratum basale* der Epidermis angrenzt. Die Papillen enthalten die endständigen Kapillaren sowie Lymphgefäße. Sie sind reich an lockerem Bindegewebe, welches hauptsächlich aus Kollagen Typ I sowie Typ II und elastischen Fasern besteht. Dazwischen liegen zahlreiche neuronale Endigungen, welche verschiedene Modalitäten der Sensibilität der Haut vermitteln. In der Tiefe folgt das *Stratum reticulare*, welches durch ein gitterartiges Geflecht aus Bindegewebe und elastischen Fasern charakterisiert ist und die letzte Schicht der eigentlichen Cutis bildet. Diese Formation bewirkt die mechanische Belastbarkeit der Haut, da sie entsprechende Rückstellkräfte bei mechanischer Beanspruchung ausübt.

Zusammen mit der Subcutis bildet die Cutis das *Integumentum commune*. Die Subcutis besteht aus lockerem Bindegewebe und Fettgewebe. Sie enthält die epifaszialen Nerven- und Gefäßbahnen. Die Subcutis wird zur Körpermitte hin durch die allgemeinen Körperfaszien aus stabilen Kollagenfasern abgetrennt.

Je nach Körperregion ist die Haut zusätzlich mit unterschiedlichen Hautanhangsgebilden versehen. Dazu gehören Nägel, Haare sowie Schweiß- und Talgdrüsen. Haare und Nägel sind besondere Produkte des Verhornungsmechanismus der epidermalen Keratinozyten. Dabei können Haarfollikel auch bis in die Subcutis reichen. Auch die Drüsen sind epitheliale

Gebilde zur Schweiß- und Talgproduktion. Während Talgdrüsen und ekkrine Schweißdrüsen haarfollikelassoziiert sind, können apokrine Schweißdrüsen auch an unbehaarter Haut auftreten [4, 5].

1.2 Wundheilung

Da die Haut das größte und äußeren Einflüssen am stärksten ausgesetzte Organ des Menschen ist, sind potente Reparaturmechanismen bei Verletzungen notwendig. Die schwerwiegenden Folgen eines Verlustes großer Hautareale lassen sich beispielhaft bei schwer verbrannten Patienten beobachten. Es kommt zu einer sich rasch entwickelnden Hypothermie [6]. Darüber hinaus kann sich je nach Ausmaß der verbrannten Körperoberfläche, ein hypovolämer Schock durch einen hohen Flüssigkeitsverlust einstellen [6]. Außerdem besitzen Patienten bei Verlust der Hautintegrität keine Barrierefunktion mehr gegenüber der Außenwelt, sodass es zu einem raschen Eindringen von Mikroorganismen kommen kann. Dies wiederum kann zu der Ausbildung eines septischen Krankheitsbildes führen [6]. Somit ist das Ziel nach einer Verletzung der Haut, die Integrität durch eine adäquate Wundheilung schnellstmöglich wieder herzustellen.

Bei oberflächlichen Defekten im Bereich der Epidermis kann eine komplette Wiederherstellung des Ursprungsgewebes, eine *Restitutio ad integrum* stattfinden. Bei tiefer gehenden Verletzungen kann hingegen nur eine *Reparatio* erfolgen; der Hautdefekt wird durch minderwertiges Narbengewebe verschlossen und bleibt so ohne vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion. Sobald es zu einer Verletzung der Haut kommt, setzt sich eine Kaskade unter Beteiligung verschiedener Zellen und Mediatoren in Gang, um den entstandenen Defekt wieder zu verschließen.

Dabei sind heute noch nicht alle Mechanismen verstanden, die in diesem komplexen Prozess eine Rolle spielen. Verschiedene lokale und systemische Faktoren können den Prozess der physiologischen Wundheilung positiv oder negativ beeinflussen. Zu den systemischen Faktoren zählen allgemein, neben dem Alter und Geschlecht, Krankheiten wie *Diabetes mellitus* oder *Adipositas*. Außerdem können Medikamente wie Glucocorticoide oder Chemotherapeutika und Noxen wie Rauchen oder Alkohol die Wundheilung negativ beeinflussen [7].

Zu den lokalen Faktoren gehören die Sauerstoffversorgung im Gewebe, die Exposition gegenüber Druck sowie Infektionen [7].

Allgemein wird die physiologische Wundheilung in drei Phasen eingeteilt, welche sich jedoch zeitlich überschneiden und nebeneinander ablaufen können. Grob lässt sich die physiologische Wundheilung in die akute inflammatorische Phase, die proliferative Phase und die Remodellierungsphase einteilen.

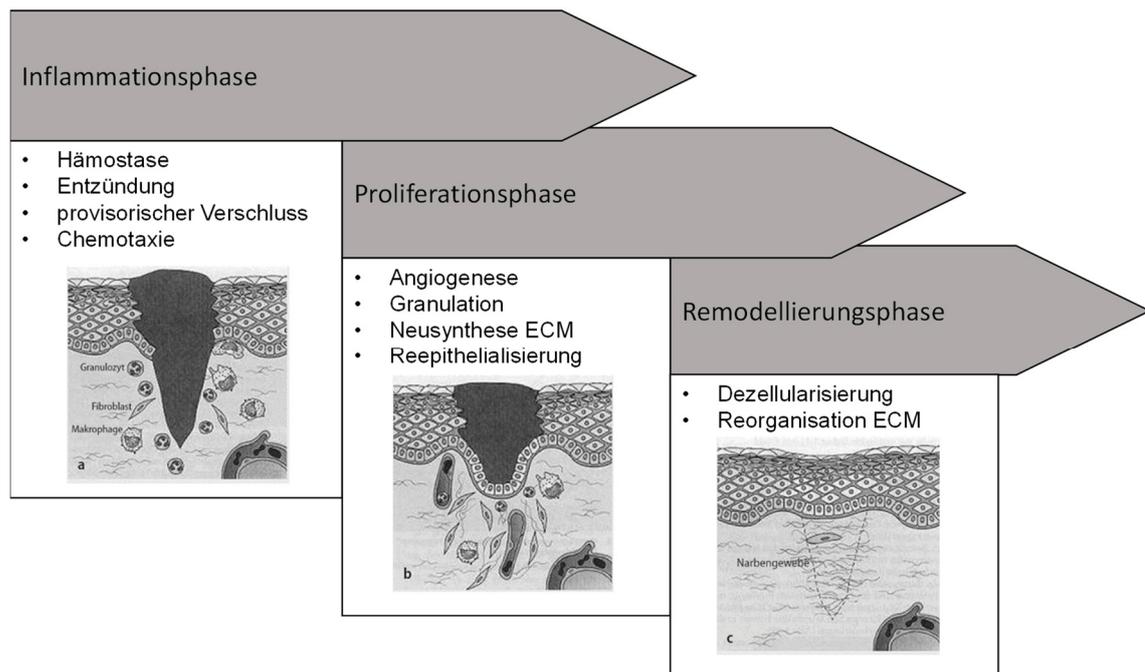


Abbildung 2 Schematische Darstellung der drei Phasen der Wundheilung

a Die Entzündungsphase stellt die initiale Reaktion des Organismus auf eine Verletzung dar. Zellen der Immunabwehr wandern in das Wundgebiet ein und es folgt ein provisorischer Verschluss der Wunde durch ein Gerüst aus Fibrin und aktivierten Thrombozyten. **b** Proliferationsphase: Die Fibroblasten wandern ein und proliferieren. Gleichzeitig beginnt die Synthese eines neuen bindegewebigen Gerüsts. Endothelzellen lassen neue Kapillare in das Wundgebiet einsprossen, um die Perfusion sicherzustellen. Keratinozyten beginnen, von den Rändern aus die Wundfläche neu zu epithelialisieren. **c** Umbauphase: Das entstandene zellreiche Granulationsgewebe wird dezellularisiert und das initial gebildete Bindegewebe zur Erlangung höherer mechanischer Stabilität remodelliert. Die Epitheldecke wird vervollständigt. Eigene Darstellung unter Verwendung von Bildern mit Erlaubnis von Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer HNO 54, 893–905 Baisch, A., Riedel, F. Hyperplastische Narben und Keloide. 2006

1.2.1 Inflammationsphase

Direkt nach einer Verletzung der Haut kommt es lokal initial zu einer Vasokonstriktion, die den Blutverlust minimieren soll [8]. Gleichzeitig treten Thrombozyten aus dem defekten Gefäßsystem aus und kommen so in Kontakt

mit zerstörten Endothelzellen und Kollagen der extrazellulären Matrix. Dies führt zu einer Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten und zur Freisetzung ihrer Granula [8]. Simultan werden die extrinsische und intrinsische Kaskade der Blutgerinnung aktiviert, sodass es schlussendlich zu einer Polymerisierung von Fibrin kommt. Der Hautdefekt kann so durch eine verklottete Masse aus Thrombozyten und Fibrin verschlossen werden [8, 9].

Die aus den Granula aktivierter Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren wie *platelet derived growth factors* (PDGF) fördern durch Chemotaxis das Einwandern immunologischer Zellen wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten [9]. Mediatoren wie Prostaglandine führen in dieser Phase der Wundheilung dazu, dass Gefäße dilatieren und permeabel werden, um den Übertritt von Zellen aus dem Blut ins Gewebe zu erleichtern [8]. Neben den genannten immunologischen Zellen wandern auch matrixbildende Zellen wie Fibroblasten aus dem umliegenden Gewebe in das Wundgebiet ein [10]. Während der Inflammationsphase dient die entstandene Fibrinmatrix migrierenden Zellen als Gerüst [10]. Außerdem können sich entlang dieser Matrix Gradienten von Wachstumsfaktoren bilden, welche die Zellmigration steuern.

Durch die erhöhte Gefäßpermeabilität und Vasodilatation kommt es zügig zu einer Ödembildung und Rötung der Haut. Somit sind neben der *Functio laesa* mit *Rubor*, *Tumor* und *Calor* die typischen Zeichen einer Entzündungsreaktion gegeben, die dem Stadium der Wundheilung seinen Namen geben.

Neutrophile und Gewebsmakrophagen räumen Bakterien, avitales Gewebe und Zelltrümmer im Wundgebiet ab [10]. Ansammlungen von phagozytierenden neutrophilen Granulozyten können als Eiter im Wundgebiet sichtbar werden.

1.2.2 Proliferationsphase

In der Proliferationsphase wird ein neues Stroma im Wundgebiet generiert. Dieses gut kapillarisierte Stroma wird im klinischen Alltag auch Granulationsgewebe genannt. Eingewanderte Fibroblasten beginnen im Wundgebiet zu proliferieren und eine neue extrazelluläre Kollagenmatrix, die vor allem aus Kollagen Typ I und III besteht, zu produzieren [11]. Stimuliert wird dieser Vorgang durch *tissue growth factor* β_1 (TGF- β_1). Das zu diesem Zeitpunkt

dominante Kollagen Typ III ersetzt zusammen mit Kollagen Typ I die Fibrinmatrix [12].

Eingewanderte Endothelzellen beginnen neue Kapillaren zu bilden und das Wundgebiet zu durchsetzen. Sie wandern, unter anderem durch *vascular endothelial growth factor* (VEGF) stimuliert, aus angrenzenden Gefäßen in das Wundgebiet ein. Dabei exprimieren sie Enzyme, die das umliegende Gewebe degenerieren, um somit Raum zur Aussprossung neuer vaskulärer Strukturen zu schaffen [8].

Der Nutzen eines primären Wundverschlusses, so wie er bei einer Operation mittels Naht durchgeführt wird, erscheint mit Blick auf die Proliferationsphase sinnvoll. Primär verschlossene Wunden müssen aufgrund ihrer bereits adaptierten Wundränder deutlich weniger Granulationsgewebe aufbringen, um den Defekt auszufüllen. Sekundär heilende Wunden hingegen müssen langsam aus der Tiefe und von den Seiten her „zugranulieren“. Dabei sind sie stets größeren mechanischen sowie infektiologischen Belastungen ausgesetzt.

Physiologischerweise kommt es im Rahmen der Wundheilung zu einer sogenannten Wundkontraktion [9]. Dabei werden die Wundränder näher zusammen geführt, um den Bedarf an Granulationsgewebe zu reduzieren [9]. Differenzierte Fibroblasten spielen dabei eine entscheidende Rolle [13]. Unter dem Einfluss von TGF- β differenzieren Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese Myofibroblasten zeigen sowohl Eigenschaften von Fibroblasten als auch von glatten Muskelzellen. Sie zeichnen sich durch eine erhöhte Expression von *alpha-smooth-muscle-actin* (α -sma) aus [14]. Durch α -sma sind diese Zellen in der Lage, kontraktile Kräfte auf das umliegende Gewebe auszuüben und so die Wundfläche zu verkleinern.

Sobald ausreichend Granulationsgewebe vorhanden ist, auf dessen Grundlage Keratinozyten migrieren können, beginnt die Reepithelialisierung des Wundgebietes. Dabei wandern Keratinozyten von den Wundrändern aus ein [10, 15]. Neuere Studien belegen, dass sowohl ekkrine Schweißdrüsen als auch die Haarfollikel-Talgdrüseneinheiten wichtige Ausgangspunkte für die Migration von Keratinozyten zur Reepithelialisierung der Wundfläche darstellen können [15, 16].

1.2.3 Remodellierung

Nach der proliferativen Phase, in der der Defekt mit neuem Gewebe verschlossen wurde, setzt die Umbauphase oder Remodellierung ein. Diese kann Monate bis Jahre andauern. Das rasch gebildete Granulationsgewebe, welches dem zügigen Wundverschluss diente, wird nun reorganisiert und es entsteht eine bindegewebige Narbe [10]. Hierbei regulieren Fibroblasten die Degradation über Matrixmetalloproteasen sowie die Neusynthese und damit die Reorganisation des Bindegewebes [8]. Das im Granulationsgewebe vorherrschende Kollagen vom Typ III wird weitestgehend durch das für die Dermis typische Kollagen Typ I ersetzt [17]. Das Granulationsgewebe des frisch verschlossenen Hautdefektes ist reich an Zellen und arm an extrazellulärer Matrix (ECM). Während der Umbauphase verschiebt sich dieses Verhältnis zugunsten der ECM [18]. Dabei gehen vor allem Myofibroblasten und überflüssige Endothelzellen durch Apoptose unter [12, 17]. Die verringerte mechanische Belastung, welche durch das gut ausgebaute Bindegewebe im ehemaligen Wunddefekt auf die Zellen wirkt, ist ein wichtiger Trigger für die Dezellularisierung [17]. Durch die Reorganisation zu Narbengewebe wird eine höhere mechanische Belastungsfähigkeit des ehemaligen Defektgebietes erreicht, wobei diese jedoch nicht an die der ursprünglichen intakten Haut heranreicht. Außerdem ist es der neu regenerierten Epidermis nicht möglich, einmal verlorene Haarfollikel oder Schweißdrüsen zu regenerieren [9].

1.2.4 Transforming growth factor β_1 und Myofibroblasten

Eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von Fibroblasten spielt der *transforming growth factor* β_1 . TGF- β_1 wird während der Wundheilung vorrangig durch eingewanderte Gewebsmakrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten und Thrombozyten freigesetzt [8, 19]. Es liegt als Dimer gebunden in der extrazellulären Matrix vor und wird in diesem Zustand als *latent complex* bezeichnet [20]. Bevor TGF- β_1 seine Wirkung entfalten kann, muss der *latent complex* durch proteolytische Spaltung oder Integrin-vermittelte Konformationsänderung aktiviert werden [20, 21]. TGF- β_1 bindet an den extrazellulären heteromeren TGF- β -Rezeptorkomplex und ermöglicht so durch eine intrazelluläre Rezeptorkinase die Phosphorylierung von smad 2 und smad 3. Zusammen mit smad 4 bilden die smad-Proteine so ein Trimer, welches im Nukleus die Differenzierung zu Myofibroblasten vorantreibt und somit die Transkription von α -sma bedingt [20, 22].

Neben diesem smad-Signalweg werden auch Rho-GTPase Signalwege durch die Bindung von TGF- β angestoßen. Bindet GTP an ein RhoA-Protein wird dieses aktiviert und kann wiederum ein Effektorprotein aktivieren [23]. Dabei kann nun globuläres Aktin in das für Myofibroblasten typische fibrilläre F-Aktin (*stress fibers*) umgewandelt werden [20, 24]. Durch die intrinsische Rho-GTPase Aktivität wird GTP zu GDP hydrolysiert und deaktiviert das RhoA-Protein.

Des Weiteren kann der aktivierte TGF-Rezeptorkomplex auch MAP-Kinase Wege in Gang setzen. Über *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) und der darauf folgenden Signalkaskade über AP-1 Transkriptionsfaktoren findet ein essentieller Beitrag zur Fibroblastendifferenzierung statt. Wie unter anderen Hu et al. zeigen konnten, führt eine Inhibition auf verschiedenen Ebenen dieser Signalkaskade immer zu einer verminderten Expression von α -sma [25, 26].

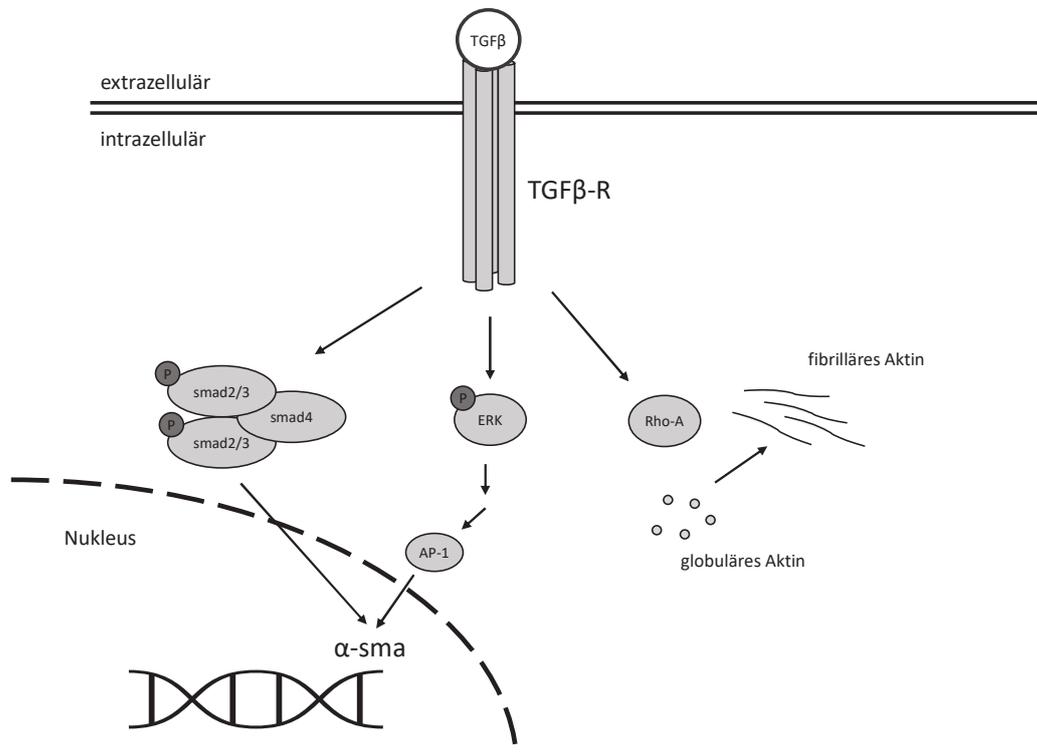


Abbildung 3 TGF- β Signalwege

Nach Bindung von TGF- β_1 phosphoryliert die Rezeptorkinase die Proteine smad 2 und smad 3, sodass zusammen mit smad 4 ein Trimer entsteht. Dieses Trimer gelangt in den Nucleus und kann dort die Expression von α -sma initiieren. Darüber hinaus bestehen MAP-Kinase-Wege, welche über die Phosphorylierung von ERK und eine Signalkaskade über AP-1 die α -sma-Expression in Gang setzen. Des Weiteren kann über eine Rho-GTPase gesteuert globuläres Aktin in für Myofibroblasten typisches fibrilläres Aktin umgesetzt werden. In Anlehnung an [20].

TGF- β_1 ist wie oben beschrieben der potenteste Stimulus für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche durch die Expression von α -sma kontraktile Eigenschaften besitzen.

Die intermediäre Zellspezies der Myofibroblasten weist somit Merkmale sowohl von Fibroblasten als auch von glatten Muskelzellen auf. Myofibroblasten treten erstmals als typisches Zeichen der proliferativen Phase auf.

Während der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durchlaufen die Zellen das Stadium der Proto-Myofibroblasten. Die Differenzierung von Fibroblasten im Wundgebiet wird vorrangig durch TGF- β_1 stimuliert. Es existieren aber auch weitere wichtige Stimuli. So sind sowohl mechanischer Stress, als auch zelluläres Fibronectin wichtige Trigger für die Ausbildung des Phänotyps eines Myofibroblasten [27].

Mechanischer Stress ist insbesondere für die Differenzierung von Fibroblasten zu Proto-Myofibroblasten unerlässlich. Proto-Myofibroblasten reagieren auf den mechanischen Stress durch eine typische Expression von alternativ gespleißtem Fibronectin, welches die zusätzliche Domäne A enthält (EDA-FN) [28].

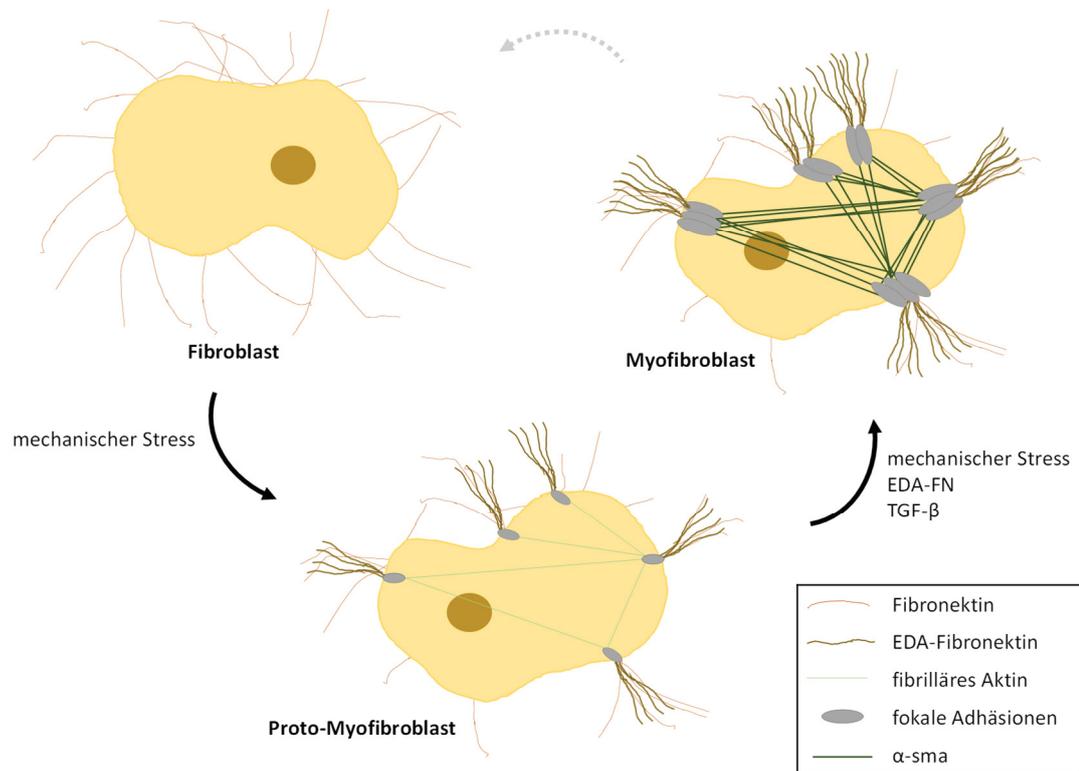


Abbildung 4 Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten

Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten erfolgt über den Phänotyp des Proto-Myofibroblasten. Dazu dient mechanischer Stress als Trigger für die Differenzierung. Typisch für den Myofibroblasten sind die Ausbildung starker fokaler Adhäsionen sowie von α -sma-Bündeln. Ausschlaggebend für die Expression von α -sma ist der Einfluss von TGF- β 1. Studien legen nahe, dass auch eine Entdifferenzierung von Myofibroblasten zurück zu Fibroblasten möglich ist. In Anlehnung an [28].

EDA-FN wird als Reaktion auf mechanische Reize von Proto-Myofibroblasten zusätzlich zu Fibronectin, welches für Prozesse wie die Migration und Adhäsion unerlässlich ist, auf der Zelloberfläche exprimiert. Dabei interagiert es als Teil der extrazellulären Matrix einer Zelle mit den fokalen Adhäsionen und dem Zytoskelett [28]. Somit entsteht ein Komplex, der mechanischen Spannungen durch Kontraktion entgegenwirken kann.

Proto-Myofibroblasten zeigen im Gegensatz zu Myofibroblasten aber noch keine Expression von α -sma.

In vivo entsteht mechanischer Stress im Kontext der kutanen Wundheilung vor allem dann, wenn die Hautdecke nicht geschlossen ist und die Wundränder somit auseinanderklaffen.

Bei *in vitro* Kulturen von Fibroblasten in starren Kulturgefäßen wird mechanischer Stress erzeugt, sobald durch adhäsives Wachstum auf dem rigiden Kulturboden Zug auf die Zellen entsteht. Somit lässt sich bei Fibroblastenkulturen in starren Kulturgefäßen ebenfalls eine erhöhte Expression von EDA-FN nachweisen, sodass sich der Phänotyp eines Proto-Myofibroblasten ergibt [28, 29].

EDA-FN kann unter dem Einfluss von TGF- β_1 und anhaltendem mechanischem Stress die Differenzierung von Proto-Myofibroblasten zu Myofibroblasten verstärken [13]. Dabei ist TGF- β_1 essentiell für die Expression von α -sma, welches für Myofibroblasten charakteristisch ist.

In vivo Untersuchungen konnten zeigen, dass Myofibroblasten nach erfolgter Reepithelialisierung des ehemaligen Wundgebiets durch Apoptose untergehen [30]. Der Übergang von Granulationsgewebe in reifes Narbengewebe ist gekennzeichnet durch eine starke Dezellularisierung. Dieser Schritt ist essentiell für die Bildung eines gesunden, physiologischen Narbengewebes [30]. Dabei sind die genauen Signalwege, die zu einem Untergang der Myofibroblasten und einer Verringerung der Fibrosierung führen, nicht bekannt [31]. Es wird angenommen, dass verschiedene Mechanismen wie Apoptose, Dedifferenzierung und Reprogrammierung von Bedeutung sind [32].

1.2.5 Vascular endothelial growth factor und Angiogenese

Bei Verletzungen der Haut, die über die Epidermis hinaus gehen, kommt es ebenso zu einer Verletzung der versorgenden Kapillaren. Diese Verringerung der lokalen Vaskularisierung führt zu einer Verminderung des Sauerstoffangebotes und damit zu einer Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes im Wundgebiet. Diese Hypoxie hat dann eine Verschiebung des pH-Wertes zur Folge, zum einen aufgrund der einsetzenden anaeroben Stoffwechsellage und zum anderen aufgrund einer Hyperkapnie durch die lokal insuffiziente Kreislauftsituation. Die Hypoxie induziert die Freisetzung von *vascular endothelial growth factor* durch Makrophagen und weitere Zelltypen wie Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen [33]. Der so entstehende Konzentrationsgradient von VEGF führt

dazu, dass Endothelzellen diesem folgen, neue Gefäßformationen bilden und somit das Wundgebiet neu kapillarisieren.

1.2.6 Pathologische Wundheilung

Es lassen sich zwei Arten von Wundheilungsstörungen unterscheiden. Zum einen kann es zu einem beeinträchtigten Verschluss der Wunde kommen, sodass man von einer chronischen Wundheilungsstörung spricht. Dabei kommt es zu Störungen während der Proliferationsphase der Wundheilung. Es kann also zumeist kein suffizientes Granulationsgewebe gebildet werden, wodurch der Wundverschluss und eine Reepithelialisierung verhindert werden [30].

Zum anderen kann nach dem Verschluss der Wunde eine Störung in der Remodellierungsphase auftreten. Das Narbengewebe wird nicht adäquat umgebaut und es kommt zu einer überschießenden Reaktion. Dabei sind vor allem extrazellulärmatrixbildende Myofibroblasten von entscheidender Bedeutung [17]. In diesem Fall spricht man von fibrotischen Wundheilungsstörungen. Neben ästhetischen Gesichtspunkten kann eine fehlgesteuerte Wundheilung mit Fibrosierung und Kontraktion auch zu funktionellen Einschränkungen führen. So können beispielsweise kontrakte Narben im Bereich von Gelenken, je nach Ausmaß, deren Bewegungsumfang einschränken.

1.2.6.1 Chronische Wundheilungsstörung

Eine chronische Wunde wird in der S3-Leitlinie *„Lokaltherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz“* wie folgt beschrieben: „Eine chronische Wunde wird definiert als Integritätsverlust der Haut und einer oder mehrerer darunter liegenden Strukturen mit einer fehlenden Abheilung innerhalb von acht Wochen“ [34].

Die Gründe für die Entstehung einer chronischen Wunde sind vielfältig und können sich gegenseitig beeinflussen. Oftmals sind systemische oder lokale Grunderkrankungen wie ein *Diabetes mellitus* oder eine periphere arterielle Verschlusskrankheit ein aggravierender Faktor. Durch Angiopathien kommt es zu verringerten Sauerstoffpartialdrücken, was unter anderem zu einer Zunahme

des nekrotischen Gewebes führen kann. Dieses bietet wiederum einen optimalen Nährboden für bakterielle Infektionen des Wundgebietes [35]. Daher ist es wichtig, eine chronische Wunde im Gesamtkonzept zu betrachten. Neben den bereits genannten Faktoren spielen auch nutritive Aspekte wie eine ausreichende Zufuhr von Mikronährstoffen und eine angemessen hohe Proteinaufnahme eine Rolle [36].

Wichtig für die Therapie chronischer Wunden ist das regelmäßige Wunddebridement mit Abtragung des avitalen beziehungsweise nekrotischen Materials sowie die Behandlung und Vermeidung von Infektionen [1]. Es gibt zahlreiche antimikrobielle Substanzen, die lokal oder systemisch appliziert werden können. Dabei ist die lokale Applikation bei oberflächlichen Infektionen zu bevorzugen [37]. Außerdem stehen zahlreiche medizinische Wundauflagen zur Verfügung, die neben dem Schutz vor Infektionen auch oft direkte antimikrobielle Effekte besitzen [35, 37]. Eine spezielle Art des Wundverbandes stellt die *vacuum assisted closure therapy* (VAC-Therapie) dar. Dabei wird die Wunde luftdicht verbunden und eine Unterdruckpumpe angeschlossen. Die Vorteile der VAC-Therapie sind zum einen der Schutz vor bakterieller Infektion bei steriler Anlage und der gleichzeitige Abtransport von Wundexsudat [38]. Es zeigen sich verbesserte Wundheilungsbedingungen mit gesteigerter Ausbildung von Granulationsgewebe unter VAC-Therapie [38].

Chronische Wunden sind aufgrund aufwändiger Pflege und häufiger sowie langanhaltender Beanspruchung des Gesundheitssystems ein großer Kostenfaktor [35]. Dabei wird die Inzidenz chronischer Wundheilungsstörungen in Folge steigender Fallzahlen von Krankheiten wie *Diabetes mellitus* noch weiter ansteigen [35]. Perspektivisch ist zu erwarten, dass neue und innovative Behandlungskonzepte für chronische Wunden entwickelt werden [35], da selbst die physiologische Wundheilung noch nicht in ihrer gesamten Komplexität verstanden und Gegenstand zahlreicher Forschungsbemühungen ist.

1.2.6.2 Fibrotische Störungen

Fibrotische Störungen sind definiert als pathologische Vermehrung der Extrazellulärmatrix. Hypertrophe Narben und Keloide sind Störungen, die bei der Heilung einer Hautwunde und daraus folgender Narbenbildung auftreten. Sie

können neben den ästhetischen Problemen auch zu funktionellen Einschränkungen führen.

Eine normale, reife Narbe sollte im Hautniveau liegen, von blasser Farbe und weder schmerzhaft noch juckend sein. Hypertrophe Narben hingegen ragen über das Hautniveau hinaus, sind gerötet und in der Regel juckend oder schmerzhaft. Es zeigt sich innerhalb von Monaten bis Jahren eine Selbstheilungstendenz, daher ist eine operative Narbenrevision zu einem frühen Zeitpunkt nicht indiziert [18]. Im Gegensatz zu einer hypertrophen Narbe wächst das Keloid durch eine Vermehrung von Bindegewebe über den ursprünglichen Wunddefekt hinaus. Eine Rückbildung ist nicht zu erwarten. Lediglich kann ein Sistieren der Größenprogression auftreten. Bei einer chirurgischen Revision ist ein Rezidiv häufig, sodass eine gründliche Abwägung vor einer chirurgischen Intervention getroffen werden muss. Generell ist das Keloid deutlich seltener als eine hypertrophe Narbe [18].

Die bindegewebige Vermehrung des Narbengewebes wird durch eine fehlgesteuerte Aktivierung von Fibroblasten und damit Differenzierung zu Myofibroblasten initiiert. Myofibroblasten sind in der Lage, große Mengen an ECM-Bestandteilen zu produzieren. Ein häufiger Trigger der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist, wie oben bereits beschrieben, der *transforming growth factor* β [11, 39].

Entscheidend für die Entstehung von pathologischen Narben ist die Persistenz von Myofibroblasten nach Abschluss der Wundheilung [20]. Dabei wird anhaltender mechanischer Stress im Wundgebiet als wichtiger Faktor der Persistenz von Myofibroblasten diskutiert [17]. Wie bereits erläutert, stellt der mechanische Stress zusammen mit dem TGF- β_1 -Signalweg auch einen entscheidenden Faktor der initialen Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten dar [29].

Die überschießende Narbenbildung ist weiter Gegenstand aktueller Forschung. Sicher ist, dass Myofibroblasten und deren Haupteffektor TGF- β_1 über die vermehrte Bildung von ECM eine entscheidende Rolle spielen [32].

1.3 Balneologie

Die europäische Balneologie als Lehre der therapeutischen Anwendung von Bädern kennt das wässrige Kohlenstoffdioxidbad schon seit Jahrhunderten [40]. Seit jeher wurden natürliche CO₂-haltige warme Quellen für medizinische Zwecke genutzt. Eine Quelle wird als kohlenstoffdioxidhaltig definiert, sobald sie eine Konzentration von 1000 mg/l freiem CO₂ enthält [40]. Eine andere Form des Kohlenstoffdioxidbades stellen trockene Bäder dar, bei denen der Patient lediglich einer erhöhten CO₂-Gasatmosphäre ausgesetzt ist. Diese sind nicht Gegenstand der folgenden Untersuchung.

Bei der Verwendung hoch konzentrierter, wässriger Kohlenstoffdioxid-gesättigter Bäder ist die gute Löslichkeit von CO₂ in Wasser ein Vorteil. Dabei reagiert CO₂ mit H₂O nur zu circa 0,3 % zu Kohlensäure und liegt somit zum Großteil physikalisch gelöst vor [41].

Kreislaufparameter	Änderung	
	CO ₂ -Einzelbad	CO ₂ -Bäderkur
kutaner pO ₂	++	(+)
Laser-Doppler-Flow	+	++
Venöse Kapazität (Unterschenkel)	-	(-)
Systolischer Blutdruck	-	-
Diastolischer Blutdruck	-	-
Blutdruckamplitude	(+)	±
Pulswellengeschwindigkeit	-	-
Peripherer Kreislaufwiderstand	-	-
Pulsfrequenz	-	(+)
Herzschlagvolumen	+	+
Herzminutenvolumen	+	+

Tabelle 1 Der Einfluss von wässrigen CO₂-Bädern auf verschiedene Kreislaufparameter

Dargestellt sind Kreislaufparameter und deren Änderungen bei CO₂-Einzelbädern und CO₂-Bäderkuren. + Zunahme, - Abnahme; Modifiziert nach Amelung, W. (1985). Balneologie und medizinische Klimatologie / Bd. 2 : Balneologie. Berlin, Springer.

Den wässrigen CO₂-Bädern werden zahlreiche positive und anhaltende, kreislaufwirksame Effekte zugesprochen. Es gibt diverse Studien, die die

kreislauffrelevanten Wirkungen von CO₂-Bädern untersucht haben und bestätigen konnten [40]. Zu beachten ist, dass neuere Literatur kaum vorhanden und Untersuchungen zu diesem Thema zumeist über 30 Jahre alt sind. Tabelle 1 stellt eine Auswahl von nachgewiesenen Kreislauffeffekten dar.

Aktuelle Studien über wässrige, kohlenstoffdioxidhaltige Bäder wurden vor allem zu potenziell wundheilungsfördernden Effekten angefertigt. Betrachtet wurden dabei vor allem Fußbäder, die zur Therapie von typischen chronischen Wundheilungsstörungen der unteren Extremität angewandt wurden. Die Ursachen der untersuchten Wundheilungsstörungen waren zumeist die periphere arterielle Verschlusskrankheit, die chronisch venöse Insuffizienz und gegebenenfalls die Kombination mit *Diabetes mellitus* und die daraus resultierenden Folgeerkrankungen wie eine Mikroangiopathie und eine diabetische Neuropathie. Dabei handelt es sich überwiegend um klinische *in vivo* Studien. In der Regel konnten bei der Durchführung einer CO₂-Bädertherapie positive Einflüsse auf die Heilung chronischer Wunden beobachtet werden. Endpunkte wie ein Progress der Fläche einer chronischen Wundheilungsstörung konnten dabei signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert werden [42].

Bei diesen Studien kamen zumeist artifizielle CO₂-Bäder zum Einsatz. Zur Herstellung dieser hochkonzentrierten CO₂-Bäder wurden häufig Aufbauten wie das auch hier verwendete CarbotheraTM K104-Gerät genutzt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, künstliche kohlenstoffdioxidhaltige Bäder zu erzeugen, dabei wird von Karbonisierung gesprochen [43]. Die verschiedenen zur Verfügung stehenden Verfahren, um Kohlenstoffdioxid in Flüssigkeiten zu lösen differieren in den Punkten Zeit, Druck und Kontaktfläche. Außerdem hängt die Karbonisierung auch von der Zusammensetzung und Temperatur der Flüssigkeit ab [43]. Grundlegend besteht ein Gleichgewicht zwischen freiem Gas in der Gasphase und gelöstem Gas in der Flüssigkeit. Erhöht man nun den Gasdruck in der Gasphase, erhöht sich auch der gelöste Anteil. Dabei hängt die Geschwindigkeit dieses Äquilibrationsprozesses unter anderem von der Oberfläche ab, an welcher ein Austausch zwischen den beiden Phasen stattfinden kann. Die Bestandteile der Flüssigkeit können die Löslichkeit eines Gases darin ebenfalls beeinflussen [43]. Außerdem gilt, dass Gase bei niedrigeren Temperaturen besser in Flüssigkeiten löslich sind.

Hersteller von handelsüblichen Wassersprudlern bringen Kohlenstoffdioxid über hohen Druck schnell in Lösung. Das hier verwendete Gerät Carbothera™ K104 macht sich eine Kombination aus hohem CO₂-Druck und großer Oberfläche, an der Gas und Flüssigkeit in Kontakt treten können, zunutze. Der Gasdruck wird über eine handelsübliche Gasflasche erzeugt. Dieser umströmt semipermeable Hohlfasern, welche von der zu karbonisierenden Flüssigkeit durchspült werden. Über die vielen Einzelhohlfasern entsteht eine sehr große Oberfläche, über die es rasch möglich ist, hochkonzentrierte CO₂-Lösungen zu generieren.

1.3.1 Der Bohr-Effekt

Eine der wichtigsten Aufgaben des Blutes ist es, die Sauerstoffversorgung der Zellen sicherzustellen. Dabei wird der Sauerstoff hauptsächlich in gebundener Form transportiert [44]. Den Transporter stellt dabei das eisenhaltige Hämoglobinmolekül dar [44]. Es ist der rote Blutfarbstoff der Erythrozyten.

Ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der Sauerstofffreisetzung im Gewebe ist der Bohr-Effekt. Er beschreibt die verminderte Sauerstoffaffinität des Hämoglobins in einer Umgebung mit einem hohen CO₂-Partialdruck und einem daraus resultierenden erniedrigten pH-Wert [44, 45].

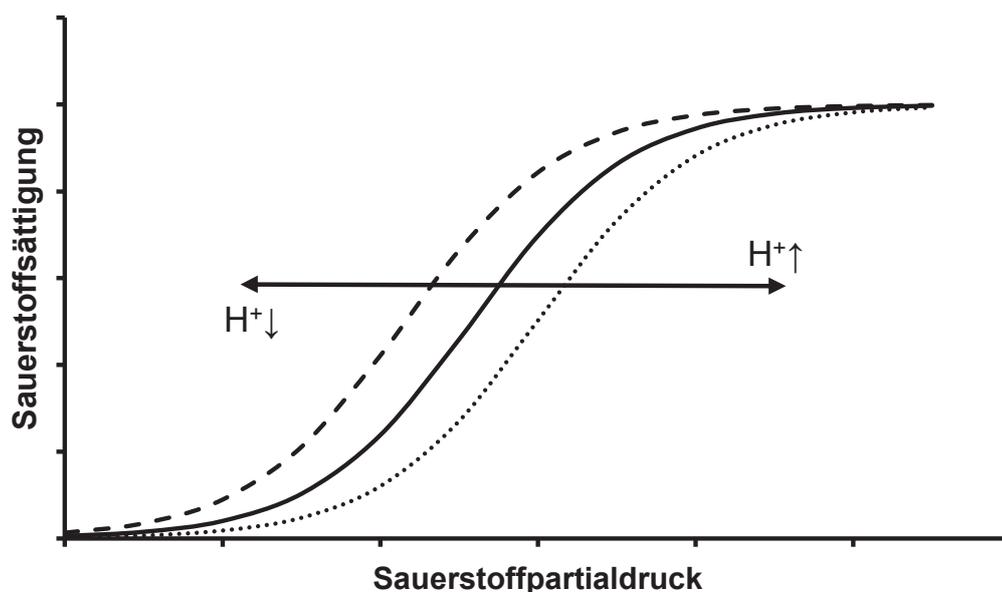
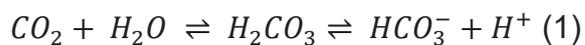


Abbildung 5 Der Bohr-Effekt

Eine Zunahme der Protonenkonzentration (H⁺) führt zu einer Rechts- (punktierte Kurve) und eine Abnahme der Protonenkonzentration zu einer Linksverschiebung (strichlierte Kurve) der Sauerstoffbindungskurve (durchgezogene Kurve).

Im Gegensatz zu wässrigen Lösungen liegt Kohlenstoffdioxid im Blut nur zu einem geringen Teil als physikalisch gelöstes CO₂ vor. Insgesamt beinhalten 1000 ml Blut 490 – 530 ml CO₂ [45]. Davon sind lediglich 5 % physikalisch im Blut gelöst. Die Ursache ist, dass Kohlenstoffdioxid in das Innere der Erythrozyten diffundiert, wo das Enzym Karboanhydrase reichlich vorliegt. Die Karboanhydrase verschiebt das Reaktionsgleichgewicht (1) nach rechts [45]. Die entstehende Kohlensäure dissoziiert daraufhin sofort in Bikarbonat und Protonen und reduziert damit den pH-Wert [45].



H⁺ Ionen binden an desoxygeniertes Hämoglobin und stabilisieren so dessen weniger sauerstoffaffine Struktur [45]. Somit führt eine hohe Protonenkonzentration zu einer Abnahme der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins und erleichtert damit die Abgabe des Sauerstoffs an umliegendes Gewebe. In der Lunge finden die Oxygenierung und Decarboxylierung des Blutes statt. Hier laufen die Prozesse des Bohr-Effektes in entgegengesetzter Reihenfolge ab, denn der Sauerstoffpartialdruck ist hier deutlich höher. Während die Atemluft in den Alveolen der Lunge einen hohen Partialdruck für Sauerstoff aufweist, ist er für Kohlenstoffdioxid gering [45]. Bei der Passage des Blutes durch die Lungenkapillaren diffundieren die Atemgase dabei entlang ihres Partialdruckgradienten in entgegengesetzter Richtung. Nach der Passage des Lungenkreislaufs weist das arterielle Blut des Körperkreislaufs einen Sauerstoffpartialdruck von 75-100 mmHg auf, während der CO₂-Partialdruck lediglich 35-45 mmHg beträgt. Über die Ventilation wird das Kohlenstoffdioxid abschließend aus dem Körper eliminiert und an die Umwelt abgegeben [45].

1.3.2 Vasodilatation

Die Vasodilatation beschreibt die Vergrößerung des Gefäßquerschnittes zur Erhöhung der nachgeschalteten Perfusion. Sie ist eine der Hauptansatzpunkte der lokalen sowie der systemischen kurzfristigen Kreislaufregulation. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten, den Vasotonus zu beeinflussen. Neben neurogenen Signalen spielen auch vasoaktive Substanzen und Hormone eine

Rolle [46]. Ein ebenso zentraler Regulator ist das Endothel der Gefäße [45, 46]. Neben der Ausschüttung und Inaktivierung von vasoaktiven Substanzen ist das Endothel insbesondere in der Lage, schubspannungsabhängig Stickstoffmonoxid (NO) freizusetzen und so eine Vasodilatation im weiteren Stromgebiet auszulösen. Endothelzellen zeigen eine kontinuierliche Aktivität der NO-Synthase. Diese Aktivität kann neben Veränderung der Schubspannung auch durch weitere physikalische sowie chemisch-metabolische Signale beeinflusst werden [47].

Kohlenstoffdioxid kann über eine H^+ -Freisetzung und damit über die verbundene Azidose im Blut über Chemosensoren regulative Effekte auf das Gefäßsystem und den Kreislauf ausüben. Vor allem in Bezug auf die vaskuläre Autoregulation des Gehirns ist der Einfluss des CO_2 -Partialdruckes gut bekannt [48]. Ein erhöhter Kohlenstoffdioxidpartialdruck führt über eine Vasodilatation zu einer Abnahme des cerebrovaskulären Widerstandes und verstärkt damit die Durchblutung des Gehirns [48]. Dieser Effekt erscheint sinnvoll, da ein erhöhter pCO_2 als Zeichen einer, relativ zum Metabolismus, zu geringen Perfusion zu sehen ist.

Während diese vasodilatatorische Eigenschaft von CO_2 ausreichend nachgewiesen ist [47, 49, 50], ist der genaue molekulare Mechanismus nicht verstanden. Es deutet jedoch vieles darauf hin, dass die endotheliale Stickstoffmonoxidproduktion eine entscheidende Rolle in der Kohlenstoffdioxid-vermittelten Vasodilatation spielt [47, 51, 52].

Unabhängig von dem genauen Wirkmechanismus zeigt sich, dass auch bei einer externen Anwendung von CO_2 , also zum Beispiel im Rahmen eines Bades, vasodilatatorische Effekte auftreten. In Bezug auf die balneologische Anwendung warmer kohlenstoffdioxidhaltiger Bäder konnte an Ratten gezeigt werden, dass die mittels Laserdopplerflowmetrie gemessene Hautdurchblutung bei einem $30\text{ }^\circ\text{C}$ warmen Bad in wässriger CO_2 -Lösung signifikant stärker ansteigt als bei einem gleichtemperierten Bad in Leitungswasser [53]. Gleichartige Effekte konnten auch bei der Anwendung am Menschen beobachtet werden (siehe Tabelle 1).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss wässriger kohlenstoffdioxidhaltiger Lösungen auf wundheilungsrelevante Parameter der Haut *in vitro* mit primären Zellkulturen der menschlichen Haut zu untersuchen. Aufbauend auf aktuell gültigen Modellen der Wundheilung *in vivo* wurden für diese Arbeit drei wundheilungsrelevante Parameter definiert. Dazu zählen die Proliferation, die Migration sowie die Differenzierung von Zellen. Aus der großen Gruppe der an der Wundheilung beteiligten Zellen wurden mit Fibroblasten, Keratinozyten und Gefäßendothelzellen die wichtigsten Zellarten für die vorliegende Untersuchung ausgewählt.

Die *in vitro* Versuche wurden dabei explizit so konzipiert, dass sie in Zeit und Umfang möglichst einer *in vivo* Behandlung ähneln. So wurden Inkubationszeiten und Inkubationsintervalle an reale Behandlungsgegebenheiten angepasst und beispielsweise auf eine dauerhafte Inkubation mit CO₂-Medium verzichtet.

Primäres Ziel dieser Studie war es, die Übertragbarkeit der beschriebenen Wirkungen aus *in vivo* Beobachtungen auf *in vitro* Bedingungen zu überprüfen. Eine genaue Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der beschriebenen Effekte sollte nicht erfolgen. Auf Basis dessen besteht dann die Möglichkeit durch weitergehende Forschung Mechanismen hinter den beobachteten Effekten zu erschließen und einen therapeutischen Nutzen zu optimieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Substanzen

Substanz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
Acrylamid	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Germany
Amphotericin B	Gibco Life Technologies; California; USA
APS	Promega Corporation; Wisconsin; USA
Aqua dest. (steril)	B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Germany
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Germany
BSA	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Germany
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega Corporation; Wisconsin; USA
Developing solution (Clarity™ Western ECL Substrate #170-5060) Luminata™ Forte Western HRP Substrate #WBLUF0100)	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Germany
Dispase II	ROCHE AG; Basel; Switzerland
DMEM (4,5 g/l Glucose)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany
DMSO	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
DPBS	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Germany
Ethanol zur Desinfektion	MERCK Millipore; Darmstadt; Germany
FACS Clean #340345	BD Bioscience; New Jersey; USA
FACS Rinse #340346	BD Bioscience; New Jersey; USA
FCS	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Germany

Substanz	Hersteller
Glycin	MERCK Millipore; Darmstadt; Germany
Hepes	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
Hoechst 33342	Pierce Biotechnology; Rockford; USA
Keratinocytenmedium, Keratinocytes SFM 1x	Gibco Life Technologies; California; USA
Kollagenase Typ I	Biochrom GmbH; Berlin; Germany
Methanol (Methanol for analysis EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur)	MERCK Millipore; Darmstadt; Germany
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylenediamine (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Germany
PBS without Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom GmbH; Berlin; Germany
Penicillin / Streptomycin	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Germany
Ponceau S	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Germany
Propidium iodide	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
Protein-Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Germany
Sodium dodecylsulfate (SDS)	VWR®; Darmstadt; Germany
Staurosporin	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
TGF-β ₁	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
TRIS PUFFERAN®, ≥ 99,3 %, Buffer Grade, Tris- (hydroxymethyl) aminomethan	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Germany
Tris-Base	MERCK Millipore; Darmstadt; Germany
Tris-HCl	MERCK Millipore; Darmstadt; Germany
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
Trypsin Neutralisierer	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany

Substanz	Hersteller
Trypsin/EDTA solutions (0,05 % / 0,02 %) in PBS, without Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom GmbH; Berlin; Germany
Trypsin/EDTA-Lösung 10x Tween 20	Biochrom GmbH; Berlin; Germany Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany

Tabelle 2 Liste der verwendeten Substanzen und Herstellerangaben

2.1.2 Kit-Systeme

System	Hersteller
<i>CellTiter-Blue</i> ® Cell Viability Assay #G8081	Promega GmbH; Mannheim; Germany
Cellworks Angiogenese Kit V2a ZHA-4000	Caltag Medsystems Ltd.; Buckingham; UK
Pierce™ BCA Protein Assay Kit #23225	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany

Tabelle 3 Liste der verwendeten Kit-Systeme und Herstellerangaben

2.1.3 Puffer & Lösungen

4x Trenngelpuffer

91 g Tris (pH 8,8)

2 g SDS

ad 500 ml H₂O

Laufpuffer

30,3 g Tris (pH 8,3 - 8,8)

144,2 g Glycin

10 g SDS

ad 1000 ml H₂O

4x Sammelgelpuffer

6,05 g Tris (pH 6,8)

0,4 g SDS

ad 100 ml H₂O

4x Laemmli-Puffer

2,5 ml 1 M Tris HCl (pH 6,8)

4 ml Glycerol

0,8 g SDS

eine Spatelspitze Bromphenolblau

ad 10 ml H₂O

Vor Gebrauch: 20 % Mercaptoethanol

25x Transferpuffer

18,2 g Tris-Base
90 g Glycin
ad 500 ml H₂O

Blotting-Puffer

40 ml 25x Transferpuffer
50 ml Methanol
ad 500 ml H₂O

10x TBS

12,1 g Tris (pH 7,5)
87,7 g NaCl
ad 1000 ml H₂O

TBS-T

10x TBS
0,1 % Tween 20

2.1.4 Elektrophoresegele

1x Trenngel 12 %

3 ml Acrylamid 30 %
2,625 ml H₂O
1,875 ml 4x Trenngelpuffer
10 µl TEMED
25 µl APS 10 %

1x Sammelgel

650 µl Acrylamid 30 %
3 ml H₂O
1,25 ml 4x Trenngelpuffer
10 µl TEMED
25 µl APS 10 %

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock Tubes)	Eppendorf AG; Hamburg; Germany
1,5 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock Tubes)	Eppendorf AG; Hamburg; Germany
2,0 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock Tubes)	Eppendorf AG; Hamburg; Germany
Einweghandschuhe	Ansell GmbH; München; Germany
Einwegskalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd.; Osaka; Japan
FACS Reaktionsgefäße (FALCON® 5 ml)	BD Bioscience; New Jersey; USA

Material	Hersteller
FACS-Röhrchen	BD Bioscience; New Jersey; USA
Falcons, 15 ml bio-one	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Austria
Falcons, 50 ml bio-one	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Austria
Glasplatten (0,75 mm) mit Spacer	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Kalifornien; USA
Kryogefäß (Cryo.s 2,0 ml)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Austria
Nitrocellulose Membran Porengröße 0,2 µm	Biotechnologie GmbH; Erlangen; Germany
Objektträger ca. 76 x 26 mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH; Kassel; Germany
Pasteurpipetten aus Glas ISO 7712	BRAND GmbH + CO KG; Wertheim; Germany
Petrischale, CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH;
H 145 mm × 20 mm, vented	Kremsmünster; Austria
Petrischalen CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH;
H 100 mm × 20 mm, vented	Kremsmünster; Austria
Pipettenspitzen 10µl, 200 µl, 1000 µl	USA Scientific, Inc.; Florida; USA
QIASHredder	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Sieb 100 µm	VWR International GmbH; Darmstadt; Germany
Spritzen	B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Germany
Sterile Pinzette	KLS Martin Group; Tuttlingen; Germany
Stripetten 10 ml (Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
Stripetten 25 ml (Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany

Material	Hersteller
Stripetten 5 ml (Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
Whatman Filter Papier	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Germany
Zellkulturflasche T175, CELLSTAR® Cell Culture Flasks 175 cm ² red filter cap	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Austria
Zellkulturflasche T75, CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Austria
Zellkulturplatten 24-well, CELLSTAR® Tissue Culture Plates	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Austria
Zellkulturplatten 96-well, CELLSTAR® Tissue Culture Plates	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Austria
Zellschaber, (blau 40 cm)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Austria
Zellsieb 70 µm	BD Bioscience; New Jersey; USA

Tabelle 4 Liste der verwendeten Materialien mit Herstellerangaben

2.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Abzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG; Wangen; Germany
Blotting-Apparat	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany
Carbothera™ K104	Mitsubishi Chemical Cleansui Corporation; Osaki; Japan
Durchflusszytometer, FACS Calibur	BD Bioscience; New Jersey; USA

Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Germany
Gefrierschrank -80 °C, Revco Ultima	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Germany
Gelgießapparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Germany
Heizbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany
Heizblock	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany
Kryo-Einfriergefäß	Schmidt Laborgeräte GJM Handel und Service GmbH; Wien; Austria
Kühlschrank	Nalge Nunc International; Rochester (NY); USA
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG; Staufen; Germany
Mikroskop Zeiss Axiovert 40	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Germany
Multiplattenlesegerät VICTOR™ V	Perkin Elmer; Waltham; USA
Nanodrop Spektrophotometer, ND-1000	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany
Neubauer Zählkammer	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Germany
pH-Meter; HI 2211 Basic pH/ORP	HANNA instruments® GmbH; Vöhringen; Germany
Pipettboy accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Germany
Pipette 0,5 - 10 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Germany
Pipette 10 - 100 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Germany
Pipette 10 - 200 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Germany
Pipette 100 - 1000 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Germany

Gerät	Hersteller
Saugpumpe	KNF Neuberger GmbH; Freiburg; Germany
Sonifiziergerät	Hielscher Ultrasonics GmbH; Berlin; Germany
Sterilwerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany
Taumelrollenmischer	Labortechnik Fröbel GmbH; Lindau; Germany
Vortexer Art. No 444-1372	VWR International GmbH; Darmstadt; Germany
Waage (Kern 440; ABJ-N)	Kern & Sohn GmbH; Balingen; Germany
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany
Zentrifuge (groß) Heraeus Megafuge	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany
Zentrifuge (klein) Heraeus Pico	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Germany

Tabelle 5 Liste der verwendeten Geräte mit Herstellerangaben

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Primärantikörper			
Anti-GAPDH	Maus	Novus Biologicals; Colorado; USA	1:10.000
Anti- α -sma	Maus	abcam; Cambridge; UK	1:200
Sekundärantikörper			
Anti-Maus	Ziege	Dako; Glostrup; Denmark	1:1.000
Anti-Westernmarker		Carl Roth; Karlsruhe; Germany	1:4.000

Tabelle 6 Antikörper

2.1.8 Software

Anwendung	Software
Datenverarbeitung	Microsoft Office Excel 2016
Durchflusszytometrie	BD CellQuest Pro
Erstellung mikroskopischer Bilder	Axiovision Rel. 4.8
Literaturverwaltung	EndNote X8
Spaltmessung im Zelllayer	ImageJ Plugin: MRI_wound_healing_tool
Statistik und Diagramme	GraphPad Prism v6.01
Textverarbeitung	Microsoft Office Word 2016
Westernblot-Analyse	ImageLab

Tabelle 7 Liste der verwendeten Software

2.2 Zellkultur

Die humanen Zellen wurden während der gesamten Zeit in Kultur gehalten. Dabei handelte es sich um primäre Keratinozyten und Fibroblasten sowie um den Endothelzellstamm EA.hy926 (ATCC® CRL2922™). Fibroblasten und

Keratinocyten wurden aus Spendergewebe isoliert. EA.hy926 ist ein humaner somatischer Hybrid mit der Morphologie von Endothelzellen und wurde käuflich erworben. Er ist gut dazu geeignet, alle Eigenschaften von differenzierten endothelialen Zellen wie Angiogenese, Hämostase, Blutdruckregulation und Inflammation zu untersuchen [54].

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1 Spender

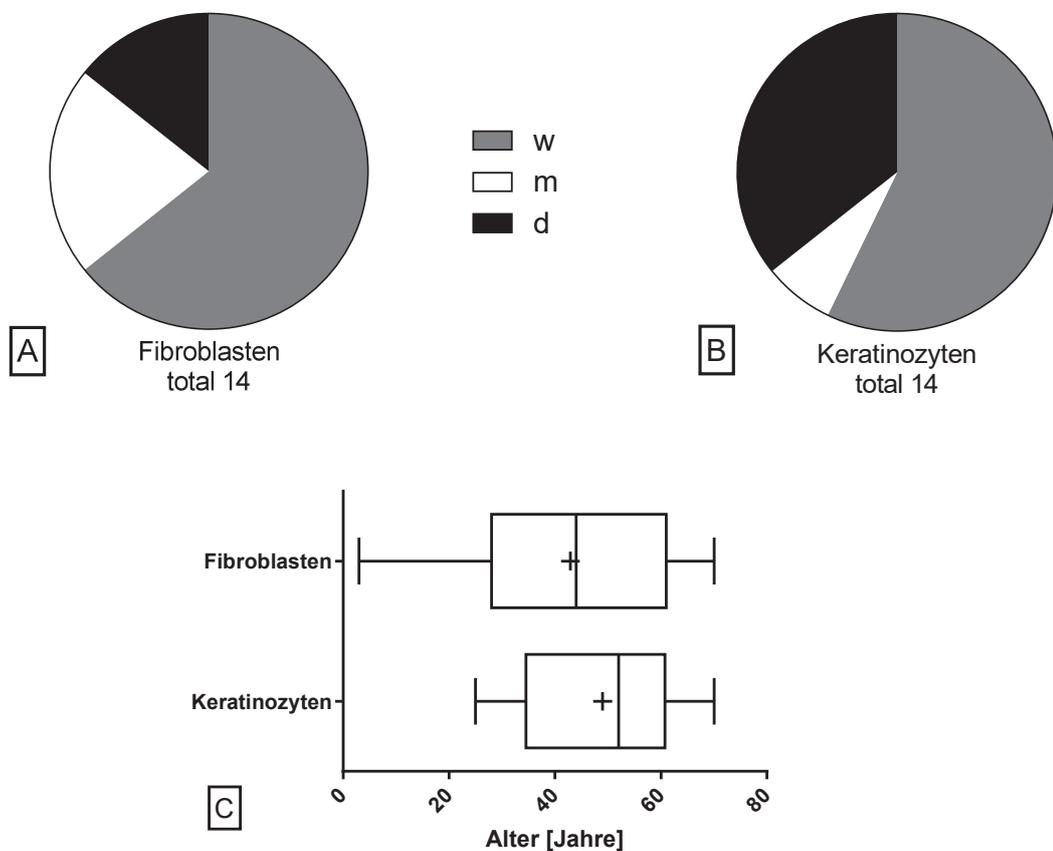


Abbildung 6 Geschlechts- und Altersverteilung der Hautdonoren

Geschlechterverteilung der **A** Fibroblastenspender und **B** Keratinozytenspender [w] weiblich, [m] männlich, [d] unbekannt **A** w = 9, m = 3, d = 2 **B** w = 8, m = 1, d = 5 **C** Altersverteilung von Fibroblasten- und Keratinozytenspendern, dargestellt sind Minimal- und Maximalwerte, unteres und oberes Quartil sowie Median und Mittelwert (+)

Keratinozyten und Fibroblasten wurden aus Resektionsmaterial von Abdominoplastiken gewonnen. Fibroblasten wurden zusätzlich aus Zirkumzisionsmaterial isoliert.

Von einzelnen Spendern wurden teilweise entweder nur die Fibroblasten oder nur die Keratinozyten kultiviert und für die Experimente verwendet. In anderen Fällen wurden sowohl Fibroblasten- als auch Keratinozytenkulturen angelegt und für die Untersuchung genutzt.

Die Spender der verwendeten Fibroblasten waren zwischen 3 und 70 Jahre alt (arithmetisches Mittel 43 Jahre, Median 44 Jahre, 4 Personen unbekanntes Alters). Unter den insgesamt 14 Spendern waren 9 Frauen, 3 Männer und 2 Personen unbekanntes Geschlechts.

Die verwendeten Keratinozytenkulturen entstammten von Spendern die minimal 25 Jahre und maximal 70 Jahre alt waren (arithmetisches Mittel 49 Jahre, Median 52 Jahre, 6 Personen unbekanntes Alters). Unter ihnen waren 8 Frauen, 1 Mann und 5 Personen unbekanntes Geschlechts.

Alle Spender hatten präoperativ der wissenschaftlichen Verwendung ihres resezierten Gewebes zugestimmt. Das zustimmende Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur *„Etablierung einer nicht personenbezogenen Sammlung von Körpergeweben zur Erstellung einer Gewebe- und Zellbank für die Erforschung von zellbiologischen und molekularen Aspekten der Wundheilung sowie der grundlegenden Mechanismen bei der Komposition künstlicher Gewebe (Tissue Engineering)“* trägt die Nummer 3634.

2.2.2 Zellkulturmedien

Die Fibroblasten und Endothelzellen wurden in DMEM unter Zusatz von 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Keratinozyten erhielten als Standardmedium ein serumfreies Medium der Firma Gibco (Keratinocytes-SFM), inklusive der entsprechenden Zusätze 2,5 µg/500 ml *epidermal growth factor* (EGF) sowie 25 mg /500 ml bovines Hypophysenextrakt. Außerdem wurde noch 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugefügt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die CO₂-Medien für kurzzeitige Behandlungen im Rahmen der Experimente an Fibroblastenkulturen und Endothelzellen waren serumfrei. Im Falle der Keratinozyten wurde PBS ohne Calcium mit Kohlenstoffdioxid angereichert und als CO₂-Medium für die Experimente genutzt. Um Kontaminationen zu

vermeiden, enthielten alle CO₂-Medien 2 % Penicillin/Streptomycin sowie 1 % Amphotericin B.

Nachdem die Zellen Kontakt zu CO₂-Medien hatten, wurden sie in Versuchsmedium weiterkultiviert. Im Vergleich zu dem Standardkulturmedium enthielt das Versuchsmedium mit 2 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Amphotericin B wie das CO₂-Medium höhere Konzentrationen antimikrobieller Substanzen.

Für Differenzierungsuntersuchungen an Fibroblasten kam entsprechendes Differenzierungsmedium zum Einsatz. Dabei wurde dem Versuchsmedium für Fibroblasten 5 ng /ml TGF-β₁ zugesetzt.

	Fibroblasten	EA.hy 269	Keratinozyten
Kulturmedium	DMEM + 10 % FCS + 1 % P/S	DMEM + 10 % FCS + 1 % P/S	Keratinocytes- SFM 1x + 1 % P/S
CO ₂ -Medium	DMEM + 2 % P/S + 1 % AMB + CO ₂	DMEM + 2 % P/S + 1 % AMB + CO ₂	PBS + 2 % P/S + 1 % AMB + CO ₂
Versuchsmedium	DMEM + 10 % FCS + 2 % P/S + 1 % AMB	DMEM + 10 % FCS + 2 % P/S + 1 % AMB	Keratinocytes SFM 1x + 2 % P/S + 1 % AMB
Differenzierungs- medium	DMEM + 10 % FCS + 2 % P/S + 1 % AMB + 5 ng /ml TGF-β ₁		

Tabelle 8 Zellkulturmedienansätze für verschiedene Zellen und Versuche

DMEM *Dulbecco Modified Eagle Medium*, FCS fetales Kälberserum, P/S Penicillin/Streptomycin, AMB Amphotericin B, TGF-β₁ *tissue growth factor* β₁, SFM Serumfreies Medium

2.2.3 Austausch des Mediums

Alle drei bis vier Tage erhielten die Zellen in Kultur neues Medium. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, verworfen und durch frisches Medium ersetzt. Der Mediumansatz wurde im Kühlschrank gelagert, lediglich das CO₂-Medium wurde vor jeder Verwendung frisch angesetzt. Die Standardmedien wurden vor Zellkontakt auf 37 °C erwärmt und in 5 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank äquilibriert.

2.2.4 Passagieren von Zellen

Bei nahezu vollständiger Konfluenz des Zellrasens in den Zellkulturgefäßen wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde Trypsin 10x 1:10 in PBS verdünnt, auf die Zellen gegeben und diese für 5 min im Brutschrank inkubiert, was auch als „Trypsinierung“ bezeichnet wird. Daraufhin wurde das Trypsin im Falle der Fibroblasten und Endothelzellen mittels Zellkulturmedium gestoppt. Der im Medium enthaltene Proteinanteil inhibiert die Trypsinaktivität gegenüber den Zellen kompetitiv. Für die Keratinozyten wurde zu diesem Zweck *trypsin neutralizer* verwendet.

Die Zellen wurden im Anschluss in ein Falcon Röhrchen überführt und bei 300 xg für 5 min abzentrifugiert. Jetzt konnte das in frischem Zellkulturmedium resuspendierte Pellet wieder auf eine je nach Größe des Pellets variierende Zahl neuer Kulturgefäße ausplattiert werden. Beachtet werden sollte, dass vor allem Keratinozyten nicht zu dünn ausgesät werden und nach der Passage nicht zu viel bewegt werden, um ein adhärentes Wachstum nicht zu gefährden.

Alle Versuche wurden mit Zellen in Passage zwei bis Passage fünf (p2 - p5) durchgeführt. Dabei entspricht eine „Trypsinierung“ einer Passage. Das bedeutet frisch isolierte und ausgesäte Zellkulturen befanden sich in Passage null (p0), während Zellen in Passage fünf (p5) bereits fünf Mal trypsinisiert und erneut ausplattiert wurden.

2.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Aktuell nicht verwendete Zellbestände wurden kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin 10x 1:10 in PBS vom Kulturgefäß gelöst und nachdem das Trypsin gestoppt wurde abzentrifugiert, um ein Zellpellet zu erhalten. Das Zellpellet wurde mit Einfriermedium aus FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutz resuspendiert. Die Suspension wurde auf 1×10^6 Zellen pro Milliliter verdünnt und jeweils ein Milliliter des so entstandenen Gemischs in ein Kryoröhrchen überführt. DMSO diente dabei als Gefrierschutzmittel, da es die intrazelluläre Bildung von zellschädigenden Eiskristallen verhindern kann. Daraufhin wurden die Röhrchen zügig in einer Kryobox bei -80 °C eingefroren, um Zellschäden durch DMSO selbst zu vermeiden.

2.2.6 Auftauen von Zellen

Bevor die Zellen aufgetaut wurden, erfolgte die Vorbereitung der entsprechenden Zellkulturgefäße durch Vorlage von ausreichend Medium. Dann wurden die Kryoröhrchen angetaut und kurz vor dem vollständigen Auftauen in das Kulturgefäß überführt, um die Zelltoxizität durch DMSO möglichst gering zu halten. Nach 24 h wurde bei Adhärenz der Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt, um das DMSO aus der Kultur zu entfernen.

2.3 Isolation von Zellen aus der humanen Cutis

Das Ziel war es, humane primäre Zellen aus der Haut von Spendern zu isolieren. Dabei wurden Keratinozyten aus der Epidermis und Fibroblasten aus der Dermis gewonnen. Ausgangsmaterial der Präparation waren Operationsresektate die zumeist aus Abdominalplastiken entstammten, welche bei hauptsächlich weiblichen Patienten durchgeführt wurden. Das Material wurde steril verpackt aus dem Operationssaal ins Labor transportiert und hier ebenfalls steril behandelt. Es lag Vollhaut mit reichlich subkutanem Fettgewebe vor. Im ersten Schritt wurde das subkutane Fettgewebe sorgfältig abpräpariert. Dabei wurden gleichzeitig größere Blutanhaftungen entfernt. Im Anschluss wurde die Cutis in ungefähr 0,5 - 1 cm große Stücke geschnitten und in ein 50 ml Falcon überführt.

Das Gewebe wurde dann mit Dispase II-Lösung bedeckt und über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Für 10 ml Dispase II-Lösung wurden 0,01 g Dispase II und 5 ml fünfprozentige Hepes-Puffer-Lösung in 9,5 ml PBS gelöst.

Am nächsten Tag wurde kontrolliert, ob sich die Epidermis bereits von der Dermis gelöst hat und dann das Falcon für mindestens 15 min in einem 37 °C warmen Schüttelwasserbad inkubiert. Daraufhin wurde das Gewebe in eine 100 x 20 mm Petrischale gegeben und kaltes PBS dazugegeben. Nun konnte mithilfe zweier Pinzetten die Dermis von der Epidermis getrennt werden und in jeweils verschiedene Falconröhrchen gegeben werden.

Die Epidermis wurde nun mit Trypsin 10x 1:3 in PBS bedeckt und das Falcon Röhrchen für höchstens 10 Minuten bei 37 °C ins Schüttelwasserbad gestellt. Anschließend wurde es kurz gevortext und die Epidermis auf ein 100 µm Sieb gegeben. Das Filtrat wurde bei 300 xg für 5 min zentrifugiert und anschließend das Pellet im entsprechenden Zellkulturmedium auf 100 mm Petrischalen ausplattiert.

Zu der Dermis wurde 0,2-prozentige Kollagenase I Lösung in DPBS mit 1,5 % BSA gegeben und das entsprechende Falcon Röhrchen für eine Stunde ins 37 °C warme Schüttelwasserbad gestellt. Jetzt wurde auch die Dermis auf ein 100 µm Sieb gegeben und das Filtrat bei 300 xg für 5 min zentrifugiert, sodass das resultierende Pellet im Zellkulturmedium resuspendiert und auf Petrischalen ausplattiert werden konnte.

Bei Adhärenz der Zellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.4 Bestimmung der Zellzahl/ Zellvitalität

2.4.1 Neubauer-Zählkammer

Die Anzahl von Zellen in einer Suspension wurde quantitativ mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurde diese zuerst mit Ethanol gereinigt und ein Deckgläschen so auf die Stege des Kammerbereichs gelegt, dass Newton'sche Ringe erschienen sind. Dann wurden etwa 5 µl der Zellsuspension

in die Kammer pipettiert, bis diese gefüllt war. Im Anschluss wurden 4x4 Quadrate gezählt und über die Formel

$$x * 10^4 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \quad (2)$$

die Gesamtzahl der Zellen in der Suspension berechnet.

2.4.2 CellTiterBlue-Assay

Der *CellTiterBlue*-Vitalitätstest von Promega dient der fluorometrischen Bestimmung der Zellvitalität und damit indirekt der Zellzahl. Der Farbstoff Resazurin wird dabei in der Atmungskette vitaler Zellen durch Reduktion in das fluoreszierende Resorufin umgewandelt. Anschließend kann bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm das fluorometrische Signal mittels eines Plattenlesegeräts ausgewertet werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt. Darauf folgend wurden die in der Regel in 24-well Platten kultivierten Versuchszellen mit 500 µl des *CellTiterBlue* Ansatzes aus der *CellTiterBlue* Stocklösung 1:20 in Zellkulturmedium für 1 h im Brutschrank inkubiert. Es wurde ein zellfreies *blanc* angelegt. Nach verstreichen der Inkubationszeit wurden jeweils 100 µl Aliquote aus den Zellcontainern in Doppelbestimmung in eine 96-well Platte pipettiert und im Plattenphotometer gemessen. Aus den Messwerten der Doppelbestimmung wurde ein Mittelwert gebildet und der Wert des *blanc* subtrahiert.

2.4.3 DNA-Bestimmung

Zur DNA-Bestimmung wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit kochendem Wasser lysiert. Das Zelllysate wurde dann in eine QIAshredder-Säule gegeben und anschließend für 2 min bei 1500 xg zentrifugiert. Nach Abkühlung des Lysats konnte ein 2 µl Aliquot der Probe auf das Photometer (*NanoDrop1000*) gegeben und damit der DNA-Gehalt gemessen werden.

2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzfärbung der Zellen wurde mittels der Farbstoffe Propidiumiodid und Bisbenzimid (Hoechst 33342) durchgeführt.

Der rote Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid passiert die Zellmembran abgestorbener Zellen und interkaliert mit der DNA [55]. Vitale Zellen können durch Propidiumiodid nicht angefärbt werden. Propidiumiodid hat, während es in DNA interkaliert ist, ein Absorptionsmaximum bei 535 nm und ein Emissionsmaximum bei 617 nm.

Hoechst 33342 ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 350 nm und ein Emissionsmaximum bei 461 nm. Er färbt das Chromatin der Zellen an [56, 57].

Zur Anfärbung der kultivierten Zellen wurden diese zuerst mit PBS gewaschen. Die Färbelösung wurde aus Hoechst 33342 1:1000 und Propidiumiodid 1:50 in PBS hergestellt und davon 300 μ l/well zu den Zellen gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation im Dunkeln konnte die Färbelösung wieder abgenommen werden und den Zellen PBS zugegeben werden, um diese dann zu mikroskopieren.

2.6 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate

Im Rahmen der Apoptose kommt es physiologischerweise zu einer Degradation der nukleären DNA durch Caspase-aktivierte Prozesse innerhalb der Zelle. Diese DNA-Fragmentierung wird aufgrund ihrer typischen Morphologie bei der Gelelektrophorese als *laddering* bezeichnet. Sie kann mittels Propidiumiodidfärbung und Fluoreszenzdurchflusszytometrie nach Nicoletti et al. als Marker für die Apoptoserate herangezogen werden [55, 58].

Für den Zellkulturansatz für die Bestimmung der Apoptoserate nach drei und 24 Stunden wurden 5-10 $\times 10^4$ Zellen/well in jeweils eine 24-well Platte ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank waren die Zellen ausreichend adhärent. Daraufhin wurden die Zellen für 0, 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten mit CO₂ behandelt und eine positiv-Kontrolle durch Zugabe von Staurosporin angelegt. Staurosporin ist ein potenter Induktor verschiedener Caspasen und

eignet sich daher gut, eine Apoptose in Zellen schnell zu induzieren [59]. Dazu kam Staurosporin 25 μM 1:100 als Mediumzusatz zum Einsatz.

Zu den entsprechenden Zeitpunkten drei beziehungsweise 24 Stunden nach CO_2 -Behandlung wurden die Zellkulturplatten aus dem Brutschrank entnommen und für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet.

Zur FACS Analyse wurden die in einer 24-well Platte adhärent wachsenden Zellen zuerst mit 200 μl Trypsin 10x 1:10 in PBS für 5 min bei 37 °C im Brutschrank trypsiniert. Darauf folgend wurde 300 μl FCS-haltiges Zellkulturmedium hinzugegeben, um die Proteaseaktivität gegenüber den Zellen zu stoppen. Die Zellsuspension wurde nun in ein FACS-Röhrchen gegeben und 4 min bei 300 xg abzentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 0,5 ml PBS resuspendiert. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurde 4,5 ml -20 °C kaltes 70-prozentiges Ethanol hinzugegeben und die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt. Nach Abnahme des Überstandes, wurden die Zellen in 0,3 ml Propidiumiodid 10 $\mu\text{g/ml}$ 1:100 in PBS resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Propidiumiodid kann aufgrund der Permeabilisation durch Ethanol die Zellmembran passieren und dann intrazellulär mit der nukleären DNA vormals vitaler Zellen sowie den DNA-Fragmenten der apoptotischen Zellen interkalieren. Die so fluoreszenzmarkierten Zellen können mittels Durchflusszytometrie detektiert werden [58]. Dabei ergeben sich nun unterschiedliche Fluoreszenzsignale. Während starke Signale bei Zellen mit normaler diploider DNA zu beobachten sind, nimmt die Intensität bei den hypodiploiden, apoptotischen Zellen ab [55]. So ergibt sich ein breites Fluoreszenzmuster verschiedenartiger hypodiploider Zellen neben dem scharf abgrenzbaren Peak der diploiden Zellen.

2.7 Western-Blot zur Bestimmung der Zelldifferenzierung

Der Grad der Zelldifferenzierung von Fibroblasten wurde anhand des Differenzierungsmarkers *α -smooth-muscle-actin* mittels *Western Blotting* bestimmt. Dabei wurde die Menge an gemessenem α -sma ins Verhältnis zur Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gesetzt. GAPDH ist ein

Enzym der Glykolyse und ein *housekeeping*-Gen, da es unabhängig von äußeren Einflüssen in Zellen exprimiert wird. Dies bedeutet, dass es konstant in allen Zellen vorzufinden ist und damit gut zur Normierung von gemessenen Daten herangezogen werden kann.

Zellen aus den Versuchen zur Zelldifferenzierung nach CO₂-Behandlung wurden nach Versuchsende bis zur Analyse mittels Western-Blot als Zellpellet in 20 µl Ripa-Puffer bei -20 °C gelagert.

2.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinmenge einer Probe in Ripa-Puffer wurden die Zellen zuerst mittels zehn Ultraschallstößen sonifiziert und im Anschluss auf Eis gelagert. Nun wurde ein 4 µl Aliquot der Probe in 20 µl PBS verdünnt und je 10 µl davon in Doppelbestimmung auf eine 96-well Platte gegeben. Außerdem wurde eine BSA Verdünnungsreihe als Standard in Doppelbestimmung pipettiert. Für den Ansatz der Verdünnungsreihe wurde eine BSA Stocklösung mit 2 mg/ml BSA verwendet und entsprechend verdünnt (siehe Tabelle 9).

Konzentration (µg/µl)	# Probe	BSA-Standard (µl)	PBS (µl)
2	A	300	0
1,5	B	375	125
1	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 (= <i>blanc</i>)	I	0	400

Tabelle 9 Herstellung des BSA Standards zur quantitativen Proteinbestimmung

Um die absolute Proteinmenge der Probe nun in Bezug auf den bekannten Standard zu messen, wurde das *Pierce*TM *BCA Protein Assay Kit* verwendet und

nach Herstellerangaben angesetzt. Von diesem Reagenz wurden dann je 200 μl pro well (Probe und Standard) hinzugegeben. Die 96-well Platte wurde unter leichtem Schütteln für 30 min bei 37 °C inkubiert, um dann die Farbreaktion bei einer Absorption von 540 nm im Plattenphotometer zu messen.

Pierce™ BCA Protein Assay Kit enthält unter anderem Cu^{2+} , welches durch den Proteinanteil in der Probe beziehungsweise im Standard zu Cu^{1+} reduziert wird. Daraus ergibt sich eine Farbreaktion, die durch Bindung von Cu^{1+} an Bicinchoninsäure (BCA) intensiviert wird [60].

Anhand des definierten Standards konnte, unter Berücksichtigung der Verdünnung, die Proteinmenge in der jeweiligen Probe in Mikrogramm pro Mikroliter ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) berechnet werden.

2.7.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der einzelnen Proteine erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurden im Falle von α -sma einen Millimeter dicke 12-prozentige Acrylamidgele verwendet. Der Ansatz für das Trenngel wurde in die zuvor aufgebaute und gereinigte Gelgießapparatur gefüllt und mit 70 % Ethanol überschichtet. Nach 30 min konnte das Ethanol ausgegossen werden und durch den Sammelgelansatz ersetzt werden. Nach Einsetzen des Kamms (15 Taschen) härtete das Sammelgel für weitere 30 min aus.

Ziel der Gelelektrophorese war es, für jede Probe 10 μg Protein aufzutrennen. Dazu wurde die durch die Proteinbestimmung ermittelte entsprechende Menge der Probe in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und dieses mit *Aqua dest.* auf 8 μl aufgefüllt. Anschließend wurde 4 μl Laemmli-Puffer hinzugefügt, die Probe 2 min bei 1500 xg zentrifugiert und dann kurz bei 95 °C aufgeköcht.

Daraufhin wurden die Gele in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gespannt. Beim Befüllen der Geltaschen wurde in die erste Tasche des Gels der Western-Marker gefüllt. Im Anschluss wurden 12 μl der vorbereiteten Proben in die jeweils folgenden Geltaschen pipettiert.

Nun konnte die Gelelektrophorese im ersten Schritt für circa 30 min bei 60 V gestartet werden, bis sich die Proteine im Sammelgel gesammelt hatten. Dann wurde die Laufspannung auf 120-160 V erhöht und so lange laufen gelassen, bis der Proteinschleier gerade begann, das Gel wieder zu verlassen.

2.7.3 Blotting

Beim Blotting wurden die im vorherigen Schritt nach Größe aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurde eine Spannung angelegt, der die Proteine dann folgten und so transferiert wurden.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel zwischen den Glasplatten herausgenommen und kurz in Blottingpuffer äquilibriert. Ebenfalls wurde das *Whatman*-Papier sowie die Nitrocellulosemembran mittels Blottingpuffer befeuchtet.

Im Anschluss konnte der Transferaufbau, bei der Anode beginnend, durchgeführt werden. Auf die Anode folgte ein *Whatman*-Papier, die Nitrocellulosemembran, das Gel, ein weiteres *Whatman*-Papier sowie zum Abschluss die Kathode. Dabei war zu beachten, dass der Aufbau frei von Luftblasen ist. Bei einer angelegten Spannung von 25 V und einer Stromstärke von 2,5 A betrug die Transferzeit 25 min.

2.7.4 Ponceau-S-Färbung

Nach dem Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde der Erfolg dieser Maßnahme mittels Ponceau-S-Färbung überprüft. Ponceau-S bindet reversibel an Proteine und färbt sie rötlich an, sodass im Erfolgsfall nach dem vorangegangenen Schritt ein Bandenmuster auf der Nitrocellulosemembran erscheinen sollte. Die Färbung lässt sich im Anschluss leicht wieder abspülen.

Für den Färbevorgang wurde die Membran für 2-3 min in Ponceau-S-Lösung getaucht und kurz mit Wasser abgespült. Nach erfolgreicher Identifikation eines Bandenmusters und damit der Bestätigung des Transfererfolges konnte die Membran wieder mit Wasser und anschließend mit TBS-T entfärbt werden.

2.7.5 Antikörpermarkierung

Die Antikörpermarkierung wurde genutzt, um die zu untersuchenden Proteine GAPDH und α -sma gezielt zu markieren. Im Anschluss an die Markierung konnte dann eine quantitative Auswertung erfolgen.

Zur Immunmarkierung der transferierten Proteine auf der Membran wurde diese zuerst für 1 h bei Raumtemperatur mittel TBS-T + 5 % BSA geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die beiden verwendeten Primärantikörper stammten von der Maus und sind gegen GAPDH und α -sma gerichtet. Diese wurden zusammen in der Blockierungslösung für 24 h bei 4 °C auf die Membran gegeben. Die Membranen wurden daraufhin dreimal für 5 min in TBS+T auf dem Taumelrollenmischer gewaschen. Dann wurden der Anti-Maus-Zweitantikörper und der Anti-Westernmarker-Antikörper für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Membranen wieder, wie bereits nach der Inkubation mit dem Primärantikörper beschrieben, mit TBS+T gewaschen und bis zur Analyse in TBS gelagert.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach der Hinzugabe von Entwicklerlösung mittels *Geldoc* von *Biorad*. Die quantitative Auswertung der α -sma- sowie GAPDH-Banden erfolgte im Anschluss mittels densitometrischer Messung durch *ImageLab V 4.0*.

2.8 Angiogenese-Assay

Zur Untersuchung des Einflusses einer CO₂-Behandlung von Endothelzellen auf die Angiogenese wurde das *Angiogenese-Kit V2a* der Firma *Cellworks* benutzt. Dabei werden humane Endothelzellen in Co-Kultur mit weiteren mitgelieferten humanen Zellen in einem speziellen Zellkulturmedium kultiviert. Die Endothelzellen beginnen innerhalb von zwei Wochen tubuläre Strukturen zu bilden und den von-Willebrand-Faktor sowie PECAM1 und ICAM-2 zu exprimieren. Außerdem entsteht eine Typ IV-Kollagen Matrix. PECAM1 (CD31) dient der vaskulären Barrierefunktion und wurde hier als etabliertes Ziel der immunhistochemischen Markierung zum Nachweis der Angiogenese gewählt. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurde eine positiv-Kontrolle mittels VEGF Zugabe, sowie eine negativ-Kontrolle mittels Suramin angelegt. Somit ließen sich positive als auch negative Effekte einer CO₂-Behandlung auf die Angiogenese untersuchen.

Der Assay wurde nach den Instruktionen der Firma *Cellworks* durchgeführt. Dabei wurden die Zellen zusätzlich alle 48 h für 15 min mit

kohlenstoffdioxidhaltigen Medien behandelt. Zur Auswertung wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt und mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dabei wurde im Anschluss die Sättigung und der Kontrast soweit verändert, dass lediglich die immunhistochemische Färbung sichtbar war. Im Anschluss wurde das Ausmaß der Ausbildung tubulärer Strukturen qualitativ anhand einer Ordinalskala (wenig - - | - | + | ++ viel) bestimmt.

2.9 pH-Messung

Die pH-Messungen erfolgten bei Raumtemperatur der Lösungen und unter leichtem Rühren.

2.10 Carbothera™ K104

Carbothera™ K104 ist ein Gerät der Firma Mitsubishi Rayon Cleansui Co., Ltd. zur Herstellung von hoch angereichertem kohlenstoffdioxidhaltigem Leitungswasser. Kernstück des Gerätes ist das Hohlfasermodule. Es besteht aus dicht gepackten semipermeablen Hohlfasern, welche von der anzureichernden Flüssigkeit durchströmt werden. Von außen werden die Hohlfasern von Kohlenstoffdioxid aus einer Gasdruckflasche umgeben.

Zur Funktion benötigt Carbothera™ K104 einen Stromanschluss. Außerdem muss eine Kohlenstoffdioxidgasflasche über den entsprechenden Anschluss mit einer Gaszuleitung verbunden werden.

Nach dem Einschalten wurde die Flüssigkeit über eine Ansaugöffnung aufgenommen, an die zuvor ein Schlauch angeschlossen wurde. In Carbothera™ K104 wurde die Flüssigkeit daraufhin durch das gaslösende Membranmodul geleitet. Das Kohlenstoffdioxid konnte nun in die Flüssigkeit übertreten. Nach Austritt aus dem Modul wurde das angereicherte Medium aus der Ausflussöffnung über einen Schlauch in einen Behälter zurückgeleitet.

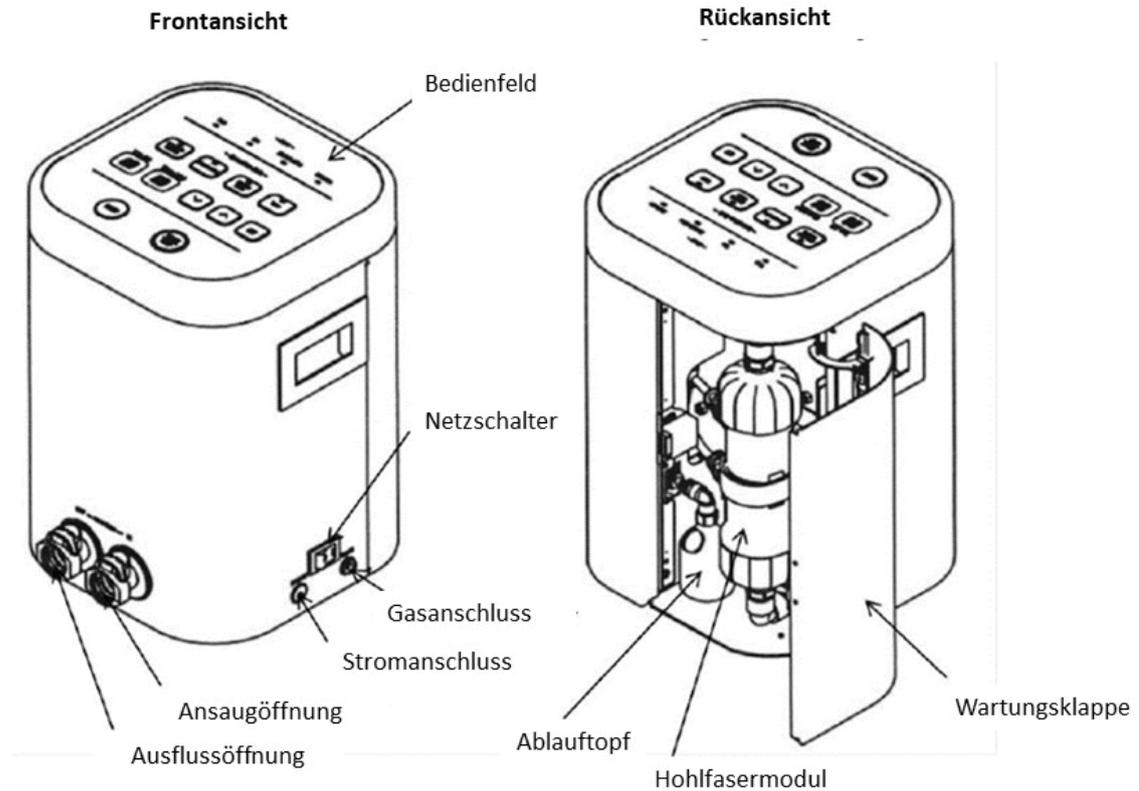


Abbildung 7 Schematische Darstellung von Carbothera™ K104

Carbothera™ K104 ist ein Gerät für die Generierung hochkonzentrierter kohlenstoffdioxidhaltiger Lösungen. Es besitzt eine zu- und eine abführende Buchse. Außerdem besteht ein Anschluss für eine Kohlenstoffdioxid-Druckgasflasche. Eine Flüssigkeit wird durch ein Modul geleitet, welches aus semipermeablen Hohlfasern besteht, die von CO₂ umströmt werden. Während des Flusses der Flüssigkeit durch die semipermeablen Hohlfasern, wird diese mit CO₂ angereichert.

Modifiziert nach: Carbothera™ K104 Operation Manual, Mitsubishi Rayon Cleansui Co., Ltd., Kapitel 3, S. 11

2.10.1 Inbetriebnahme von Carbothera™ K104

Für die Inbetriebnahme wurde das Gerät über den Hauptschalter angeschaltet und die CO₂-Flasche geöffnet. Daraufhin wurden die Öffnungen sowie die entsprechenden Stutzen mit 70 %-igem Ethanol gereinigt und die sterilen Schläuche angebracht. Jetzt wurde das Gerät eine Minute lang mit *Aqua dest.* im *Rinse*-Modus betrieben und anschließend entleert. Dies geschah, indem über die Ansaugöffnung nur noch Luft angesaugt wurde.

2.10.2 Herstellung von CO₂-Medium



Abbildung 8 Herstellung von CO₂-Medium

Nach Inbetriebnahme von Carbothera™ wurde ein steriler Schlauch an die Ansaugöffnung angeschlossen und in das angesetzte kalte (4 °C) Zellkulturmedium geführt. Nun wurde das Gerät im *Foot Bathing*-Modus betrieben. Nachdem circa 100 ml des austretenden Mediums verworfen wurden, wurde das Programm kurz gestoppt, ein steriler Schlauch an der Ausflussöffnung angebracht und in den Behälter des Zellkulturmediums zurückgeführt. Dann wurde das Programm für circa eine Minute fortgesetzt. Zum Schluss wurde das Gerät noch entleert und das Medium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

2.10.3 Reinigung von Carbothera™ K104

Das Gerät wurde nach jeder Benutzung gereinigt. Dazu wurde das Gerät eine Minute lang mit *Aqua dest.* im *Rinse*-Modus betrieben und anschließend entleert. Im Anschluss wurde sowohl der *In*- als auch der *Output* in eine zuvor angesetzte 2 %-ige Natriumhypochloridlösung geführt und Carbothera™ für 15 min im *Desinfection*-Modus betrieben. Natriumhypochloridlösung wirkt bei sauberen Flächen und im Wasser mikrobiozid [61]. Nach Abschluss dieses Vorgangs wurden die Schläuche und Stutzen entfernt und das Gerät ausgeschaltet, sodass es bis zur nächsten Inbetriebnahme stets mit Natriumhypochloridlösung gefüllt war. Die Stutzen und Schläuche wurden nach jedem Gebrauch autoklaviert.

2.11 CO₂-Behandlung

Bei allen Versuchen, bei denen eine CO₂-Behandlung (Inkubation) durchgeführt wurde, wurden 2 ml frisches CO₂-Medium in die jeweiligen Zellcontainer der verwendeten 24-*well*-Platten gegeben. Zuvor wurde das alte Kulturmedium abgesaugt. Unbehandelte Kontrollen wurden dementsprechend während der CO₂-Behandlung der Versuchszellen mit 2 ml Medium ohne vorherige Kohlenstoffdioxidanreicherung inkubiert. Jeder Zellcontainer wurde dreifach angelegt.

Bei einer Messung mittels *CellTiterBlue* wurde jeder Zellcontainer jeweils in Doppelbestimmung gemessen. Schlussendlich wurden arithmetische Mittelwerte gebildet.

Außerhalb der CO₂-Behandlung wurden die Zellen mit 0,5 ml Standardmedium im Brutschrank aufbewahrt. Je nach Versuchsaufbau wurden dem Medium Zusätze wie beispielsweise STS oder TGF- β_1 hinzugefügt.

2.11.1 Proliferationstest – Einfluss der Inkubationsdauer

Der Proliferationstest sollte den Einfluss von einer CO₂-Behandlung auf die proliferative Aktivität der Zellen untersuchen. Dabei wurden 1-2 x10⁴ Zellen pro *well* ausgesät. Zu Beginn des Versuchs wurde bei Adhärenz der Zellen die Ausgangszellzahl (t_0) mittels *CellTiterBlue* gemessen. Im Anschluss wurden die Zellen drei Tage lang, einmal täglich für 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten mit kohlenstoffdioxidangereichertem Medium behandelt. Eine unbehandelte Kontrolle (0 min) wurde stets unter derselben Anzahl an Mediumwechsel mitgeführt. Am Tag vier wurde wiederum die Zellzahl mittels *CellTiterBlue* bestimmt.

2.11.2 Proliferationstest – Einfluss der Anzahl der CO₂-Behandlungen

Bei diesem Versuch sollte anhand von Fibroblasten der Einfluss der Anzahl der CO₂-Inkubationen auf die Proliferationsrate untersucht werden. Dazu wurde der Versuch wie zuvor beschrieben konzipiert, jedoch wurden die Zellen lediglich an

Tag 1 einmal mit CO₂ inkubiert und dann an Tag 4 die Zellzahl mittels *CellTiterBlue* bestimmt. Auch hier wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

2.11.3 Proliferationstest – Einfluss der CO₂-Konzentration

Im Rahmen dieses Versuchs sollte der Einfluss der CO₂-Konzentration auf die Proliferation der Zellen untersucht werden. Dazu wurden 10-20 x10³ Zellen/well in eine 24-well Platte ausgesät und im Anschluss bei Adhärenz der Zellen drei Tage lang täglich für 15 min mit CO₂-Medium in unterschiedlichen Konzentrationen (0 %, 3,125 %, 6,25 %, 12,5 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %) inkubiert. Um diese verschiedenen CO₂-Konzentrationen zu erreichen, wurden entsprechende Mengen CO₂-Medium mit Versuchsmedium gemischt. Eine nullprozentige Konzentration entspricht dabei Medium ohne CO₂-Zusatz und ist als unbehandelte Kontrolle anzusehen. Nach drei Tagen wurde dann die Zellzahl mittels *CellTiterBlue* bestimmt.

Konzentration [%]	0	3,125	6,25	12,5	25	50	75	100
CO ₂ -Medium [ml]	0	0,063	0,125	0,25	0,5	1	1,5	2
Standard-medium [ml]	2	1,938	1,875	1,75	1,5	1	0,5	0

Tabelle 10 Mediumansatz für Verdünnungsversuche

2.11.4 Migrationstest

Mit Hilfe des Migrationsassays sollte die Migrationsaktivität der Zellen nach einmaliger CO₂-Inkubation untersucht werden. Dazu wurden 2-well-Silikon-Zellkultureinsätze der Firma ibidi® verwendet, die eine 500 µm breite Lücke im Zelllayer einer 24-well Platte erzeugen. Die Zellkultureinsätze wurden jeweils mit 70 µl einer Zellsuspension aus 3 x10⁵ Zellen pro Milliliter befüllt. Bei Adhärenz der Zellen wurde das Inlay entfernt und im Anschluss lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllücke angefertigt. Dann wurden die Zellen 0 min, 15 min oder 60 min mit Kohlenstoffdioxid behandelt. Nach 24 h wurden erneut Fotos derselben Stelle angefertigt. In der Regel waren die beiden Zellinseln zu dieser Zeit bereits so konfluent, dass keine weitere Aufnahme zu

einem späteren Zeitpunkt mehr gemacht wurde. Anschließend wurde die Fläche der Lücken im Zellrasen mittels *ImageJ* und dem Plugin *mri_wound_healing_tool* ausgewertet.

2.11.5 Differenzierungstest

Durch den Differenzierungstest sollte der Einfluss einer CO₂-Behandlung auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten untersucht werden, indem die Effekte auf die Proteinexpression von entsprechenden Differenzierungsmarkern quantifiziert wurden. Zu Beginn wurden 30.000 Zellen pro Zellcontainer in Dreifachbestimmung in eine 24-well Platte gegeben. Nach der Adhärenz der Zellen wurden diese über drei Tage täglich für 15 oder 60 Minuten mit wässriger Kohlenstoffdioxidlösung behandelt. Es wurden neben den unstimulierten Fibroblasten auch mit TGF-β₁ aktivierte Fibroblasten behandelt. Außerdem wurde auch ein Pärchen mit nicht kohlenstoffdioxidbehandelten Kontrollen (aktiviert und nicht-aktiviert) mitgeführt. Um die Fibroblasten zur Differenzierung zu aktivieren, wurde dem Medium nach der ersten CO₂-Behandlung und bis zum Ende des Versuchs an Tag vier 5 ng/ml TGF-β₁ hinzugefügt (vgl. Differenzierungsmedium Fibroblasten Tabelle 8). An Tag vier wurden die Zellen trypsiniert und das nach Überführung in ein Zellbehältnis und Zentrifugation resultierende Zellpellet in 20 µl Ripa-Puffer bei -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt.

2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Graph Pad Prism v6*. Eine statistische Beratung hat durch das statistische Beratungsbüro am *Institut für systemische Neurowissenschaften* des Universitätsklinikums Düsseldorf stattgefunden.

Die Daten wurden mittels Oneway-ANOVA mit Messwiederholung analysiert. Eine Korrektur für multiples Testen wurde nach Dunnett durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde durch das Verfahren von Shapiro-Wilk

überprüft. War eine Normalverteilung nicht gegeben, wurden die Daten mittels Friedman-Test und Dunn-Korrektur analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Methodik

Im ersten Teil wurden allgemeine Untersuchungen zum Thema CO₂-Behandlung durchgeführt. Es sollten insbesondere Auswirkungen der Behandlung untersucht werden, die die Messergebnisse beeinflussen können. Außerdem wurde überprüft, ob Messungen mittels *CellTiterBlue* die Zellzahl adäquat darstellen können.

3.1.1 pH-Werte von CO₂-Lösungen

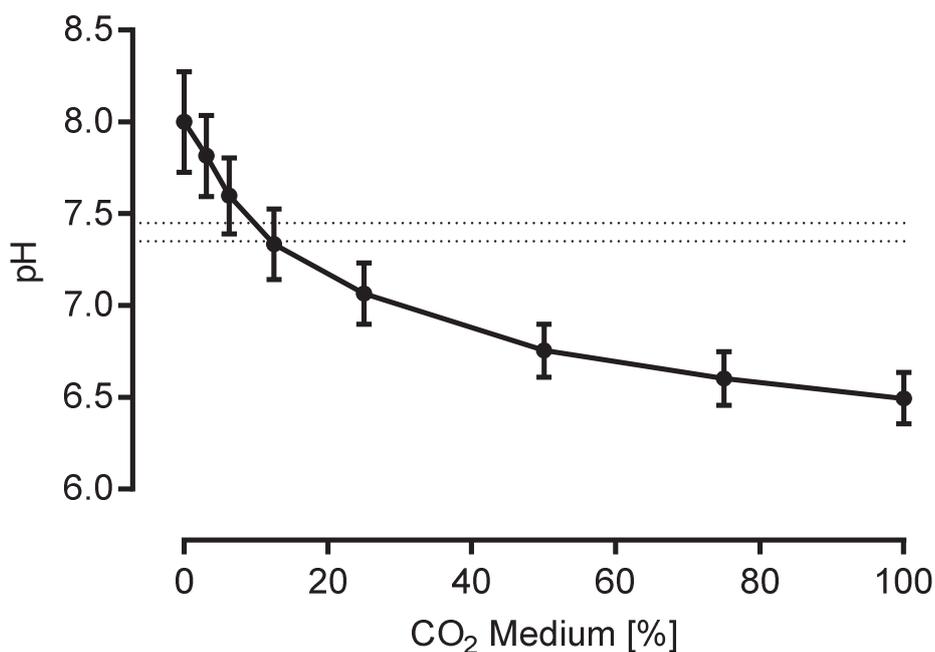


Abbildung 9 pH-Werte unterschiedlich stark konzentrierter CO₂-Medien

Für die pH-Messung wurde das Medium verwendet, das im Rahmen der Proliferationsversuche mit verdünnten CO₂-Medien angesetzt wurde. Die Messung erfolgte nach 15-minütiger Raumluffexposition. Das markierte pH-Wert-Intervall von 7,35 -7,45 hebt den physiologischen pH-Wert hervor. n = 8, dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen

Zur Charakterisierung der verwendeten kohlenstoffdioxidhaltigen Lösungen wurden deren pH-Werte gemessen. Abbildung 9 zeigt die ermittelten pH-Werte unterschiedlich stark konzentrierter kohlenstoffdioxidhaltiger Medien. Dargestellt

sind pH-Mittelwerte von Lösungen mit einem Anteil aus CO₂-Medium von 0 %, 3 %, 6 %, 12,5 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 % in Standardmedium. Im alkalischen Bereich zeigten sich bei Medien ohne Zusatz von CO₂ Maximalwerte von pH = 8. Im azidotischen Bereich wurden bei hundertprozentigen CO₂-Lösungen Minimalwerte von pH = 6,5 gemessen. Der pH-Wert nahm mit Erhöhung der CO₂-Konzentration stetig ab; die Abnahme war dabei nicht linear.

3.1.2 Kurzfristige Zellzahlveränderungen

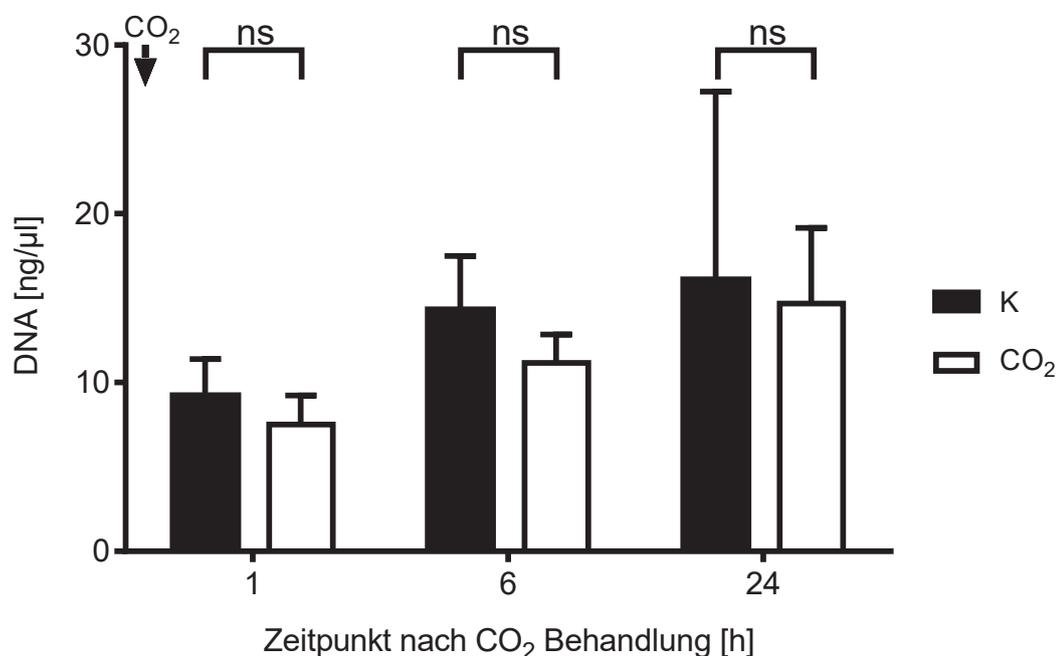


Abbildung 10 DNA-Bestimmung aus behandelten und unbehandelten Zellcontainern

Zu definierten Zeitpunkten (1 h, 6 h, 24 h nach CO₂-Medium Exposition) wurde der DNA-Gehalt von Zellcontainern, deren Zellen eine CO₂-Behandlung erhielten und von Containern, deren Zellen als unbehandelte Kontrollen dienten, gemessen. n = 4, dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, ns p > 0,05; jeweils K vs. CO₂

Es sollte untersucht werden, ob kurz nach einer CO₂-Behandlung bereits eine echte Differenz zwischen den Zellzahlen behandelter und unbehaltener Zellen besteht. Abbildung 10 vergleicht den DNA-Gehalt von Zellcontainern mit behandelten und unbehandelten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kohlenstoffdioxidbehandlung. Ausgewertet wurde der DNA-Gehalt 1 h, 6 h und 24 h nach der CO₂-Behandlung. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt zeigten sich

keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) im DNA-Gehalt der untersuchten Zellcontainer.

3.1.3 Linearität der relativen Zellzahlbestimmung

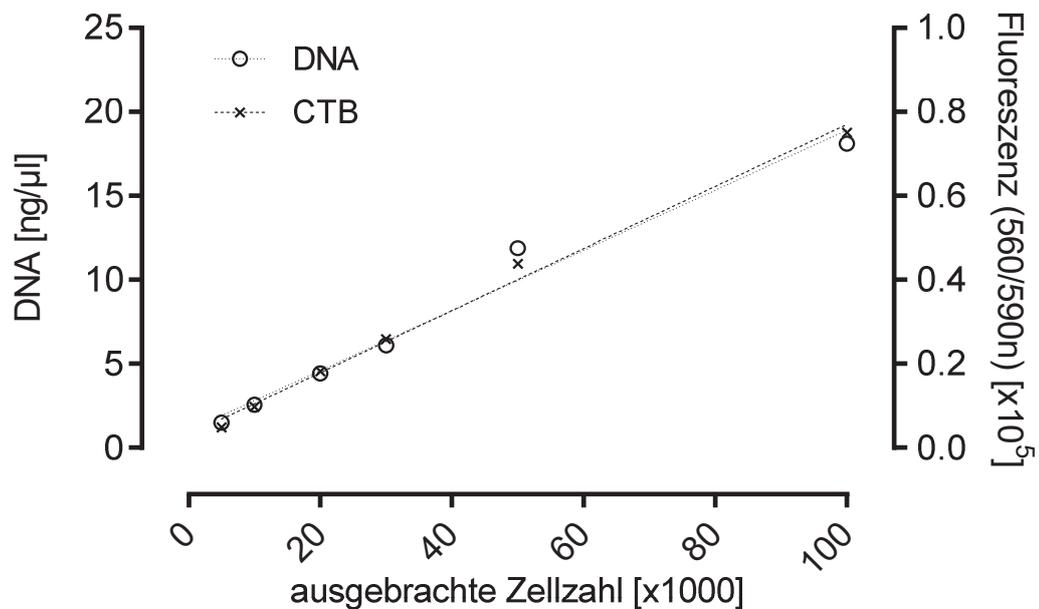


Abbildung 11 Linearität der durch *CellTiterBlue* gemessenen Zellmenge

Fibroblasten wurden in verschiedenen definierten Konzentrationen ($5-100 \times 10^3$) in einzelnen Zellcontainern ausgebracht, bis zur Adhärenz inkubiert und im Anschluss die Zellzahl mittels *CellTiterBlue* und DNA-Quantifizierung bestimmt. Es zeigt sich eine sehr gute Linearität beider Methoden der Zellzahlbestimmung. $n=3$, $R^2(\text{DNA}) = 0,977$, $R^2(\text{CTB}) = 0,993$

Die Zellzahlen einer Kultur wurden in dieser Untersuchung durch *CellTiterBlue* bestimmt und verglichen. Um Zellzahlen sinnvoll vergleichen zu können, sollten Messungen mittels *CellTiterBlue* ein lineares Steigungsverhalten in Abhängigkeit der absoluten Zellzahl zeigen. Abbildung 11 zeigt die *CellTiterBlue*-Signalstärke der untersuchten Zellkulturen in Abhängigkeit der absoluten Ausgangszellzahl. Der DNA-Gehalt wurde als Kontrolle mitbestimmt, da eine gute Linearität in Abhängigkeit der Zellzahl angenommen werden konnte.

Zu Versuchsbeginn wurden zwölf Stunden vor der Messung 5×10^3 bis 100×10^3 Fibroblasten in jeweils einzelne Zellcontainer ausgesät.

Bei der Messung des DNA-Gehaltes aus den einzelnen Zellcontainern zeigte sich eine gute angenäherte Linearität in Abhängigkeit der Zellzahl bei einem R^2 von

0,977. Gleiches galt für die Linearität der Signalstärke nach *CellTiterBlue*-Umsatz in den einzelnen Zellcontainern in Abhängigkeit der ausgebrachten Zellzahl. Die Anpassungsgüte der linearen Näherung der *CellTiterBlue*-Messung betrug $R^2 = 0,993$.

3.2 Die Apoptoserate nach CO₂-Behandlung

Untersucht wurde die Apoptoserate von Zellen nach Kohlenstoffdioxid-behandlung.

Es zeigt sich, dass sowohl 3 h als auch 24 h nach der Exposition keine signifikant erhöhte Apoptoserate zu beobachten war (vgl. Abbildung 12). Auch eine Verminderung der Apoptoserate war nicht nachweisbar. Dies galt sowohl für die Fibroblasten als auch für Keratinozyten und Endothelzellen. Die Kontrolle mittels Staurosporin zeigte bei Fibroblasten, dass eine deutliche Apoptoseinduktion auch schon nach 3 h bereits mittels Durchflusszytometrie signifikant messbar war. Bei den untersuchten Keratinozyten und Endothelzellen ließ sich nach 3 h noch keine eindeutige Reaktion auf Staurosporin erkennen.

Mit deutlich geringerer Streubreite zeigte sich die Staurosporin-vermittelte Apoptoseinduktion nach 24 h nun bei allen drei Zellarten signifikant. Die CO₂-behandelten Zellen zeigten jedoch im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine signifikante Veränderung der Apoptoserate.

Die erhaltene Integrität der Zell-DNA als Marker für die Vitalität der Zellen lässt sich anhand der Messdiagramme der Durchflusszytometrie erkennen. Während der Grad der DNA-Fragmentierung nach 24 h zwischen den unbehandelten Zellen und den Zellen, die 60 min CO₂-inkubiert waren, nahezu keinen Unterschied aufweist, zeigt sich, dass nach 24 h Staurosporin-Inkubation eine nahezu vollständige diffuse Fragmentierung der DNA vorliegt (vgl. Abbildung 14 C).

Abbildung 13 lässt erkennen, dass keine vermehrte Nekrose 3 h nach CO₂-Behandlung zu beobachten war.

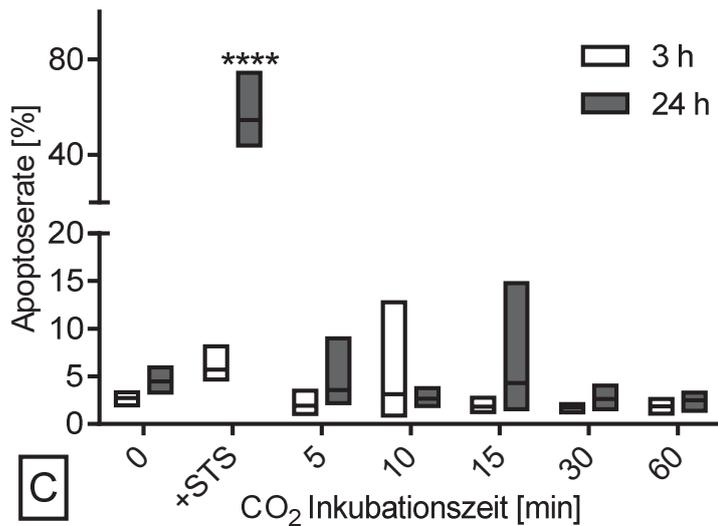
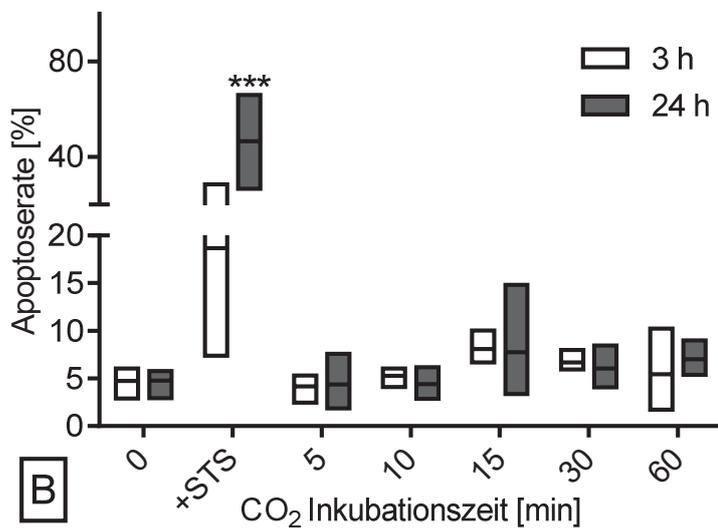
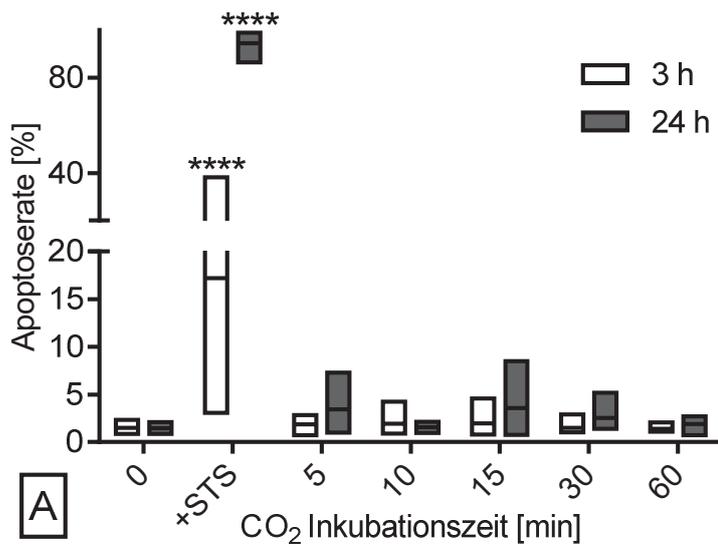


Abbildung 12 FACS-Analyse der Apoptoserate

Analyse der Apoptoserate in Prozent verschiedener Zellen 3 h und 24 h nach Inkubation mit wässriger CO₂-Lösung für 5 min, 10 min, 15 min, 30 min oder 60 min. 0 min Inkubation entsprach einer unbehandelten Kontrolle. +STS entsprach einer unbehandelten Kontrolle unter Zugabe von Staurosporin und diente als Positivkontrolle der Apoptoseinduktion. Dargestellt wurden die Mittelwerte mit minimalen und maximalen Ausprägungen der Apoptoserate. [A] Fibroblasten, n = 8. [B] Keratinozyten, n = 3. [C] Endothelzellen, n = 8. [A-C] Es zeigte sich keine signifikant (p < 0,05) erhöhte Apoptoserate nach CO₂-Behandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die STS Kontrolle war bei [A] bereits nach 3 h positiv (p < 0,0001. Bei [B] und [C] zeigte sich keine Apoptoseinduktion nach 3 h in der STS-Kontrolle. Nach 24 h zeigten alle positiv-Kontrollen eine erhöhte Apoptoserate (p < 0,0001).

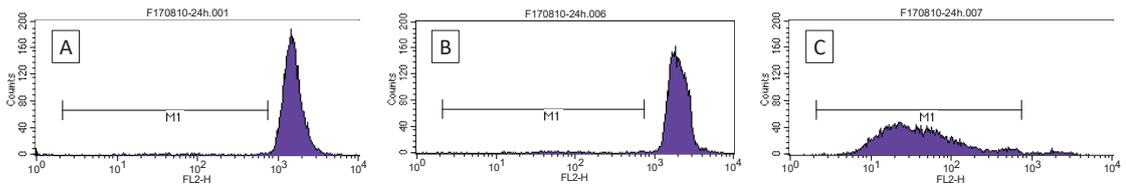


Abbildung 14 Messdiagramme der FACS-Analyse

Dargestellt wurden die Messdiagramme der FACS-Analyse von Fibroblasten einer **[A]** unbehandelten Kontrolle, **[B]** nach 60-minütiger CO₂-Behandlung sowie **[C]** die STS-Kontrolle jeweils nach 24 h.

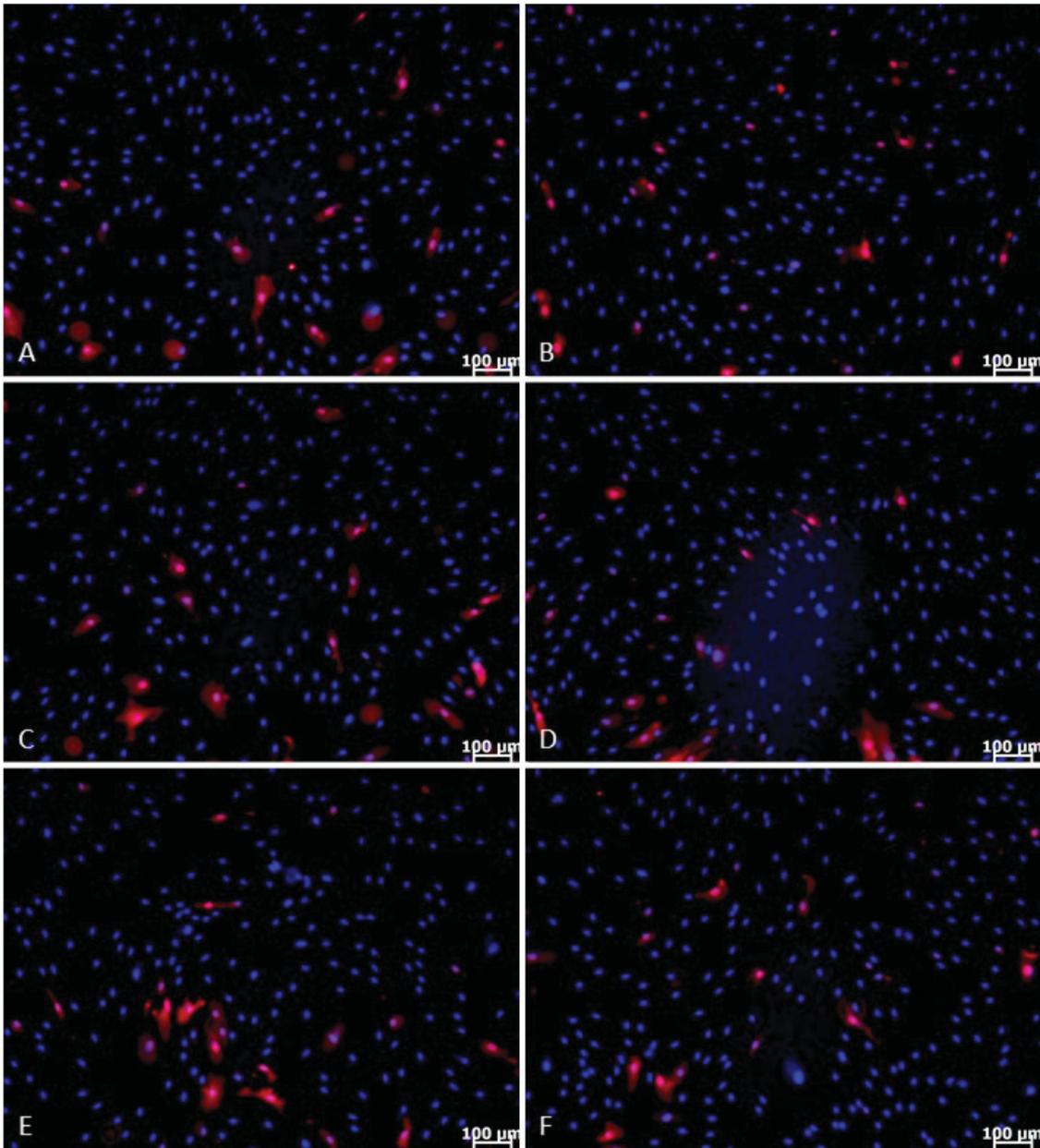


Abbildung 13 Fibroblasten 3 h nach CO₂-Behandlung (Propidiumiodid/Hoechst 33342 Färbung)

Fibroblasten wurden 3 h nach einer CO₂-Behandlung für **[A]** 0 min **[B]** 5 min **[C]** 10 min **[D]** 15 min **[E]** 30 min **[F]** 60 min mit Propidiumiodid/Hoechst 33342 angefärbt.

3.3 Der Einfluss wässriger CO₂-Lösungen auf die Proliferation

Im Folgenden wurde der Einfluss einer Behandlung mit wässrigen CO₂-Lösungen auf die Proliferation der untersuchten Zellen dargestellt. Dabei sollte die Auswirkung einer CO₂-Behandlung auf die einzelnen Zellspezies genauer in Hinblick auf variierende Behandlungsmodalitäten untersucht werden. Es wurde dazu neben der Behandlungshäufigkeit (nur bei Fibroblasten) auch die Konzentration der zur Behandlung verwendeten CO₂-Lösung variiert.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde zum einen die Proliferationsrate (jeweils Bildteil A) der Zellen betrachtet; das heißt der Faktor mit dem sich die Ausgangszellzahl (hier t_0) der unbehandelten Kontrollzellen (0 min) vergrößerte, wurde mit dem Faktor der behandelten Zellen (5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min) verglichen.

Zum anderen wurde die proliferative Aktivität von behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen verglichen (jeweils Bildteil B). Dabei wurde die Proliferation der behandelten Zellen in ein Verhältnis zu der Proliferation der unbehandelten Kontrolle gesetzt (relative Zellzahl). Dieses Verfahren ermöglichte es, interindividuelle Unterschiede der Zellkulturen in der Proliferation aus der Gewichtung zu nehmen.

Im Rahmen der CO₂-Konzentrationsversuche wurde nur die proliferative Aktivität betrachtet.

3.3.1 Proliferation von Fibroblasten

Bei den Fibroblasten (Abbildung 15 A) zeigte sich bereits nach einer täglichen CO₂-Behandlung für fünf Minuten eine signifikante Abnahme der Proliferationsrate ($p = 0,0114$). Eine Steigerung der Behandlungsdauer führte zu einer Verstärkung des Effektes, sodass man ab einer Behandlungsdauer von täglich 10 min über drei Tage bereits signifikant inhibitorische Effekte mit $p < 0,01$ erkennen konnte.

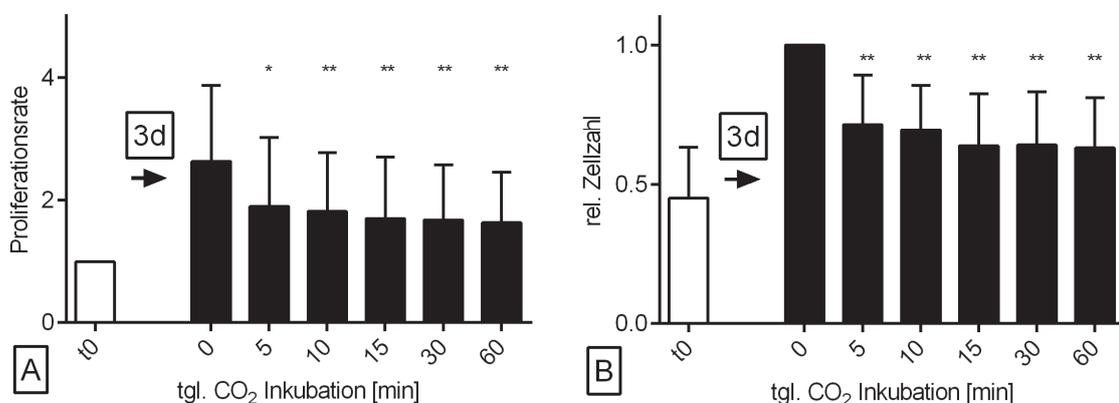


Abbildung 15 Proliferation von Fibroblasten nach täglicher CO₂-Behandlung

Dargestellt sind die [A] Proliferationsraten und die [B] proliferative Aktivität (rel. Zellzahl im Vergleich zur unbeeideten Kontrolle) nach täglicher CO₂-Behandlung. Die CO₂-Behandlung erfolgte für 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min oder 60 min mit 100 % CO₂-Lösung. Die Zellen wurden jeweils an Tag 1-3 mit wässriger CO₂-Lösung behandelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte jeweils an Tag 4 mittels *CellTiterBlue*. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen in Bezug auf die [A] Ausgangszellzahl (t_0) oder die [B] unbeeidete Kontrolle (0 min). t_0 Ausgangszellzahl vor erster CO₂-Inkubation. $n=9$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; jeweils verglichen mit der unbeeideten Kontrolle

Die in Abbildung 15 A dargestellten Ergebnisse wurden nun auf die unbeeidete Kontrolle normiert (vgl. Abbildung 15 B), sodass jetzt die prozentuale Veränderung der proliferativen Aktivität gegenüber der unbeeideten Kontrolle untersucht werden konnte. Dabei zeigte sich wiederum, dass bereits eine tägliche, fünfminütige sowie alle weiteren untersuchten CO₂-Inkubationszeiten einen signifikanten ($p < 0,01$) inhibitorischen Effekt auf die proliferative Aktivität ausüben konnten. Dies bestätigte noch einmal die in Abbildung 15 A dargestellten Ergebnisse.

Neben einer täglichen Inkubation sollte auch der Effekt einer einmaligen CO₂-Inkubation auf Fibroblasten untersucht werden (Abbildung 16).

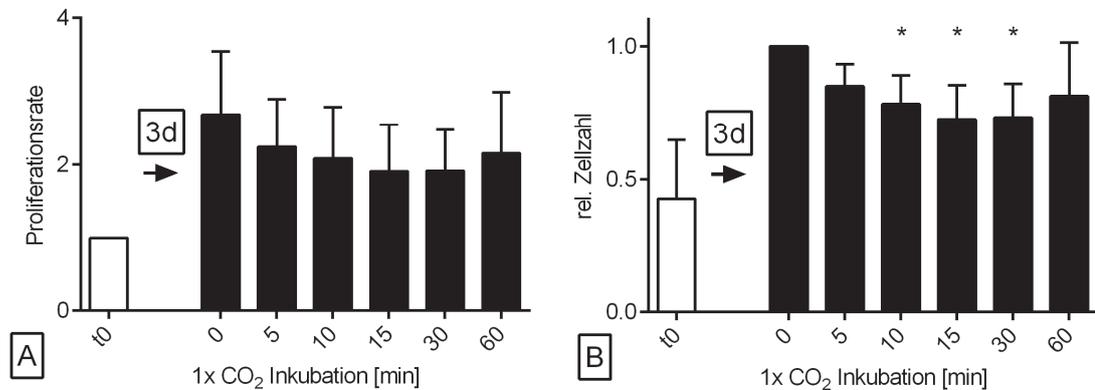


Abbildung 16 Proliferation von Fibroblasten nach einmaliger CO₂-Behandlung

Dargestellt sind die **[A]** Proliferationsraten und die **[B]** proliferative Aktivität (rel. Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) nach einmaliger CO₂-Behandlung an Tag 1. Die CO₂-Behandlung erfolgte für 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min oder 60 min mit 100 % CO₂-Lösung. Die Zellen wurden jeweils an Tag 1 mit wässriger CO₂-Lösung behandelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte jeweils an Tag 4 mittels *CellTiterBlue*. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen in Bezug auf die **[A]** Ausgangszellzahl (t₀) oder die **[B]** unbehandelte Kontrolle (0 min). t₀ Ausgangszellzahl vor erster CO₂-Inkubation. n=5, * p < 0,05; jeweils verglichen mit der unbehandelten Kontrolle

Wenn man den Einfluss einer einmaligen CO₂-Behandlung an Tag 1 auf die Zellzahl an Tag 4 untersucht, zeigte sich eine nicht signifikant veränderte Proliferationsrate, unabhängig von der Behandlungsdauer (Abbildung 16 A). Die proliferative Aktivität hingegen (Abbildung 16 B) zeigte sich signifikant verringert bei einer einmaligen Inkubation der Fibroblasten von 10 min, 15 min und 30 min Dauer (p < 0,05). Eine einmalige fünfminütige Behandlung hatte in diesem Versuch keinen signifikanten Effekt. Ebenso konnte bei 60-minütiger Inkubation kein signifikanter Effekt auf die proliferative Aktivität beobachtet werden.

Als nächstes sollte der Effekt einer variierenden Konzentration des CO₂-Mediums auf die Proliferation von Fibroblasten untersucht werden.

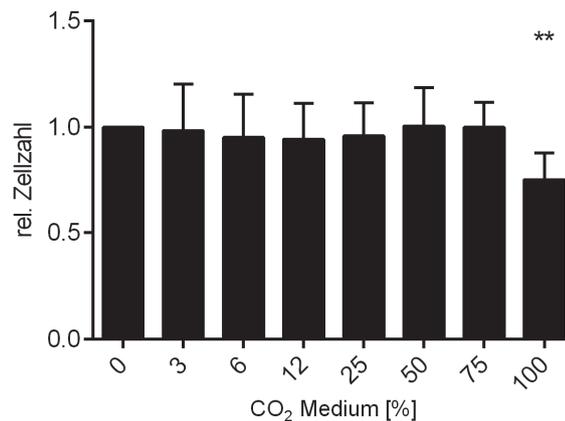


Abbildung 17 Proliferation von Fibroblasten nach täglicher CO₂-Behandlung mit verdünnter Lösung

Dargestellt ist die proliferative Aktivität (rel. Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) nach CO₂-Behandlung. Die CO₂-Behandlung erfolgte für 15 min mit CO₂-Lösung einer Konzentration von 0 %, 3 %, 6 %, 12,5 %, 25 %, 50 %, 75 % oder 100 %. Die Zellen wurden jeweils an Tag 1-3 mit wässriger CO₂-Lösung behandelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte an Tag 4 mittels *CellTiterBlue*. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (0 % CO₂). n=8, ** p < 0,01; jeweils verglichen mit der unbehandelten Kontrolle

Betrachtet man das proliferative Verhalten bei Inkubation mit unterschiedlich stark konzentrierten CO₂-Lösungen für jeweils 15 min, konnte man lediglich bei 100-prozentig konzentrierten Lösungen die oben bereits beschriebene Abnahme der proliferativen Aktivität wiedererkennen (p < 0,01) (Abbildung 17). Dies entspricht den Ergebnissen aus Abbildung 15 B bei 15-minütiger Behandlung. Schon 75-prozentige kohlenstoffdioxidhaltige Lösungen ließen keinen signifikanten Effekt mehr erkennen.

3.3.2 Proliferation von Keratinozyten

Die Behandlung von Keratinozyten zeigte zwar auch, unabhängig von der täglichen Behandlungsdauer, eine Verringerung der Proliferationsraten gegenüber der unbehandelten Kontrolle, diese war jedoch nicht signifikant (p > 0,05) (Abbildung 18 A).

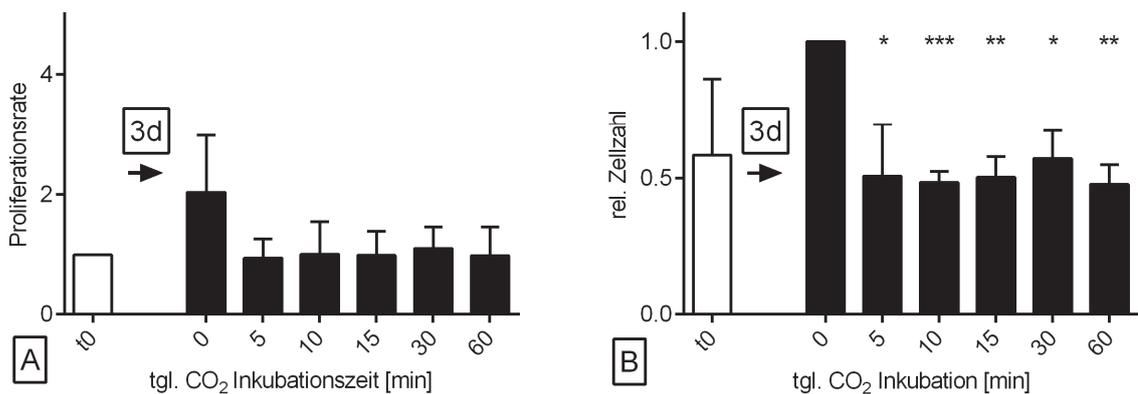


Abbildung 18 Proliferation von Keratinozyten nach täglicher CO₂-Behandlung

Dargestellt sind die [A] Proliferationsraten und die [B] proliferative Aktivität (rel. Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) nach täglicher CO₂-Behandlung. Die CO₂-Behandlung erfolgte für 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min oder 60 min mit 100 % CO₂-Lösung. Die Zellen wurden jeweils an Tag 1-3 mit wässriger CO₂-Lösung behandelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte jeweils an Tag 4 mittels *CellTiterBlue*. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen in Bezug auf die [A] Ausgangszellzahl (t₀) oder die [B] unbehandelte Kontrolle (0 min). t₀ Ausgangszellzahl vor erster CO₂-Inkubation. n=4, ns p > 0,05, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; jeweils verglichen mit der unbehandelten Kontrolle

Untersucht man den Effekt einer Behandlung mit wässriger CO₂-Lösung auf die proliferative Aktivität von Keratinozyten im Vergleich zu unbehandelten Zellen, zeigte sich bereits bei fünfminütiger CO₂-Inkubation eine signifikante Abnahme der proliferativen Aktivität gegenüber der unbehandelten Kontrolle (p < 0,05) (vgl. Abbildung 18 B). Die weiteren Inkubationszeiten von mehr als fünf Minuten zeigten ebenfalls eine signifikant abnehmende proliferative Aktivität. Bei Betrachtung der Proliferationsraten war dieser Effekt noch nicht sichtbar (für Erläuterungen vgl. Kapitel 4.4)

Des Weiteren wurde der Einfluss der CO₂-Konzentration der verwendeten Lösung auf die Zellproliferation von Keratinozyten untersucht. Dabei konnte bei 3 % konzentrierter wässriger CO₂-Lösung eine signifikant (p = 0,0004) erniedrigte proliferative Aktivität festgestellt werden (Abbildung 19).

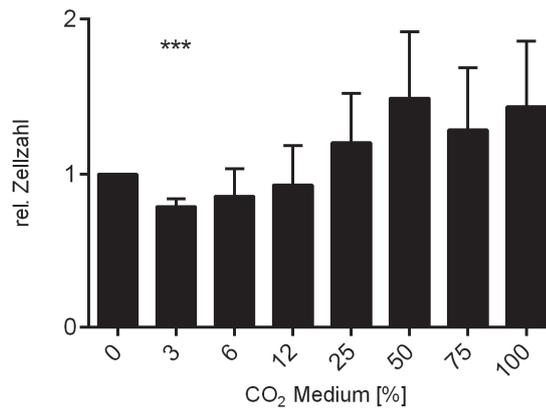


Abbildung 19 Proliferation von Keratinozyten nach täglicher CO₂-Behandlung mit verdünnter Lösung

Dargestellt ist die proliferative Aktivität (rel. Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) nach CO₂-Behandlung. Die CO₂-Behandlung erfolgte für 15 min mit CO₂-Lösung einer Konzentration von 0 %, 3 %, 6 %, 12,5 %, 25 %, 50 %, 75 % oder 100 %. Die Zellen wurden jeweils an Tag 1-3 mit wässriger CO₂-Lösung behandelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte an Tag 4 mittels *CellTiterBlue*. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (0 % CO₂). n=7, ns p > 0,05, *** p < 0,001; jeweils verglichen mit der unbehandelten Kontrolle

3.3.3 Proliferation von Endothelzellen

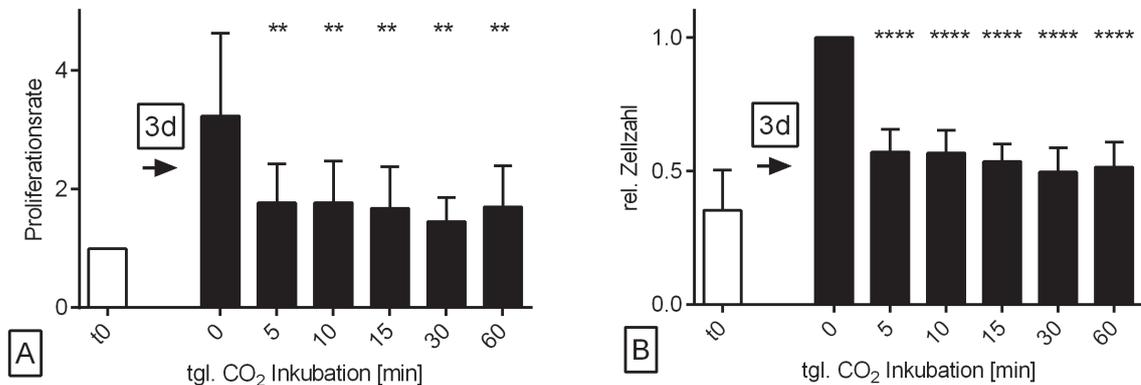


Abbildung 20 Proliferation von Endothelzellen nach täglicher CO₂-Behandlung

Dargestellt sind die [A] Proliferationsraten und die [B] proliferative Aktivität (rel. Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) nach täglicher CO₂-Behandlung. Die CO₂-Behandlung erfolgte für 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min oder 60 min mit 100 % CO₂-Lösung. Die Zellen wurden jeweils an Tag 1-3 mit wässriger CO₂-Lösung behandelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte jeweils an Tag 4 mittels *CellTiterBlue*. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen in Bezug auf die [A] Ausgangszellzahl (t₀) oder die [B] unbehandelte Kontrolle (0 min). t₀ Ausgangszellzahl vor erster CO₂-Inkubation. n=8, ** p < 0,01, **** p < 0,0001; jeweils verglichen mit der unbehandelten Kontrolle

Bei Endothelzellen (Abbildung 20 A) ließen sich inhibitorische Effekte auf die Proliferationsrate erkennen. Die Proliferationsraten waren nach der Behandlung mittels CO₂-Lösung signifikant ($p < 0,01$) gegenüber der unbehandelten Kontrolle erniedrigt.

Bei der Betrachtung der proliferativen Aktivität von Endothelzellen nach CO₂-Behandlung zeigte sich eine signifikante Verminderung ($p < 0,0001$) (vgl. Abbildung 20 B). Dieser Effekt war bereits ab einer täglichen Inkubation von fünf Minuten zu beobachten.

Unter Variation der CO₂-Konzentration zeigte sich ein inhibitorischer Effekt bei einer Konzentration der wässrigen CO₂-Lösung von 3 % ($p = 0,0244$). Darüber hinaus inhibierte, wie in Abbildung 21 zu erkennen, nur 100-prozentige CO₂-Lösung die proliferative Aktivität signifikant ($p = 0,0005$). Die restlichen untersuchten CO₂-Konzentrationen beeinflussten die proliferative Aktivität nicht signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

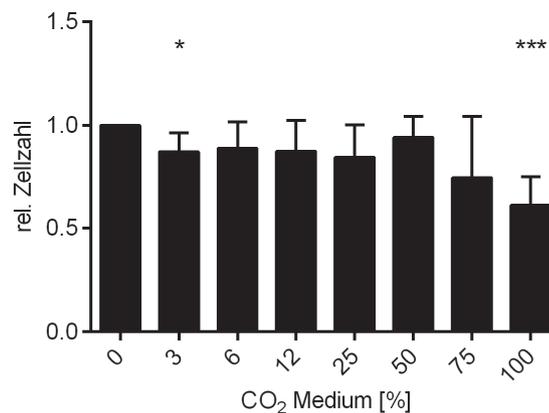


Abbildung 21 Proliferation von Endothelzellen nach täglicher CO₂-Behandlung mit verdünnter Lösung

Dargestellt ist die proliferative Aktivität (rel. Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) nach CO₂-Behandlung. Die CO₂-Behandlung erfolgte für 15 min mit CO₂-Lösung einer Konzentration von 0 %, 3 %, 6 %, 12,5 %, 25 %, 50 %, 75 % oder 100 %. Die Zellen wurden jeweils an Tag 1-3 mit wässriger CO₂-Lösung behandelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte an Tag 4 mittels *CellTiterBlue*. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (0 % CO₂). n=8, ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; jeweils verglichen mit der unbehandelten Kontrolle

3.3.4 Proliferationsraten

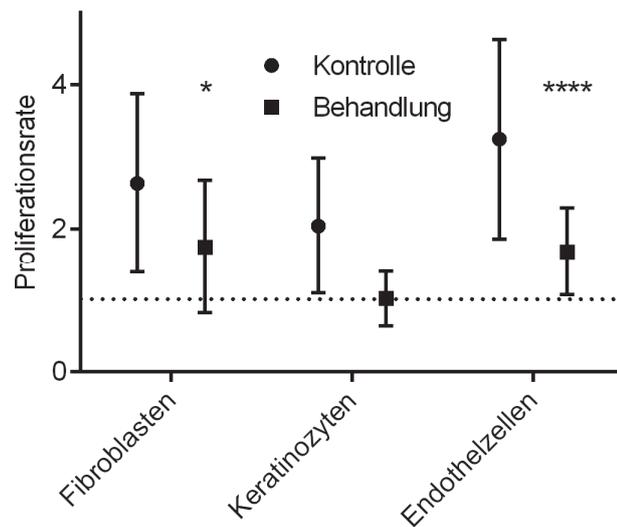


Abbildung 22 Proliferationsraten behandelter und unbehandelter Zellen

Vergleich der Proliferationsraten unbehandelter und behandelter Zellen unabhängig der Behandlungsdauer. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferationsraten in Bezug auf die Ausgangszellzahl. [A] n=9, [B] n=5, [C] n=8, * p < 0,05, **** p < 0,0001; jeweils verglichen mit der unbehandelten Kontrolle

Vergleicht man die Proliferationsraten von unbehandelten und behandelten Zellen unabhängig von der Behandlungsdauer (Abbildung 22), zeigte sich bei Fibroblasten eine signifikante Abnahme von 2,63 auf 1,75 ($p = 0,0136$), beziehungsweise von 3,24 auf 1,68 ($p < 0,0001$) bei Endothelzellen. Die Abnahme der Proliferationsrate bei Keratinozyten von 2,04 auf 1,01 war hingegen nicht signifikant. Dabei war zu beachten, dass eine Proliferationsrate von 1 über drei Tage bedeutet, dass keine Vermehrung der Zellzahl stattgefunden hat.

3.4 Zellmigration nach wässriger CO₂-Behandlung

Bei der Untersuchung der Zellmigration wurden artifizielle Lücken im Zellrasen vermessen und verglichen. Dabei wurden die restlichen Freiflächen behandelter und unbehandelter Kulturen nach 24 Stunden jeweils mit der ursprünglichen Freifläche ins Verhältnis gesetzt.

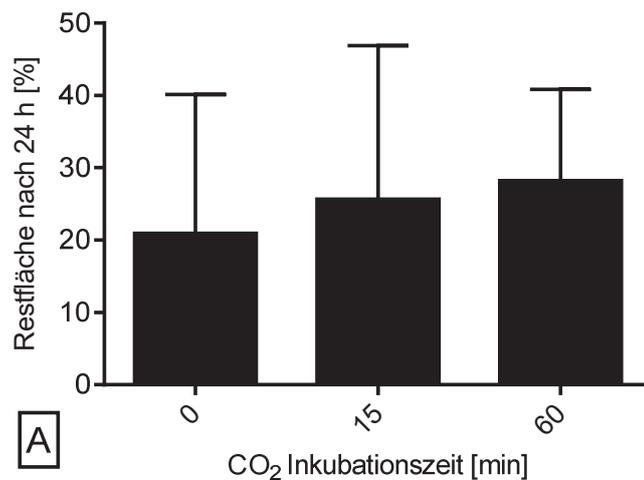


Abbildung 23 Der Einfluss wässriger CO₂-Lösungen auf die Migration von Fibroblasten

A Dargestellt wurden die prozentualen Restflächen einer Zellrasenlücke 24 h nach einer Behandlung mit wässriger CO₂-Lösung für 0 min, 15 min oder 60 min. 0 min Behandlung war dabei die unbehandelte Kontrolle und diente als Referenz für die Signifikanztestung. n=7, Mittelwerte und Standardabweichungen wurden graphisch dargestellt. $p > 0,05$; jeweils verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Beim Betrachten der Restfläche 24 Stunden nach der CO₂-Exposition im Vergleich zur ursprünglichen Freifläche im Zelllayer zeigte sich, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen CO₂-behandelten und unbehandelten Zellen bestanden (vgl. Abbildung 23). Dabei war es unerheblich, ob die Zellen 15 min oder 60 min mit CO₂ behandelt wurden. Es ließ sich jedoch eine Tendenz erkennen. Diese zeigte eine nicht-signifikante ($p > 0,05$) Inhibition der Migration nach CO₂-Behandlung; eine 60-minütige Behandlung zeigte dabei den stärkeren Effekt. Die Migration unbehandelter Zellen über 24 Stunden führte zu einer Reduktion der Freifläche um 79,1 %. Bei CO₂-Inkubation beträgt diese Reduktion bei 15-minütiger Behandlung lediglich 74,3 % und bei 60-minütiger Behandlung 71,8 %. Nach 48 Stunden konnten bei allen Gruppen keine Lücken im Zellrasen mehr detektiert werden.

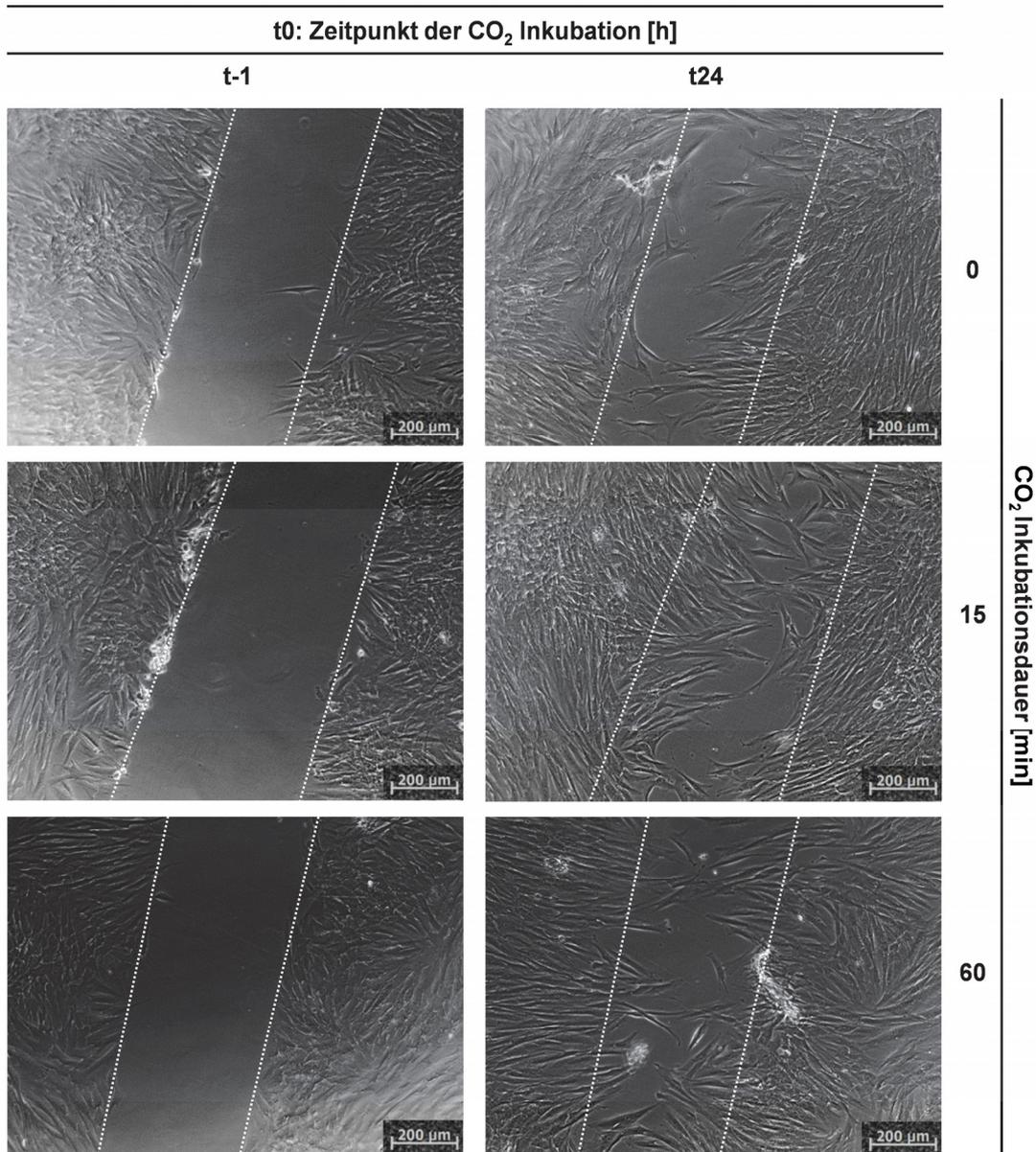


Abbildung 24 Mikroskopische Aufnahmen der Lücken im Zellrasen

Dargestellt wurden repräsentative mikroskopische Aufnahmen der erzeugten Zelllücken vor (t-1) und 24 Stunden (t24) nach der Behandlung. Die Zelllücken wurden graphisch hervorgehoben.

3.5 Der Einfluss wässriger CO₂-Lösungen auf die Differenzierung von Fibroblasten

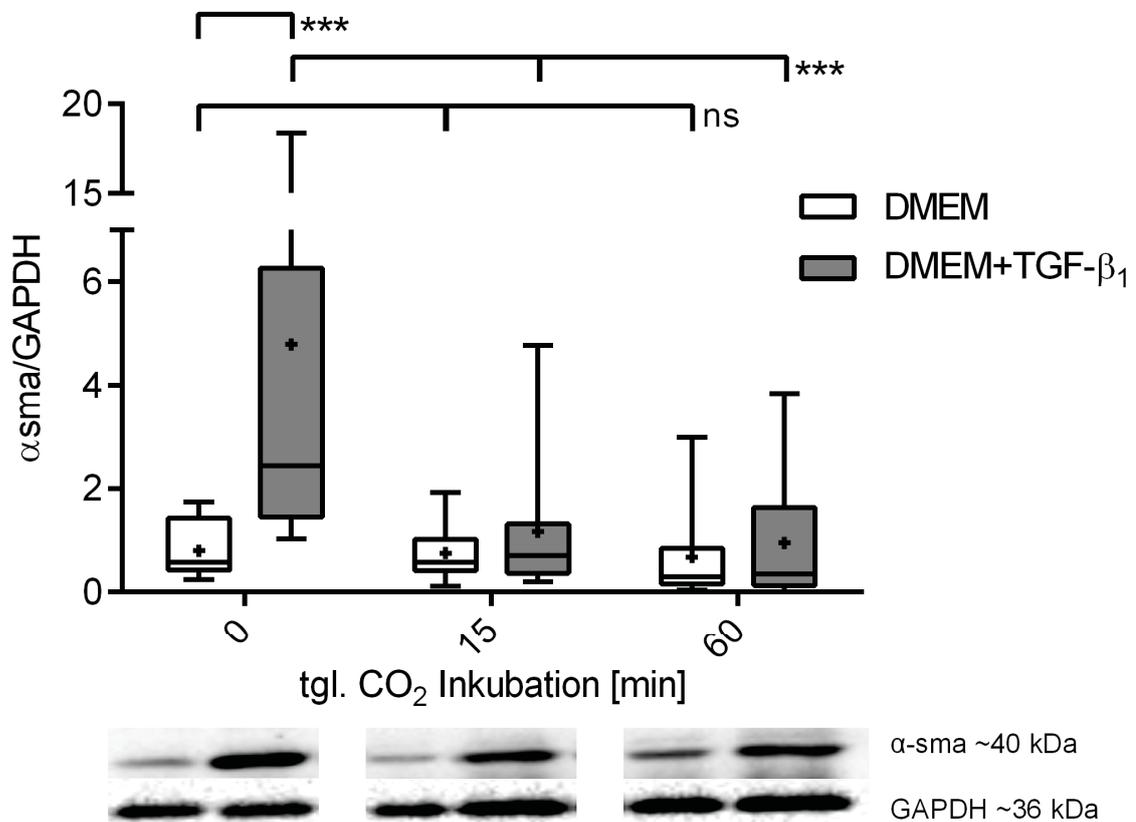


Abbildung 25 α -sma-Expression nach CO₂-Behandlung und TGF- β ₁-Zugabe

Dargestellt sind die Medianwerte der Quotienten aus α -sma- und GAPDH-Expression von Fibroblasten nach täglich 15- sowie 60-minütiger Behandlung mit wässriger CO₂-Lösung für drei Tage. Die Zellen wurden außerhalb der CO₂-Inkubationszeiten in normalem Kulturmedium [weiß DMEM] oder Differenzierungsmedium [grau DMEM+TGF- β ₁] gehalten. Außerdem eingezeichnet sind Minimal- und Maximalwerte, unteres und oberes Quartil sowie Median und Mittelwert [+]. n=8, ns p > 0,05, *** p < 0,001; jeweils verglichen mit der unbehandelten Kontrolle

Ausgewertet wurde die α -sma-Expression im Verhältnis zum *housekeeping*-Gen GAPDH. *Alpha-smooth-muscle-actin* gilt als Marker der Differenzierung von Fibroblasten und wird nach Stimulation durch TGF- β ₁ exprimiert.

Es zeigte sich, dass die Expression von α -sma in zu Myofibroblasten differenzierten Fibroblasten mittels CO₂-Inkubation signifikant beeinflusst werden konnte.

Während die TGF- β ₁ aktivierten Zellen als positiv-Kontrolle eine signifikant erhöhte Expression von α -sma gegenüber den unbehandelten Zellen zeigten

($p = 0,0004$), war es möglich, diesen Effekt durch die Inkubation mit wässriger CO_2 -Lösung signifikant zu modifizieren. Sowohl bei $\text{TGF-}\beta_1$ aktivierten Fibroblasten die täglich 60 min ($p = 0,0007$), als auch bei so aktivierten Zellen die täglich nur 15 min ($p = 0,0004$), mit CO_2 behandelt wurden, zeigte sich eine signifikante Reduktion der α -sma Expression im Western Blot. Nicht-aktivierte Fibroblasten zeigten unter täglicher CO_2 -Behandlung keine signifikante Veränderung in ihrer α -sma Expression; sie lag vielmehr im basalen Bereich unstimulierter Fibroblasten ($p > 0,05$).

Zusammenfassend ist der signifikante Effekt hervorzuheben, dass $\text{TGF-}\beta_1$ -stimulierte Fibroblasten nach CO_2 -Behandlung keine erhöhte α -sma-Expression mehr zeigten und damit nicht in den Phänotypen des Myofibroblasten übergangen.

3.6 Angiogenese der Endothelzellen

Der Angiogenese-Assay ermöglichte die kulturelle Anzucht tubulärer Gefäßformationen *in vitro*. Die Zellen wurden 14 Tage kultiviert, bevor die Auswertung stattgefunden hat. Dazu wurden die mikroskopischen Bilder anhand einer Ordinalskala qualitativ bewertet.

Gruppe	Behandlung	Tubulusbildung
A	Kontrolle (unbehandelt)	+
B	+ CO_2	-
C	+ VEGF (positiv)	++
D	+ VEGF + CO_2	+
E	+ Suramin (negativ)	--
F	+ Suramin + CO_2	--

Tabelle 11 Qualitative Auswertung des Angiogenese Assay

Qualitative Bewertung der Tubulusbildung: wenig tubuläre Strukturen --, -, +, ++ viele tubuläre Strukturen. Vgl. Abb. 21)

Die Kultivierung von Endothelzellen in dem Medium des Kitsystems ohne Zusätze führte nach 14 Tagen zu einer basalen Bildung tubulärer Strukturen (vgl. Tab. 11 A). Der Zusatz von VEGF erhöhte die Ausbildung vaskulärer Strukturen deutlich (C), während der Zusatz von Suramin als negativ-Kontrolle die Bildung

eindeutig hemmte (E). Die tägliche Kohlenstoffdioxidbehandlung führte zu einer Abnahme der basalen sowie der VEGF-stimulierten Tubulusbildung jeweils um einen Bewertungspunkt (B, D). Bei Zellen, denen Suramin als Angiogenesehemmer zugesetzt wurde, führte eine CO₂-Behandlung zu keiner weiteren Abnahme der Tubulusbildung (F).

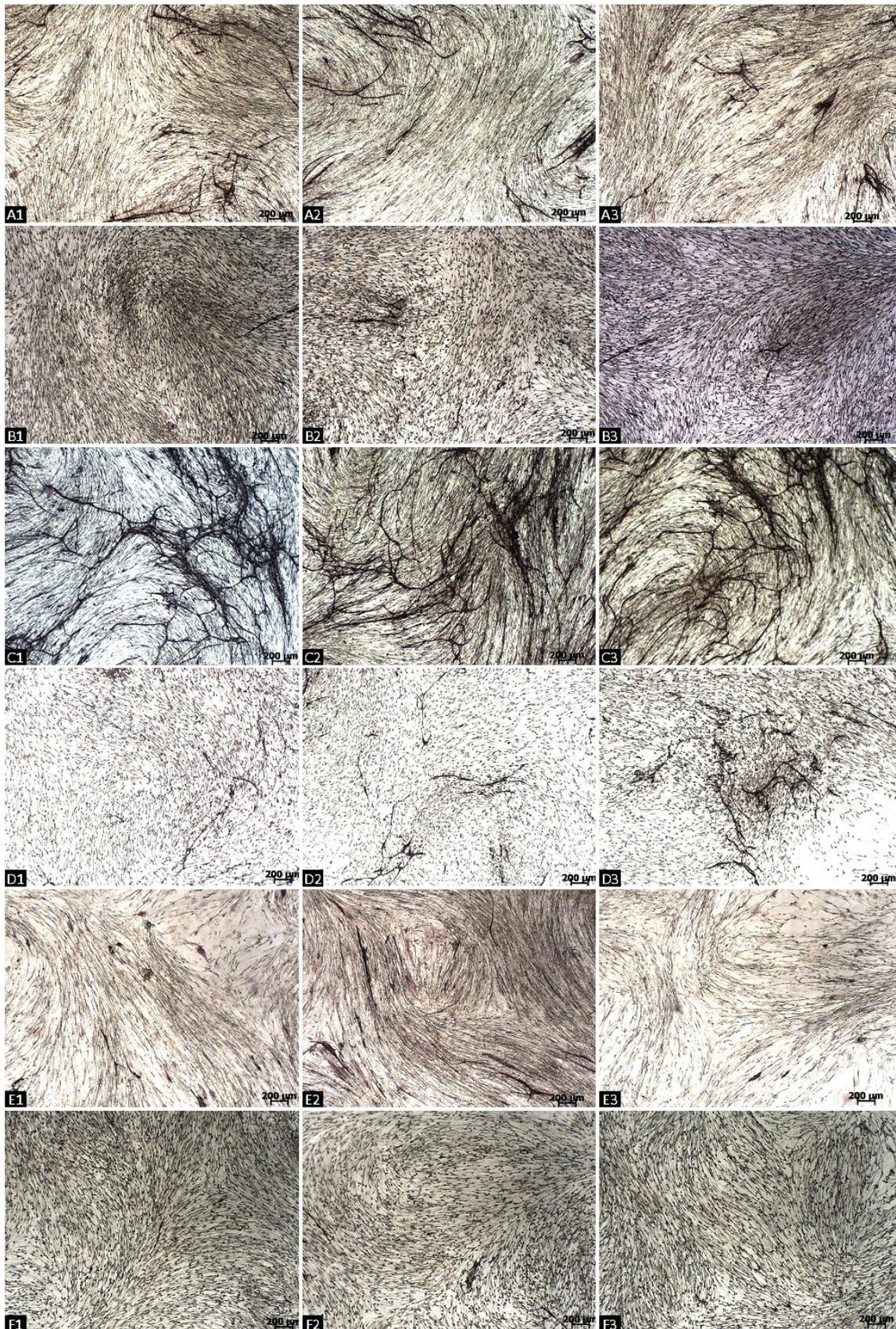


Abbildung 26 Angiogenese-Assay

Dargestellt wurde jeweils drei repräsentative Bilder (1-3) einer Gruppe (A-F). Alle Zellen wurden im Wachstumsmedium des Kits kultiviert und mit folgenden Zusätzen behandelt: **[A]** unbehandelte Kontrolle **[B]** +CO₂ **[C]** +VEGF **[D]** +VEGF+CO₂ **[E]** +Suramin **[F]** +Suramin+CO₂. Die CO₂-Behandlung erfolgte alle 48 h über zwei Wochen für 15 min.

3.7 *CellTiterBlue*-Fluoreszenzsignale behandelter und unbehandelter Zellen

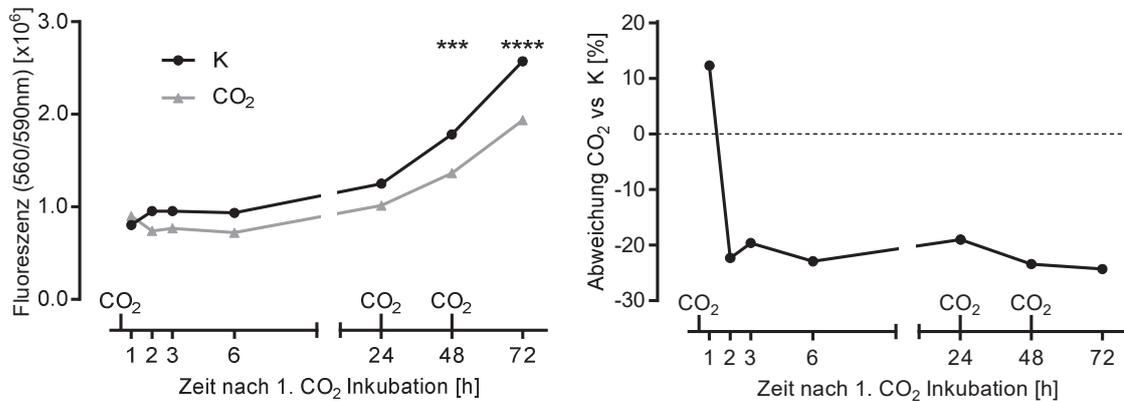


Abbildung 27 Darstellung der Signaldifferenz bei CO₂-behandelten und unbehandelten Zellen nach Zugabe von *CellTiterBlue*

Es zeigte sich, dass nach einer 15-minütigen Behandlung der Fibroblasten zu den gewählten Messpunkten (1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h nach Exposition) keine Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen in der mittels *CellTiterBlue* ermittelten Zellvitalität vorlagen. Nach einer zweiten Behandlung nach 24 h zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Die darauf folgende dritte Behandlung und die Bestimmung der Zellvitalität nach 72 h bestätigte diese Differenz ebenfalls signifikant. n=6, ns p > 0,05, *** p < 0,001, **** p < 0,0001; jeweils K vs. CO₂

Dargestellt wurden Fluoreszenzsignale behandelter und unbehandelter Zellen 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h nach erstmaliger CO₂-Behandlung (Abbildung 27). Die Fluoreszenzsignale wurden nach *CellTiterBlue*-Zugabe ermittelt. Es zeigte sich bis inklusive 24 Stunden nach der ersten Kohlenstoffdioxidbehandlung kein signifikanter Unterschied (p > 0,05) in der Fluoreszenzantwort behandelter und unbehandelter Zellen. Es bestand jedoch bereits zu Beginn eine nicht-signifikante Differenz von circa 20 %. Erst nach der zweiten CO₂-Behandlung und weiteren 24 Stunden zeigten sich signifikant verschiedene Fluoreszenzsignale behandelter und unbehandelter Zellen (p = 0,0002). Dieser signifikante Unterschied fiel umso deutlicher nach der dritten CO₂-Behandlung und 72 h nach Versuchsbeginn aus (p < 0,0001).

Zusammenfassend unterschieden sich die mittels *CellTiterBlue* gemessenen Zellzahlen zu Beginn nicht-signifikant, jedoch relativ konstant um etwa 20 %. Nach 48 Stunden und wiederholter CO₂-Behandlung nahm die Differenz zu und stellte sich fortan signifikant dar.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss wässriger kohlenstoffdioxidhaltiger Medien auf die im Prozess der kutanen Wundheilung relevanten Parameter Proliferation, Migration und Differenzierung untersucht. Dabei waren Fibroblasten, Keratinozyten sowie Endothelzellen als besonders relevante Zellpopulationen Gegenstand der hier vorliegenden Untersuchungen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den generellen Einfluss einer CO₂-Behandlung auf einzelne dieser wundheilungsrelevanten Parameter *in vitro* zu untersuchen. Die oben beschriebenen Effekte sind dabei von beobachtender Natur. So lässt sich zu diesem Zeitpunkt sicher sagen, dass eine Behandlung mit kohlenstoffdioxidhaltigen Bädern in der Lage war, die verschiedenen untersuchten Parameter der unterschiedlichen Zelllinien zu beeinflussen. Zu den Mechanismen auf zellulär-molekularer Ebene lassen sich aus den erhobenen Ergebnissen nun verschiedene Hypothesen ableiten, die perspektivisch einer genaueren Untersuchung bedürfen.

Betrachtet man die an den Fibroblasten ermittelten Daten, zeigte sich eine verminderte Proliferation und auch deutlich eine inhibitorische Wirkung auf die Differenzierung zu Myofibroblasten. Bei den Fibroblasten wurde auch der Einfluss einer einmaligen CO₂-Behandlung untersucht. Bei diesem Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, dass bereits eine einmalige CO₂-Exposition die Proliferation der Zellen signifikant reduzieren konnte; wenn auch nicht in dem Maße, wie nach drei Tagen täglicher Behandlung. Die Migrationsfähigkeit wurde nicht signifikant herabgesetzt.

Ebenso wie bei den Fibroblasten zeigten sich signifikant verminderte Proliferationsraten auch bei den Keratinozyten- und Endothelzellkulturen.

Darüber hinaus konnte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes in allen Zellreihen festgestellt werden. Lediglich hundertprozentige CO₂-Lösungen konnten einen signifikant verminderten Anstieg der Zellzahl von Fibroblasten und Endothelzellen bewirken. Die Zahlen der Verdünnungsreihen bei Keratinozyten bildeten dabei eine Ausnahme und entsprachen nicht den äquivalent erhobenen Daten unter regulären Bedingungen des Proliferationsversuches (vgl. Abbildung 18 B: 15 min Behandlung). Dies gibt

Anlass zur Diskussion und sollte gegebenenfalls durch eine erneute Testung verifiziert werden.

Bei den Endothelzellen wurde auch der Einfluss einer CO₂-Behandlung auf die Angiogenese untersucht. Dabei zeigte sich ein inhibitorischer Effekt der Behandlung auf die Bildung tubulärer Strukturen.

Die Gesamtheit der erhobenen Befunde lässt sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht durch eine erhöhte Apoptoserate und damit durch eine Toxizität der Behandlung erklären. Vielmehr müssen andere Ursachen zugrunde liegen, die auf zellulärer Ebene der Signaltransduktion, des Energiemetabolismus oder der Genexpression zu vermuten sind.

4.1 Zellzahleffekte und mögliche Ursachen

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Proliferationsversuchen zeigten bei allen behandelten Zelltypen nach drei Tagen eine signifikant geringere Zellzahl.

Auf der einen Seite könnte diese Diskrepanz der Zellzahl durch einen erhöhten Verlust von Zellen im Rahmen der Behandlung erklärt werden. Das heißt, Zellen könnten durch die Inkubation mit kohlenstoffdioxidhaltigen Medien verstärkt abgestorben oder im Rahmen der Versuchsdurchführung vermehrt aus dem Kulturgefäß entfernt worden sein.

Auf der anderen Seite könnte eine tatsächlich verschiedene Proliferationsrate zugrunde gelegen haben, die sich nach drei Tagen als unterschiedliche Zellzahl darstellte.

Ersteres würde einem absoluten Verlust von Zellen entsprechen, während man im zweiten Fall von einem Zellzahlunterschied aufgrund verschiedener Wachstumsraten sprechen kann.

Diese beiden Hypothesen und mögliche Ursachen sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

4.1.1 Azidifizierung

Ein Ansatzpunkt einer Erklärung für die verminderten Zellzahlen in den behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, könnte eine durch die Therapie induzierte Hyperkapnie sein. Um eine daraus resultierende

Azidose zu quantifizieren, wurde der pH-Wert der angesetzten Versuchsmedien aus den Verdünnungsexperimenten gemessen (vgl. Abbildung 9).

Bei einer hundertprozentigen Konzentration des CO₂-Mediums zeigten sich pH-Werte von durchschnittlich 6,5, sodass die behandelten Zellen einem deutlich azidotischen Milieu ausgesetzt waren. Aufgrund der im Rahmen des Versuchsaufbaus verzögerten pH-Wert-Messung, ist von einem „ausgasen“ der Versuchsmedien auszugehen, sodass für die frisch angesetzten Verdünnungen eher noch niedrigere pH-Werte anzunehmen sind, als hier dargestellt wurde. Es ist anzunehmen, dass das nullprozentige CO₂-Medium initial in einem physiologischen pH-Bereich von 7,35 - 7,45 angesiedelt gewesen ist. Ein erniedrigter pH-Wert stellt eine mögliche Ursache für ein vermindertes Zellwachstum dar [62, 63] und bietet damit eine erste mögliche Erklärung.

Eine Studie von Teixeira et al. an *Human Embryonic Kidney* Zellen (HEK-293) konnte zeigen, dass eine extrazelluläre Azidifizierung neben einem intrazellulären pH-Abfall auch zu einer gesteigerten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führte [64]. Darüber hinaus wurde eine verminderte Zellvitalität, sowie eine erhöhte Nekroptoserate beobachtet [64]. Die Nekroptose ist eine Art des Zelltodes, die als regulierte Nekrose beschrieben werden kann. Dabei kommt es zu einer, im Vergleich zur Apoptose, erhöhten Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen wie Proteinen und DNA. Daher besitzt die Nekroptose *in vivo* eine höhere inflammatorische Potenz [65].

Die hier durchgeführte FACS-Analyse konnte nach CO₂-Inkubation keine gesteigerte Apoptoserate nachweisen. Durch die Propidiumiodid-Färbung vitaler Zellkulturen nach CO₂-Behandlung konnte in dieser Arbeit kein Hinweis auf ein erhöhtes Nekroseaufkommen und damit auf einen absoluten Zellverlust gefunden werden, so wie es in der Studie von Teixeira et al. beobachtet wurde. Zusammenfassend kann es durch eine Azidose also zu einer verringerten Proliferation sowie zu einem vermehrten Zelltod durch Nekroptose kommen. Daraus würde sich eine Kombination aus Proliferations-bedingtem und absolutem Zellzahlverlust durch ein saures Milieu als Ursache der erhobenen Zellzahlunterschiede ergeben. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben aber Hinweise darauf, dass ein absoluter Zellverlust durch Nekrose und insbesondere Apoptose keine Bedeutung haben.

4.1.2 Absoluter Zellverlust und Quantifizierung

Neben dem Zelltod durch Azidifizierung des Milieus stellt eine methodenbedingt verringerte Adhärenz der Zellen im Rahmen der CO₂-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe eine weitere mögliche Ursache eines absoluten Zellverlustes dar. So käme es zu einem erhöhten Verlust von sich in Suspension befindlichen Zellen.

Um dieses Risiko so gering wie möglich zu halten, wurde mit behandelten und unbehandelten Zellen im Rahmen des Versuchsaufbaus exakt gleich verfahren. Insbesondere die Anzahl der Medienwechsel war gleich. Während die Versuchszellen in CO₂-Medium inkubiert wurden und anschließend wieder normales Kulturmedium erhalten haben, wurden die Kontrollzellen der gleichen Anzahl an Medienwechseln unterzogen, hierzu wurde jedoch durchgängig normales Kulturmedium verwendet.

Um zu untersuchen, ob ein erhöhter Zellverlust abseits der Apoptose durch eine CO₂-Behandlung stattgefunden hat, wurde ein Vergleich des DNA-Gehaltes von behandelten und unbehandelten Zellen aus Kulturen mit einer definierten Ausgangszellzahl durchgeführt. Abbildung 10 zeigt, dass nach regelhafter Behandlung von Fibroblasten mit CO₂-Lösung für 15 min keine signifikanten Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollen im DNA-Gehalt bestanden. Dieser fehlende Unterschied zeigte sich sowohl kurz nach der Behandlung (1 h) als auch nach 24 Stunden. Dies bedeutet, dass es zu keinem absoluten DNA- und damit Zellverlust durch die CO₂-Behandlung gekommen war. Dabei konnten sowohl Adhärenzverlust oder Zellverlust durch Nekrose oder Nekroptose ausgeschlossen werden. Somit ist anhand dieser Befunde davon auszugehen, dass kein relevanter absoluter Verlust von Zellen stattgefunden hat, stattdessen muss eine andere Ursache für verschiedene Zellzahlergebnisse von behandelten und unbehandelten Zellen vorliegen.

4.1.3 Beeinflussung des Zellmetabolismus

Nimmt man nun an, dass die beobachteten Effekte aufgrund von Unterschieden in der Proliferation zustande gekommen sind, müssen die Ursachen auf Ebene des zellulären Metabolismus liegen.

In einer Arbeit von Vohwinkel et al. hat eine Analyse der Expression der Isocitratdehydrogenase II eine signifikante Verminderung des Enzyms bei CO₂-inkubierten Fibroblasten gezeigt [66]. Auch eine ältere Studie von Shevchenko et al. konnte bereits zeigen, dass eine erhöhte Kohlenstoffdioxidkonzentration in der Lage war, die Aktivität der Isocitratdehydrogenase in Rattenlebern zu verringern [67].

Darüber hinaus konnte durch eine Inkubation von primären Fibroblastenkulturen für drei Tage in einer Atmosphäre mit gesteigerten CO₂-Partialdrücken eine Abnahme der Zellverdopplungszeit gezeigt werden [66]. Die in dieser Studie erhobenen Daten zur Zellverdopplungszeit wurden dabei mittels BrdU-Assay ermittelt [66].

Nebenbei konnten Vohwinkel et al. zeigen, dass ein ins Saure verschobener pH-Wert nicht die alleinige Ursache für verminderte Zellzahlen nach Inkubation in Kohlenstoffdioxidlösungen darstellt, da die Daten dieser Studie unter Einsatz von gepufferten Medien erhoben wurden [66].

Diese Daten passen sehr gut zu den hier erhobenen Ergebnissen. Möglicherweise bewirkte eine erhöhte Konzentration von CO₂ als Ausdruck eines erhöhten metabolischen Stresses eine Abnahme der Aktivität des mitochondrialen Citratzyklus und damit der aeroben Glykolyse. In der Folge zeigte sich eine verminderte proliferative Aktivität, Migration und Differenzierung, um unter den metabolisch ungünstigen Bedingungen Energie in Form von ATP einzusparen.

Während Vohwinkel et al. in ihrer Arbeit beschrieben haben, dass die IDH II-Expression der Zellen nach drei Tagen CO₂-Inkubation abnimmt, lassen die hier erhobenen Daten bereits eine Abnahme von intrazellulären Reduktionsmitteln nach einer 15-minütigen Inkubation vermuten (vgl. Abbildung 27).

Die Zellvitalitätsmessung mittels *CellTiterBlue* zeigte bereits innerhalb der ersten Stunde nach 15-minütiger Exposition der Fibroblasten mit CO₂-Medium einen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Auch wenn die beobachtete Diskrepanz nicht statistisch signifikant war, betrug sie im engmaschigen Verlauf nach CO₂-Inkubation relativ konstant einen Wert von circa 20 % (vgl. Abbildung 27). Bei einer zweiten Behandlung zum Zeitpunkt 24 h zeigten sich 48 h nach der ersten Behandlung signifikante Unterschiede

($p < 0,001$) zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Die darauf folgende dritte Behandlung und die Bestimmung der Zellvitalität nach 72 Stunden bestätigte diese Differenz ebenfalls signifikant ($p < 0,0001$).

Es besteht die Möglichkeit, dass die hier festgestellten Unterschiede im Umfang von 20 % kurz nach einer CO₂-Behandlung auf metabolische Ursachen zurückzuführen sind. Die nach 48 Stunden beobachteten signifikanten Unterschiede sind dann hingegen tatsächliche Zellzahlunterschiede aufgrund einer verschiedenen proliferativen Aktivität von behandelten Zellen und Kontrollzellen.

4.1.4 Interaktionen zwischen CO₂ und *CellTiterBlue*

Nicht klar auszuschließen ist in dem Fall der hier durchgeführten Studie eine mögliche Interaktion einer CO₂-Behandlung mit der Zellzahlbestimmung mittels *CellTiterBlue*. Möglicherweise setzen kohlenstoffdioxidbehandelte Zellen *CellTiterBlue* in geringerem Maße um, wodurch eine geringere Zellzahl vorgetäuscht werden könnte.

Bei der *CellTiterBlue*-Reaktion wird Resazurin hauptsächlich in der Atmungskette zu Resorufin umgesetzt; ohne dabei jedoch die Funktion der Atmungskette zu beeinflussen [68]. Außer in der Atmungskette der Zellen kann Resazurin auch im mitochondrialen Plasma sowie im Cytoplasma durch verschiedene Proteine reduziert werden. Eine Verringerung der Reduktion zu Resorufin kann daher auch als eine Verringerung der generellen metabolischen Aktivität betrachtet werden.

Die im Verlauf divergierende und zunehmend signifikante Diskrepanz zwischen den *CellTiterBlue*-Signalen behandelter und unbehandelter Zellen macht einen tatsächlichen Zellzahlunterschied aufgrund verschiedener Proliferationsraten wahrscheinlicher (vgl. Abbildung 27). Abschließend lässt sich anhand der vorliegenden Daten aber keine eindeutige Aussage treffen, ob tatsächlich eine unterschiedliche Proliferationsrate vorliegt oder ob *CellTiterBlue* in CO₂-behandelten Zellen nur schlechter umgesetzt wird. Es ist jedoch anzunehmen, dass ein möglicherweise beeinträchtigter Metabolismus auch eine verminderte Zellproliferation zur Folge hat und es sich somit um eine Wechselwirkung handelt. So können die signifikanten Differenzen zwischen behandelten und

unbehandelten Zellen nach 48 und 72 Stunden tatsächlich als verminderte Zellzahl aufgrund unterschiedlicher Proliferationsraten aufgefasst werden. Dies passt auch zu den in anderen Studien erhobenen und weiter oben bereits diskutierten Daten.

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung und Praktikabilität bedeutet dies, dass bereits kurzzeitige, aber sich wiederholende Behandlungen einen Effekt auf den Zellenergiemetabolismus haben können. Dabei spielt der pH-Wert höchstens eine untergeordnete Rolle. Auch gibt es im *in vitro* Versuch keinen Anhalt dafür, dass es zu absoluten Zellzahlverlusten durch die CO₂-Behandlung kommt, unabhängig davon, ob durch Zelltod oder durch andersartigen Zellverlust.

Die gezeigten unmittelbaren Einflüsse auf den Stoffwechsel sind wichtige Ansatzpunkte für weiterführende experimentelle Untersuchungen. Sollte es zu diesen Ergebnissen weitere molekulare Korrelate geben, wäre dies ein sehr potenter Ansatz, der direkt im Energiemetabolismus der Zelle ansetzen würde.

4.2 Antifibrotische Effekte

Eine interessante Beobachtung ist, dass bereits eine 15-minütige CO₂-Behandlung für drei Tage dazu führte, dass TGF- β stimulierte Fibroblasten eine verminderte Differenzierung zu Myofibroblasten zeigten. Dies führte soweit, dass die α -sma-Expression dem Niveau von unstimulierten Fibroblasten glich. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist bisher nicht gefunden.

Inhibitorische Einflüsse eines sauren Milieus, wie sie auf die Proliferation beschrieben sind [62, 63], konnten in einer durch die Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchung nicht nachgewiesen werden.

Eine Studie von Leinhos et al. konnte 2019 zeigen, dass eine Hypoxie über den *hypoxia inducible factor 1 α* (HIF-1 α) die α -sma Ausbeute von Fibroblastenkulturen verringern konnte [69]. Dabei konnte nicht differenziert werden, ob es zu einer verringerten Expression oder zu einer Entdifferenzierung gekommen war [69]. Studien konnten zeigen, dass eine Entdifferenzierung von Myofibroblasten zu Fibroblasten, einhergehend mit einer Degradierung der Extrazellulärmatrix, durchaus möglich ist. Dies eröffnet potentiell neue Ansätze in der Therapie fibrotischer Erkrankungen [32].

Betrachtet man die Wundheilung generell, verursacht eine Verletzung von Gewebe auch eine Zerstörung der Kapillaren und beeinträchtigt damit die Vaskularisierung des Gebietes. Zusätzlich zu dieser absoluten Unterversorgung des Gewebes kommt es zu einer relativen Mangelversorgung. Dies kommt durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der Zellen aufgrund ihrer erhöhten metabolischen Aktivität während des Wundheilungsprozesses zustande [70]. Diese lokale Kreislaufinsuffizienz kann über einen mangelnden Abtransport des anfallenden CO₂ in der Folge auch zu einer Hyperkapnie führen. Tierexperimentelle Studien an Mäusen konnten zeigen, dass unter anderem HIF-1 α im Hirngewebe von Tieren, die unter normobaren aber hyperkapnischen und hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, signifikant erhöht war [71]. Eine weitere Studie konnte darlegen, dass insbesondere eine Hyperkapnie den HIF-1 α Gehalt deutlich erhöhen konnte [72].

Die hier erhobenen Befunde einer verringerten α -sma Expression nach täglicher 15- oder 60-minütiger CO₂-Behandlung über drei Tage lassen annehmen, dass die durch eine Hypoxie induzierten und HIF-1 α abhängigen Befunde von Leinhos et al. [69], bezüglich der Verminderung des α -sma-Gehaltes von Fibroblastenkulturen, auch bei hyperkapnischen Bedingungen zu beobachten sind. Experimente, die auf Basis der hier vorliegenden Daten in unserem Labor durchgeführt wurden, konnten diese Hypothese bestätigen.

Es gibt zahlreiche Mechanismen, die bei der Induktion der Differenzierung von Fibroblasten zu α -sma positiven Myofibroblasten durch TGF- β eine Rolle spielen. So werden neben dem klassischen Weg über smad-Signaltransduktion auch Wege über *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), activator protein-1 (AP-1) und über Rho-GTPase vermittelte Kaskaden als entscheidend angesehen [20, 25].

Es konnte gezeigt werden, dass neben einer deutlich gesteigerten Expression von HIF-1 α bereits eine Stunde nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen das Protein ARHGAP29 in Fibroblasten signifikant erhöht war [69]. ARHGAP29 gehört zu den Rho-GTPase aktivierenden Proteinen. Sie verstärken die intrinsische GTPase-Aktivität von aktivierten GTP-gebundenen RhoA-Proteinen und führen so über die Hydrolyse von GTP zu GDP zu einer Inaktivierung der RhoA-Proteine und damit zu einer verringerten Signaltransduktion [23].

Während die bei Leinhos et al. durch Hypoxie induzierte Proteinexpression nach einer Stunde signifikant verändert war, konnte in der hier durchgeführten Studie bereits ein signifikanter Unterschied in der α -sma Expression nach täglich 15-minütiger CO₂-Behandlung über drei Tage hinweg festgestellt werden. Dies lässt sich möglicherweise durch die von Kulikov et al. beschriebene höhere Potenz einer Hyperkapnie, HIF-1 α zu induzieren, erklären [72]. Andererseits könnte dies bedeuten, dass weniger die Dauer der CO₂-Behandlung, als vielmehr die Repetition den entscheidenden Faktor für die verringerte α -sma-Expression darstellt.

4.3 Lokale CO₂-Effekte

Neben der Wirkung von wässrigen CO₂-Bädern auf zellulärer Ebene sind auch systemische Effekte zu beachten, welche in diesem *in vitro* Versuch jedoch nicht modelliert werden konnten. Aus klinischer Sicht ist die gute lokale Durchblutungssituation ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Wundheilung.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass konsekutive Bäder in CO₂-Medien über 18 Tage hinweg positive Effekte auf die Durchblutung hatten [49]. Fabry et al. haben mittels einer randomisierten Doppelblindstudie die Effekte auf die Durchblutungssituation von Patienten mit Claudicatio intermittens im pAVK-Stadium Fontaine II untersucht. Nach 18-tägiger Behandlung konnten eine signifikant gesteigerte maximale sowie schmerzfreie Gehstrecke gemessen werden. Darüber hinaus verbesserten sich unter anderem typische klinische Parameter wie der Knöchel-Arm-Index und der Basis-pO₂ [49]. Eine Studie von Finzgar et al. konnte diese vasodilatatorischen Effekte von CO₂ mit signifikanter Verbesserung der lokalen Perfusions- und Oxygenierungssituation im Vergleich zur unbehandelten Extremität bestätigen [50].

Sollen nun die in dieser *in vitro* Untersuchung gezeigten Effekte auf wundheilungsrelevante Parameter und die entsprechenden Effekte einer *in vivo* Applikation von CO₂-Medien auf den Organismus in Zusammenhang gebracht werden, zeigen sich Widersprüche. Grundsätzlich scheint es eine Diskrepanz zwischen der Wirkung von CO₂-Medien auf einzelne Zellen, so wie sie hier

untersucht wurden und Zellen in einem intakten Gewebeverband, so wie sie *in vivo* zu finden sind, zu geben.

So zeigen sich bei den *in vitro* Zellkulturversuchen hier durchgehend inhibitorische Effekte auf die wundheilungsrelevanten Parameter. *In vivo* hingegen bewirken CO₂-Behandlungen wundheilungsfördernde Effekte [42].

Insbesondere die Diskrepanz der durchblutungsfördernden Effekte im *in vivo*-Organismus und die hier beobachteten inhibitorischen Effekte einer CO₂-Behandlung auf die Neoangiogenese fallen auf.

Eine mögliche Erklärung dieser Befunde ist eine unterschiedliche Konzentration des Kohlenstoffdioxids. Während Zellen bei intakter Haut durch die Hornschicht und reichlich Bindegewebe vor hohen, von extern zugeführten CO₂-Konzentrationen geschützt sind, fehlt diese Barriere *in vitro* völlig. Selbst chronische Wunden können den Zellen im offen liegenden Wundgrund durch Fibrinbeläge und Schichten aus nekrotischen Zellen einen gewissen Schutz gegenüber hohen CO₂-Konzentrationen bieten.

Den höchsten Einfluss auf die Wirkung von CO₂ *in vitro* hat aber vermutlich die fehlende Durchblutung [7]. Die essenzielle Aufgabe des Blutes ist es, anfallende Metabolite wie CO₂ aufzunehmen und abzutransportieren. Fehlt diese suffiziente Durchblutung, lassen sich typische Wundheilungsstörungen beobachten. Möglicherweise wurde durch den hier dargestellten Versuchsaufbau also die Situation einer chronischen Wunde bei Durchblutungsstörung mit erhöhten CO₂-Partialdrücken simuliert.

Die Bestrebung des Organismus, anfallendes CO₂ möglichst zügig abzutransportieren, lässt sich aber nutzen. So kann eine CO₂-Behandlung helfen, den peripher-arteriellen Widerstand zu senken und somit die Perfusion der Extremitäten zu erhöhen [49, 73]. Der genaue Mechanismus der Vasodilatation durch CO₂ bleibt unklar. Studien an den Koronargefäßen von Hunden *in vivo* konnten beispielsweise einen Zusammenhang zwischen erhöhten NO-Konzentrationen, einer Hyperkapnie und einer Azidose belegen, sodass von einer NO-vermittelten Vasodilatation unter hyperkapnischen Kreislaufbedingungen auszugehen ist [74, 75].

Durch die so erzielte Vasodilatation und damit verbesserte Perfusionssituation wird gleichzeitig der CO₂-Abtransport verbessert [75]. Somit ist fraglich, ob die in dieser *in vitro* Studie beobachteten negativen Effekte auf die

wundheilungsrelevanten Parameter so auch *in vivo* zu beobachten wären, denn schon bei 75-prozentigen CO₂-Medien konnte in den hier durchgeführten Versuchen keine signifikant verminderte Proliferation mehr festgestellt werden. Daher wäre es anzustreben, die Auswirkungen von geringer konzentrierten CO₂-Medien auch auf die Differenzierung und Migration der untersuchten Zellen zu prüfen. Es ist darüber hinaus anzunehmen, dass sehr hohe CO₂-Konzentrationen in der Zellkultur über verschiedene molekulare Mechanismen inhibitorisch wirken, jedoch im Organismus indirekt über die Verbesserung der Perfusionssituation und damit auch erhöhter CO₂-Eliminierung wundheilungsfördernd wirken können.

Des Weiteren haben Sakai et al. in einer Studie einen förderlichen „artificialen Bohr-Effekt“ durch transkutane Applikation von Kohlenstoffdioxid nachweisen können [76]. Dabei wurden während transkutaner CO₂-Applikation *in vivo*, erniedrigte pH-Werte im Gewebe gemessen. Die Oxy-Hämoglobinkonzentration zeigte sich im Sinne des physiologischen Bohr-Effektes nach der Behandlung erniedrigt sowie die Desoxy-Hämoglobinkonzentration erhöht. [76].

4.4 Kritische Betrachtung der Methodik

Die Versuche wurden mit Primärzellkulturen menschlicher Spender durchgeführt, was im Rahmen der statistischen Auswertung beachtet wurde: zum einen wurden entsprechende statistische Testverfahren genutzt und zum anderen wurden die zu testenden Normwerte dementsprechend ausgewählt. Um korrekte Aussagen über die Proliferation zu tätigen, wurde diese nicht nur auf ein Vielfaches des Ausgangswert t_0 , sondern auf ein Vielfaches der jeweiligen unbehandelten Kontrolle normiert. Dieses Verfahren schließt eine interindividuell unterschiedliche proliferative Aktivität unter den Zellen verschiedener Spender aus und ermöglicht eine einheitlichere Abschätzung der proliferativen Aktivität der Zellen unter CO₂-Behandlung. Dieser Aspekt zeigt sich insbesondere bei einem Vergleich der Ergebnisse des Proliferationsversuches von Keratinozyten und Endothelzellen. Während die Endothelzellen unabhängig des gewählten Normierungsverfahrens eine signifikant verminderte Proliferationsraten zeigen, präsentiert sich die Proliferation der Keratinozyten erst unter methodischem Ausschluss der interindividuellen proliferativen Aktivität signifikant erniedrigt.

Dies hängt damit zusammen, dass nur eine Endothelzelllinie EA.hy 926 verwendet wurde und diese naturgemäß in allen Versuchen die gleiche Grundproliferation gezeigt hat. Dies war bei den sehr inhomogenen, von verschiedenen Spendern stammenden und in Bezug auf die Kulturbedingungen sehr sensiblen Keratinozytenkulturen nicht der Fall. In geringerem Maße ließ sich dies auch bei den im Vergleich zu den Keratinozyten robusteren Fibroblastenkulturen erkennen.

Bei diesen Versuchen zur Proliferation wurde *CellTiterBlue* verwendet, um bei den Experimenten zur Untersuchung des Einflusses wässriger CO₂-Lösungen die Zellzahl relativ zu einer Kontrolle zu bestimmen. Dabei wurde über den von *CellTiterBlue* gemessenen Umsatz von Resazurin zu Resorufin und damit über die Zellvitalität auf die Zellzahl geschlossen.

Nicht gesichert werden konnte, ob CO₂ durch Inhibition der Atmungskette den Umsatz von *CellTiterBlue* verringert und somit verringerte Zellzahlen vortäuscht. Durch die Annahme, dass eine verringerte Aktivität der Atmungskette auch zu einem verringerten Zellmetabolismus und damit einer herabgesetzten Proliferation führt, erscheint diese Schlussfolgerung jedoch legitim und *CellTiterBlue* ist als geeignete Methode, um Zellzahlen zu vergleichen, anzusehen.

Darüber hinaus konnte bewiesen werden, dass mittels *CellTiterBlue* insbesondere auch eine lineare Zellzahlbestimmung möglich ist. Dazu wurde der DNA-Gehalt als konstanter Marker der Zellzahl mit *CellTiterBlue*-Signalen definierter Zellzahlen verglichen. Sowohl der DNA-Gehalt der Proben als auch die *CellTiterBlue*-Messung zeigen eine gute Linearität der Messwerte mit einem R² von 0,977 für die DNA-Messung und einem R² von 0,993 für die *CellTiterBlue*-Messung (vgl. Abbildung 11).

Weiterhin ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu beachten, dass die einzelnen Versuchslösungen Schwankungen im Bereich der CO₂-Konzentration aufgewiesen haben können, da die verwendeten CO₂-Lösungen vor jedem Versuch frisch angesetzt wurden.

*Carbothera*TM K104 ist weder ein Labor- noch ein Medizinprodukt und damit nicht den üblichen Qualitätsstandards bezüglich der Reproduzierbarkeit verpflichtet.

Jedoch gab es während der Versuchsdurchführung weder objektiv noch subjektiv Hinweise, dass es größere Schwankungen in der CO₂-Konzentration gegeben haben könnte.

Die Zellen wurden während der Behandlung äußerst wenig bewegt und sind zusätzlich stets abgedeckt gewesen. So sollte das „ausgasende“ CO₂ aufgrund seiner Schwere in der Tiefe der Kulturgefäße „gefangen“ und so die Partialdruckdifferenz zwischen Medium und darüber liegender Gasphase gering gehalten werden.

Darüber hinaus ist *Carbothera*TM K104 nicht dazu konzipiert, sterile Lösungen zu erzeugen. Der sehr einfache Aufbau ermöglichte es jedoch, eine suffiziente antimikrobielle Reinigung durchzuführen. Zur Kontrolle der Sterilität der Versuchsmedien wurden separate Aliquote als „Sterilitätskontrolle“ über die Versuchsdauer hinaus aufbewahrt und auf Kontaminationen hin untersucht.

Aufgrund des stetigen „Ausgasens“ der CO₂-Medien und der fehlenden Möglichkeit, das CO₂-Medium bei Bedarf während der Inkubation wieder aufzukonzentrieren, musste die Oberfläche des CO₂-Mediums während der Versuche möglichst klein gehalten werden. Aus diesem Grund kamen 24-well Platten mit entsprechend kleinem Durchmesser zum Einsatz. Da die vorhandene Kulturfäche nach wenigen Tagen zumeist bereits konfluent war, konnten die Versuche nicht über längere Zeit durchgeführt werden.

In vivo Studien mit CO₂-Bädern hingegen, könnten sich über eine deutlich längere Zeitspanne erstrecken und so zum Beispiel die Auswirkungen täglicher Bäder über mehrere Wochen untersuchen. Auch die tägliche Inkubationsdauer könnte *in vivo* erhöht werden, da die Möglichkeit bestünde, die CO₂-Lösung während des Bades wieder aufzukonzentrieren.

Das größte Hindernis im Transfer der hier erhobenen *in vitro* Daten ist jedoch der fehlende Einfluss des gesamten Gewebekomplexes aus der Cutis und Subcutis. Ein möglicherweise abschirmender und damit konzentrationsmindernder Effekt des Gewebes wurde jedoch durch die Verminderung der Konzentration der verwendeten CO₂-Lösungen simuliert. Die Perfusion unter deren Einfluss die Zellen *in vivo* im Gewebeverband stehen, wurde außer Acht gelassen. Dies bietet

viele Ansatzpunkte für zukünftige, auf den Daten dieser Studie aufbauende Untersuchungen.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden systematisch definierte wundheilungsrelevante Parameter nach Behandlung mit wässriger CO₂-Lösung anhand von drei wichtigen an der Wundheilung beteiligten Zellentitäten untersucht. Die beobachteten Ergebnisse deuteten allesamt auf eine rasche Reaktion der Zellen bei niederschwelliger Behandlung hin. Dabei steht am ehesten eine metabolische Reaktion unter Verdacht, die beobachteten Effekte auszulösen. Ein plausibler und durch Studien bereits gezeigter Wirkmechanismus könnte die negative Beeinflussung der aeroben Glykolyse über die Hemmung der Isocitratdehydrogenase sein. Einen weiteren Ansatzpunkt könnten über HIF-1 α beeinflussbare zelluläre Prozesse darstellen, die ihre Wirkung vor allem im Bereich der Differenzierung von Myofibroblasten und entsprechender α -sma Expression entfalten. Eine Apoptoseinduktion durch Behandlung mit wässrigen kohlenstoffdioxidhaltigen Lösungen konnte durch die hier durchgeführten Untersuchungen hingegen ausgeschlossen werden.

Die CO₂-Behandlung stellt eine kostengünstige und einfach verfügbare Therapiemöglichkeit für chronische Wunden dar. Einige *in vivo* Studien konnten bereits positive Effekte auf die Wundheilung und Perfusionssituation in klinischen Untersuchungen zeigen [42, 49, 75]. In der Regel sind die vorhandenen Studiendesigns jedoch relativ klein; größere systemische Studien sind nicht vorhanden. Im Gegensatz dazu, deuten die hier erhobenen *in vitro* Daten eher auf eine negative Beeinflussung der wundheilungsrelevanten Parameter hin. Dies deckt sich mit dem Großteil der verfügbaren *in vitro* Studien zu diesem Thema. Es sind jedoch weitere Forschungen notwendig, um die genauen Wirkmechanismen der CO₂-Behandlung zu verstehen. Selbst auf systemischer Ebene gibt es noch viele offene Fragen. So ist zwar der vasodilatatorische Effekt von CO₂ lange bekannt und wird in der traditionellen Balneologie angewendet, der gesamte molekulare Mechanismus ist aber noch nicht abschließend geklärt.

Perspektivisch können nun interessante Ergebnisse aus dieser Studie vertieft und weiter untersucht werden.

Noch nicht diskutiert wurde der Aspekt eines möglicherweise antibakteriellen Effektes durch die Azidifizierung des Milieus unter CO₂-Behandlung. Bei CO₂-angereichertem Leitungswasser mit einer Konzentration von 1000 - 1200 mg/l konnte ein pH-Wert von 4,5 gemessen werden [42]. Saure Milieus werden im Körper zur Abtötung von Bakterien genutzt. So besitzen die Magensäure sowie der Urin physiologischerweise einen sauren pH-Wert zu diesem Zweck. Auch die Phagosome von Fresszellen degradieren Mikroorganismen oder apoptotische Zellen durch eine Erniedrigung des pH-Wertes [77]. Bei einer *in vivo* Behandlung von chronischen Wunden könnte ein erniedrigter pH-Wert der CO₂-Lösung möglicherweise antibakterielle Wirkungen im Wundgrund ausüben, dadurch die Wundheilung positiv beeinflussen und somit ein Faktor für die beschriebenen wundheilungsfördernden Effekte von CO₂-Bädern bei chronischen Wunden sein [42]. Hier können weitere Untersuchungen ebenfalls Aufschluss bringen.

Auch auf zellulärer Ebene sind interessante Ansätze vorhanden. Zum Beispiel kann die Inhibition der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten über HIF-1 α weiter untersucht werden. Außerdem stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus eine CO₂-Behandlung die Proliferation der Zellen vermindert. Liegt tatsächlich eine Inhibition des Citratzyklus oder sogar der mitochondrialen Atmungskette vor?

Weiter sollte eine Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Effekte genauer evaluiert werden. Dazu wäre es interessant, in Folgeuntersuchungen die Eindringtiefe von in wässriger Lösung befindlichem CO₂ in die Haut zu messen. Mit geeigneten Methoden könnte ein Konzentrationsgradient von CO₂ in der Cutis nach einem CO₂-Bad bestimmt werden. Dies wäre vor allem im Hinblick auf einen Transfer der hier gezeigten Ergebnisse in die Klinik von großer Bedeutung.

Dabei können auch alternative Herstellungsmethoden für wässrige CO₂-Lösungen getestet und verglichen werden. Eine Abwandlung des Versuchsaufbaus könnte eine CO₂ gefüllte Druckkammer darstellen, in der die Zellen behandelt werden. Dazu wäre es nötig zu verifizieren, ob durch einen solchen Aufbau tatsächlich ausreichend konzentrierte kohlenstoffdioxidhaltige

Medien entstehen können. Sollte dies der Fall sein, bestünde die Möglichkeit, die Gaskonzentration im Medium während des gesamten Versuches konstant zu halten. Außerdem bestünde nicht mehr die Gefahr, die Zellkulturen durch die Inkubation mit einem CO₂-Medium zu kontaminieren, welches in einem externen Gerät hergestellt wurde.

Gerade im Hinblick auf *in vivo* Versuche und die klinische Anwendbarkeit müssen konstante Bedingungen geschaffen werden. Dabei ist das Problem der Hyperkapnie durch erhöhte CO₂-Konzentrationen in der Inspirationsluft nur ein aus der klassischen Balneologie zu beachtendes Problem. Denn abgesehen von den möglichen transkutanen Effekten des Kohlenstoffdioxids auf lokale Gegebenheiten und die Herz-Kreislaufsituation, bestehen auch gesicherte Effekte einer generalisierten Hyperkapnie, wie zum Beispiel die CO₂-Narkose bei erhöhten pCO₂ Werten im Blut.

Kommende Entwicklungen im Bereich der Therapie der hoch relevanten fibrotischen Erkrankungen sind abzuwarten. Möglicherweise können die neu entdeckten Effekte einer CO₂-Behandlung weitere Ansätze für Therapien aktuell nur wenig beeinflussbarer, aber hochrelevanter Krankheiten wie hypertropher Narbenbildung, Leberzirrhose, Lungenfibrose oder fibrotischer Erkrankungen des kardiovaskulären Systems liefern.

5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Schematischer Aufbau der Haut (Integumentum commune)	2
Abbildung 2	Schematische Darstellung der drei Phasen der Wundheilung	5
Abbildung 3	TGF- β Signalwege	10
Abbildung 4	Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten	11
Abbildung 5	Der Bohr-Effekt	18
Abbildung 6	Geschlechts- und Altersverteilung der Hautdonoren.....	31
Abbildung 7	Schematische Darstellung von Carbothera™ K104	45
Abbildung 8	Herstellung von CO ₂ -Medium	46
Abbildung 9	pH-Werte unterschiedlich stark konzentrierter CO ₂ -Medien.....	51
Abbildung 10	DNA-Bestimmung aus behandelten und unbehandelten Zellcontainern	52
Abbildung 11	Linearität der durch <i>CellTiterBlue</i> gemessenen Zellmenge.....	53
Abbildung 12	FACS-Analyse der Apoptoserate	55
Abbildung 13	Fibroblasten 3 h nach CO ₂ -Behandlung (Propidiumiodid/Hoechst 33342 Färbung).....	56
Abbildung 14	Messdiagramme der FACS-Analyse	56
Abbildung 15	Proliferation von Fibroblasten nach täglicher CO ₂ -Behandlung ..	58
Abbildung 16	Proliferation von Fibroblasten nach einmaliger CO ₂ -Behandlung	59
Abbildung 17	Proliferation von Fibroblasten nach täglicher CO ₂ -Behandlung mit verdünnter Lösung	60
Abbildung 18	Proliferation von Keratinozyten nach täglicher CO ₂ -Behandlung	61
Abbildung 19	Proliferation von Keratinozyten nach täglicher CO ₂ -Behandlung mit verdünnter Lösung	62
Abbildung 20	Proliferation von Endothelzellen nach täglicher CO ₂ -Behandlung	62
Abbildung 21	Proliferation von Endothelzellen nach täglicher CO ₂ -Behandlung mit verdünnter Lösung	63
Abbildung 22	Proliferationsraten behandelter und unbehalteter Zellen.....	64
Abbildung 23	Der Einfluss wässriger CO ₂ -Lösungen auf die Migration von Fibroblasten	65
Abbildung 24	Mikroskopische Aufnahmen der Lücken im Zellrasen	66
Abbildung 25	α -sma-Expression nach CO ₂ -Behandlung und TGF- β ₁ -Zugabe	67
Abbildung 26	Angiogenese-Assay	70
Abbildung 27	Darstellung der Signaldifferenz bei CO ₂ -behandelten und unbehandelten Zellen nach Zugabe von <i>CellTiterBlue</i>	71

Tabelle 1	Der Einfluss von wässrigen CO ₂ -Bädern auf verschiedene Kreislaufparameter.....	16
Tabelle 2	Liste der verwendeten Substanzen und Herstellerangaben.....	24
Tabelle 3	Liste der verwendeten Kit-Systeme und Herstellerangaben	24
Tabelle 4	Liste der verwendeten Materialien mit Herstellerangaben	27
Tabelle 5	Liste der verwendeten Geräte mit Herstellerangaben.....	29
Tabelle 6	Antikörper.....	30
Tabelle 7	Liste der verwendeten Software.....	30
Tabelle 8	Zellkulturmedienansätze für verschiedene Zellen und Versuche	33
Tabelle 9	Herstellung des BSA Standards zur quantitativen Proteinbestimmung	40
Tabelle 10	Mediumansatz für Verdünnungsversuche.....	48
Tabelle 11	Qualitative Auswertung des Angiogenese Assay.....	68

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Referenzen

1. Ruttermann, M., et al., *Local treatment of chronic wounds: in patients with peripheral vascular disease, chronic venous insufficiency, and diabetes*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(3): p. 25-31.
2. Demidova-Rice, T.N., M.R. Hamblin, and I.M. Herman, *Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care*. Advances in skin & wound care, 2012. **25**(7): p. 304-314.
3. Cox, T.R. and J.T. Erler, *Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer*. Disease Models & Mechanisms, 2011. **4**(2): p. 165.
4. Zilles, K., *Anatomie* ed. K. Zilles and B.N. Tillmann. 2010, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
5. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie : 10 Tabellen*. 4., vollst. überarb. Aufl. ed, ed. R. Lüllmann-Rauch. 2012, Stuttgart u.a.: Thieme.
6. Snell, J.A., et al., *Clinical review: The critical care management of the burn patient*. Critical Care, 2013. **17**(5): p. 241.
7. Guo, S. and L.A. DiPietro, *Factors Affecting Wound Healing*. Journal of Dental Research, 2010. **89**(3): p. 219-229.
8. Beldon, P., *Basic science of wound healing*. Surgery (Oxford), 2010. **28**(9): p. 409-412.
9. Martin, P., *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 75-81.
10. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
11. Barrientos, S., et al., *PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing*. Wound Repair and Regeneration, 2008. **16**(5): p. 585-601.
12. Coentro, J.Q., et al., *Current and upcoming therapies to modulate skin scarring and fibrosis*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2018.
13. Desmoulière, A., C. Chaponnier, and G. Gabbiani, *Perspective Article: Tissue repair, contraction, and the myofibroblast*. Wound Repair and Regeneration, 2005. **13**(1): p. 7-12.
14. Li, B. and J.H.C. Wang, *Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement*. Journal of Tissue Viability, 2011. **20**(4): p. 108-120.
15. Sorg, H., et al., *Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts*. European Surgical Research, 2017. **58**(1-2): p. 81-94.
16. Rittié, L., et al., *Eccrine Sweat Glands are Major Contributors to Reepithelialization of Human Wounds*. The American Journal of Pathology, 2013. **182**(1): p. 163-171.
17. Darby, I.A., et al., *Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing*. Clinical, cosmetic and investigational dermatology, 2014. **7**: p. 301-311.

18. Baisch, A. and F. Riedel, [*Hyperplastic scars and keloids. Part I: basics and prevention*]. HNO, 2006. **54**(11): p. 893-904; quiz 905.
19. Xing, Z., et al., *Overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces pulmonary granulation tissue formation and fibrosis by induction of transforming growth factor-beta 1 and myofibroblast accumulation*. The American Journal of Pathology, 1997. **150**(1): p. 59-66.
20. Carthy, J.M., *TGFbeta signaling and the control of myofibroblast differentiation: Implications for chronic inflammatory disorders*. J Cell Physiol, 2018. **233**(1): p. 98-106.
21. ten Dijke, P. and H.M. Arthur, *Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2007. **8**(11): p. 857-869.
22. Feng, X.-H. and R. Derynck, *SPECIFICITY AND VERSATILITY IN TGF- β SIGNALING THROUGH SMADS*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005. **21**(1): p. 659-693.
23. Choi, E.-K., et al., *Regulation of RhoA GTPase and novel target proteins for ROCK*. Small GTPases, 2017: p. 1-8.
24. Cannito, S., E. Novo, and M. Parola, *Therapeutic pro-fibrogenic signaling pathways in fibroblasts*. Adv Drug Deliv Rev, 2017. **121**: p. 57-84.
25. Hu, Y., et al., *Role of extracellular signal-regulated kinase, p38 kinase, and activator protein-1 in transforming growth factor-beta1-induced alpha smooth muscle actin expression in human fetal lung fibroblasts in vitro*. Lung, 2006. **184**(1): p. 33-42.
26. Meyer-Ter-Vehn, T., et al., *p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts*. Investigative ophthalmology & visual science, 2006. **47**(4): p. 1500-1509.
27. Gabbiani, G., *The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*. The Journal of Pathology, 2003. **200**(4): p. 500-503.
28. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
29. Dugina, V., et al., *Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors*. Journal of Cell Science, 2001. **114**(18): p. 3285.
30. Desmoulière, A., et al., *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*. The American journal of pathology, 1995. **146**(1): p. 56-66.
31. Hinz, B., *Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair*. Journal of Investigative Dermatology, 2007. **127**(3): p. 526-537.
32. Jun, J.-I. and L.F. Lau, *Resolution of organ fibrosis*. The Journal of clinical investigation, 2018. **128**(1): p. 97-107.
33. Bao, P., et al., *The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing*. Journal of Surgical Research, 2009. **153**(2): p. 347-358.
34. S3-Leitlinie, *Lokaltherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz*. 2012, Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. .
35. Han, G. and R. Ceilley, *Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments*. Advances in Therapy, 2017. **34**(3): p. 599-610.

36. Jaffe, L. and S. Wu, *The Role of Nutrition in Chronic Wound Care Management*. Podiatry management. The diabeticfoot, 2017. **36**(9): p. 77-82.
37. Powers, J.G., et al., *Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2016. **74**(4): p. 607-625.
38. Nather, A., et al., *Effectiveness of vacuum-assisted closure (VAC) therapy in the healing of chronic diabetic foot ulcers*. Annals Academy of Medicine Singapore, 2010. **39**(5): p. 353.
39. Bollong, M.J., et al., *Small molecule-mediated inhibition of myofibroblast transdifferentiation for the treatment of fibrosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017. **114**(18): p. 4679-4684.
40. Gutenbrunner, C. and G. Hildebrandt, *Handbuch der Balneologie und medizinischen Klimatologie*. 1998: Springer.
41. Hobiger, G., *Kohlendioxid in Wasser mit Alkalinität : Berechnung und grafische Darstellung der chemischen Gleichgewichte [Elektronische Ressource]*, ed. G. Hobiger. 2015, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
42. Hayashi, H., et al., *Immersing Feet in Carbon Dioxide-enriched Water Prevents Expansion and Formation of Ischemic Ulcers after Surgical Revascularization in Diabetic Patients with Critical Limb Ischemia*. Ann Vasc Dis, 2008. **1**(2): p. 111-7.
43. Kalinowski, R. *Welcher technische Aufwand ist beim Karbonisieren wirtschaftlich?* Januar 2020; Available from: https://www.sachverstand-gutachten.de/veroeffentlichungen/veroeffentlichungen_branchenuebergreifend_karbonisierung.html.
44. Pape, H.-C., *Physiologie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed, ed. H.-C. Pape, et al. 2019, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
45. Brandes, R., *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie*, ed. R. Brandes, F. Lang, and R.F. Schmidt. 2019, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
46. Durand, M.J. and D.D. Gutterman, *Diversity in Mechanisms of Endothelium-Dependent Vasodilation in Health and Disease*. Microcirculation, 2013. **20**(3): p. 239-247.
47. Heintz, A., T. Koch, and A. Deussen, *Intact nitric oxide production is obligatory for the sustained flow response during hypercapnic acidosis in guinea pig heart*. Cardiovascular Research, 2005. **66**(1): p. 55-63.
48. Battisti-Charbonney, A., J. Fisher, and J. Duffin, *The cerebrovascular response to carbon dioxide in humans*. The Journal of physiology, 2011. **589**(Pt 12): p. 3039-3048.
49. Fabry, R., et al., *Clinical and microcirculatory effects of transcutaneous CO₂ therapy in intermittent claudication. Randomized double-blind clinical trial with a parallel design*. Vasa, 2009. **38**(3): p. 213-24.
50. Finzgar, M., Z. Melik, and K. Cankar, *Effect of transcutaneous application of gaseous carbon dioxide on cutaneous microcirculation*. Clin Hemorheol Microcirc, 2015. **60**(4): p. 423-35.
51. Fathi, A.R., et al., *Carbon dioxide influence on nitric oxide production in endothelial cells and astrocytes: cellular mechanisms*. Brain research, 2011. **1386**: p. 50-57.

52. Cevese, A., *Coronary circulation: Nitric oxide and hypercapnic acidosis*. Cardiovascular Research, 2005. **66**(1): p. 7-8.
53. Hashimoto, M. and N. Yamamoto, *Decrease in heart rates by artificial CO₂ hot spring bathing is inhibited by beta1-adrenoceptor blockade in anesthetized rats*. J Appl Physiol (1985), 2004. **96**(1): p. 226-32.
54. Productsheet, EA.hy926. American Type Culture Collection® CRL2922™.
55. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. Journal of Immunological Methods, 1991. **139**(2): p. 271-279.
56. Ellwart, J.W. and P. Dörmer, *Vitality measurement using spectrum shift in Hoechst 33342 stained cells*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 239-243.
57. Schmid, I., C. Uittenbogaart, and B.D. Jamieson, *Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D*. Nature Protocols, 2007. **2**(1): p. 187-190.
58. Riccardi, C. and I. Nicoletti, *Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1458-61.
59. Caballero-Benitez, A. and J. Moran, *Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2*. J Neurosci Res, 2003. **71**(3): p. 383-96.
60. Wiechelman, K.J., R.D. Braun, and J.D. Fitzpatrick, *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation*. Anal Biochem, 1988. **175**(1): p. 231-7.
61. Peters, J. and G. Spicher, *Zur Eignung von Natriumhypochlorid und Chloramin T für die Flächendesinfektion*, in Bundesgesundheitsblatt Sept. 1988,31(9). 1988. p. 330-336.
62. Akatov, V.S., et al., *Low pH value of pericellular medium as a factor limiting cell proliferation in dense cultures*. Experimental Cell Research, 1985. **160**(2): p. 412-418.
63. Morgunova, G.V., et al., *Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells*. Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2017. **72**(2): p. 47-51.
64. Teixeira, J., et al., *Extracellular acidification induces ROS- and mPTP-mediated death in HEK293 cells*. Redox Biology, 2018. **15**: p. 394-404.
65. Pasparakis, M. and P. Vandenabeele, *Necroptosis and its role in inflammation*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 311-320.
66. Vohwinkel, C.U., et al., *Elevated CO₂ levels cause mitochondrial dysfunction and impair cell proliferation*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(43): p. 37067-37076.
67. Shevchenko, M.I., D.A. Mel'nichuk, and A.V. Romanenko, *[Effect of carbon dioxide on the initial rate of the isocitrate and malate dehydrogenase reactions in rat liver]*. Ukr Biokhim Zh (1978), 1979. **51**(1): p. 53-5.
68. Rampersad, S.N., *Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays*. Sensors, 2012. **12**(9).
69. Leinhos, L., et al., *Hypoxia suppresses myofibroblast differentiation by changing RhoA activity*. Journal of Cell Science, 2019. **132**(5): p. jcs223230.
70. Hong, W.X., et al., *The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing*. Advances in wound care, 2014. **3**(5): p. 390-399.

71. Benderro, G.F., et al., *Increased HIF-1 α and HIF-2 α accumulation, but decreased microvascular density, in chronic hyperoxia and hypercapnia in the mouse cerebral cortex*. *Advances in experimental medicine and biology*, 2013. **789**: p. 29-35.
72. Kulikov, V.P., et al., *Hypercapnia--alternative hypoxia signal incentives to increase HIF-1 α and erythropoietin in the brain*. *Patologicheskaia fiziologiiia i eksperimental'naia terapiia*, 2015(3): p. 34-37.
73. NÉMETH, B., et al., *Transcutaneous Carbon Dioxide Treatment Is Capable of Reducing Peripheral Vascular Resistance in Hypertensive Patients*. *In Vivo*, 2018. **32**(6): p. 1555-1559.
74. Gurevicius, J., et al., *Contribution of nitric oxide to coronary vasodilation during hypercapnic acidosis*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1995. **268**(1): p. H39-H47.
75. Irie, H., et al., *Carbon dioxide-rich water bathing enhances collateral blood flow in ischemic hindlimb via mobilization of endothelial progenitor cells and activation of NO-cGMP system*. *Circulation*, 2005. **111**(12): p. 1523-9.
76. Sakai, Y., et al., *A novel system for transcutaneous application of carbon dioxide causing an "artificial Bohr effect" in the human body*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e24137.
77. Kinchen, J.M. and K.S. Ravichandran, *Phagosome maturation: going through the acid test*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008. **9**(10): p. 781-795.

Danksagung

Ich möchte Herrn Professor Christoph Suschek ganz herzlich für die Überlassung dieser Arbeit danken. Du hattest immer ein offenes Ohr und gute Ratschläge für mich und Dein grenzenloser Optimismus hat mich über so manchen Zweifel hinwegsehen lassen.

Besonderer Dank gilt auch Christa, Jutta und Samira. Ihr habt mich mit Eurer herzlichen Art nicht nur mit den nötigen Fähigkeiten für die Tätigkeit im Labor ausgestattet, sondern hattet auch immer eine Lösung für jedes auftretende Problem.

Dem gesamten Laborteam möchte ich danken, denn Ihr habt dazu beigetragen, dass die häufig langwierige und zum Teil auch frustrierende Arbeit doch immer von guter Laune und Freude geprägt war.

Lea möchte ich danken während der ganzen Zeit an meiner Seite gestanden zu haben. Du hast mir die nötige Ablenkung geliefert und mich stets motiviert weiterzumachen.

Abschließend möchte ich besonders meinen Eltern danken, denn Ihr habt all das, sowohl mein Studium als auch diese Promotion, durch Eure bedingungslose Unterstützung erst möglich gemacht.