

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Forschungsleiter Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Charakterisierung der Rolle von GDF-5 in der Wundheilung von
Verbrennungswunden anhand eines *ex vivo*-Verbrennungsmodells der
menschlichen Haut

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizin

vorgelegt von
Clara Maria Oprisch

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Zusammenfassung (deutsch)

Verbrennungswunden können nicht nur vital bedrohlich sein, sondern das Leben der Betroffenen durch Narbenbildung und folgender Stigmatisierung beeinträchtigen. Derzeitige Behandlungsoptionen sind begrenzt. Ein applizierbares Medikament zur Beschleunigung der Heilung von Verbrennungswunden wird dringend gesucht. Der *Growth Differentiation Factor 5* (GDF-5) wirkt positiv auf die wichtigsten Schritte der kutanen Wundheilung: Angiogenese, Fibroblastenproliferation und Reepithelialisierung. In dieser Arbeit wurde sein Effekt auf die Wundheilung in Verbrennungswunden humaner Haut untersucht. Hierfür wurde ein *ex vivo* Modell, welches exzidiertes Hautgewebe aus dem Operationssaal nutzte, etabliert. Mit einem auf 90 °C im Wasserbad erhitzten Kupferstempel wurden Verbrennungswunden auf die Kutis gesetzt. Anschließend wurden diese ausgestanzt und in einem Medium, dem entweder 1µg/mL, 5µg/mL oder kein GDF-5 beigefügt wurde, in Gewebekultur vital gehalten. Außerdem wurde jeweils eine Stanze nicht verbrannter Haut ohne GDF-5-Zusatz im Versuch mit charakterisiert. Nach 6 Stunden, 24 Stunden, 3 Tagen, 6 Tagen, 9 Tagen, 11 Tagen und 12 Tagen Gewebekultur wurden aus den Stanzen der vier Behandlungen histologische Schnitte gefertigt. Anschließend wurde zur Charakterisierung der oben genannten wichtigsten Parameter der Wundheilung eine immunhistochemische Analyse der Expression der Schlüsselmarker durchgeführt. Als Proliferationsmarker wurde die Expression von KI-67, als Angiogenesemarker die Expression von CD-31, als Differenzierungsmarker der Keratinozyten Involucrin und als Myofibrogenesemarker die Expression von α -SMA visualisiert und quantifiziert. Insgesamt wurden 1590 Präparate angefertigt, analysiert und ausgewertet. Ein individuelles *Macro* für das Auswertungsprogramm Fiji wurde erstellt, welches automatisiert die gefärbte Fläche pro Gesamtfläche der immunhistochemischen Färbungen sowie zusätzlich die Anzahl der mit CD-31 gefärbten Gefäße berechnete. Der Auswertung der KI-67-Antikörperfärbung wurde ein *Macro* zur Exklusion der regelhaft vorkommenden falsch positiven Färbungen im Bereich der Verbrennung vorgeschaltet. Für jede Behandlung und jede Antikörperfärbung wurde ermittelt, ob es statistisch signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf gab und ob es für jeden Zeitpunkt und jede Antikörperfärbung Unterschiede zwischen den Behandlungen gab. Es konnte beobachtet werden, dass in den 6 Stunden- sowie 6 Tage-Proben eine größere markierte Gefäßfläche und in den 6 Tage-Proben zudem eine höhere Anzahl an Gefäßen in der verbrannten als in der nicht verbrannten Haut vorhanden waren, was auf einen aktiven Angiogenesevorgang hindeutet. In den 12 Tage-Proben zeigte sich eine größere Gefäßfläche in der unbehandelten Haut als in der mit 5µg/mL GDF-5-behandelten Haut. GDF-5 förderte demnach die Angiogenese nicht. In den 12 Tage-Proben konnten zudem mehr proliferierende Zellen in der verbrannten, unbehandelten Haut als in den Vergleichsgruppen beobachtet werden. Bezüglich der Myofibrogenese war in den unbehandelten 6 Stunden-Probe der verbrannten Haut die α -SMA-Expression signifikant höher als in den zusätzlich mit 5µg/mL GDF-5 behandelten Präparaten. Insgesamt scheint die Vitalerhaltung des Gewebes geglückt zu sein und Angiogenese als wichtiger Teil der Wundheilung nach thermischem Schaden stattgefunden zu haben. GDF-5 hatte jedoch keinen positiven Effekt auf die untersuchten Parameter. Trotz methodischer Hindernisse bei der Bewältigung der hohen Zahl der auszuwertenden Präparate kann festgehalten werden, dass das hier etablierte Modell die Beobachtung der Wundheilung zulässt. Der Versuchsaufbau und auch die computergestützte Auswertung garantierten eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie Objektivität der Analyseverfahren. Eine Übertragbarkeit auf die beobachtete Wirkung therapeutischer Substanzen im *in vivo* Modell ist allerdings fraglich.

Zusammenfassung (englisch)

Burn wounds are not only a vital threat, but also affect the patient's quality of life because of scar formation and following stigmatization. Current treatment options are limited. An applicable drug to accelerate the healing of burn wounds is urgently needed. Growth differentiation factor 5 (GDF-5) was demonstrated to have positive effects on the key steps of cutaneous wound healing: angiogenesis, fibroblast proliferation, and re-epithelialization. Here we investigated its effect on accelerating the wound healing in burn wounds of human skin. For this purpose, an *ex vivo* model using excised skin tissue from the operating room was established. Burn wounds were placed on the cutis with a copper stamp heated up to 90 °C. These were then cut out and kept alive in tissue culture in medium to which either 1 µg/mL, 5 µg/mL, or no GDF-5 was added. In addition, one punch of unburned skin without added GDF-5 was also characterized in each experiment. After 6 hours, 24 hours, 3 days, 6 days, 9 days, 11 days, and 12 days of tissue culture, histological sections were prepared from the skin sample cuttings of the four treatments. Subsequently, immunohistochemical analysis of the markers that characterize the expression of the described key parameters of wound healing was performed. The expression of KI-67 was visualized and quantified as a proliferation marker, CD-31 as an angiogenesis marker, involucrin as a keratinocyte differentiation marker, and α -SMA as a myofibrogenesis marker. A total of 1590 slides were prepared, analyzed, and evaluated. An individual macro for the Fiji evaluation program which automatically calculated the stained area per total area of immunohistochemical staining and additionally the number of vessels stained with CD-31 was created. Prior to this step an individual macro for the KI-67 antibody staining was created to exclude the regularly occurring false positive staining in the area of the burn lesion. For each treatment and antibody staining, it was determined whether there were statistically significant differences over time and whether there were differences between the treatments for each time and each antibody staining. It was observed that in the 6-hour as well as 6-day samples, there was a larger labeled vessel area, and in the 6-day samples, there was also a higher number of vessels in the burned than in the unburned skin, indicating an active angiogenesis process. In the 12-day samples, there was a greater vascular area in the untreated skin than in the skin treated with 5 µg/mL GDF-5. Thus, it was demonstrated that GDF-5 did not promote angiogenesis. In the 12-day samples, more proliferating cells were observed in the burned untreated skin, than in the comparison groups. Regarding myofibrogenesis, α -SMA expression was significantly higher in the untreated 6-hour burned skin sample than in the preparations additionally treated with 5 µg/mL GDF-5. Overall, tissue viability maintenance appears to have been successful and angiogenesis to have occurred as an important part of wound healing after thermal damage. However, GDF-5 had no positive effect on the parameters studied. Despite the difficulties of this methodology, that requires a large number of histological samples to be evaluated, it was demonstrated that the model established here allows the observation of wound healing. The experimental set-up and the computer-assisted evaluation ensured a high reproducibility of the results as well as objectivity of the analysis method. However, transferability of the observed effect of therapeutic substances to the *in vivo* model is questionable.

Abkürzungsverzeichnis

-GDF-5:	GDF-5 wurde dem Medium nicht beigefügt
+GDF-5:	GDF-5 wurde dem Medium beigefügt
Abb.:	Abbildung
ANOVA:	Analysis of Variance
Aqua dest.:	Aqua destillata
BMP:	Bone Morphogenetic Protein
BSA:	Bovine serum albumin
CaCl:	Calciumchlorid
CD31/PECAM-1:	Platelet Endothelial Cell adhesion molecule-1
CDMP-1:	Cartilage-derived Morphogenetic Protein-1
CSF:	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
DAB:	3,3'-diaminobenzidin
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA:	deoxyribonucleic acid
DNase:	Desoxyribonuklease
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF:	Epidermal Growth Factor
FCS:	fetal calf serum
FDR:	False Discovery Rate
FWE:	Family Wise Error
FGF- β /bFGF:	Fibroblast Growth Factor
GDF-5:	Growth Differentiation Factor 5
GDF:	Growth Differentiation Factor
Gll.:	Glandulae
GS-Domäne:	Glycin und Serin reiche Domäne
H ₂ O:	Wasser
HE-Färbung:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF:	hypoxie-inducible factor
K:	Kontrolle
kDA:	kilo Dalton
MgCl:	Magnesiumchlorid
M.:	Musculus
mM:	Millimolar
MP52:	Morphogenic protein 52
MW:	Mittelwert
NaCl:	Natriumchlorid
NO:	Stickstoffmonoxid
PAF:	platelet activating factor
PBS:	Phosphate buffered saline
PCNA:	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PCR:	polymerase chain reaction
PDGF:	platelet derived growth factor
Pep-Strep:	Penicillin/Streptomycin
rhBMP:	recombinant human Bone Morphogenetic Protein
rhGDF 5	recombinant human Growth and Differentiation Factor 5
RNA:	ribonucleic acid
rpm (zentrifuge):	rounds per minute
SSC:	saline sodium citrate
Stabw.	Standardabweichung

TGF β :..... Transforming Growth Factor β
TNF- α : Tumornekrosefaktor-alpha
Tris HCL: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VKOF/KOF- Prozent: Verbrannte Körperoberfläche
vWF: von-Willebrand-Faktor
XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis
 α -SMA: Alpha-Smooth muscle actin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau der Haut.....	1
1.2	Wundheilung.....	7
1.3	Verbrennungen.....	11
1.4	Wachstumsfaktoren und Wundheilung.....	16
1.4.1	Die TGF- β Superfamilie.....	17
1.5	Herleitung der Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	21
2	Methodik:	21
2.1	Erzeugung der Gewebeproben.....	21
2.1.1	Herkunft der Gewebeproben	21
2.1.2	Vorbereitung Hautlappen	22
2.1.3	Mediumhaltung und Einbettung	26
2.1.4	Schneiden des Gewebes.....	27
2.2	Durchführung der immunhistochemischen Färbungen:.....	27
2.2.1	Vorbereitung der Präparate für die Färbungen:.....	27
2.2.2	Färbung der Schnitte.....	28
2.3	Digitalisierung und Auswertung der Präparate.....	30
2.3.1	Digitalisierung der Präparate	30
2.3.2	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	30
2.3.3	Statistische Analyse der Ergebnisse	33
2.4	Andere Verfahren.....	37
2.4.1	HE-Färbung	37
2.4.2	Masson-Goldner-Färbung.....	37
2.4.3	PCR.....	38
2.4.4	TUNEL	39
2.5	Verwendete Antikörper.....	41
3	Materialien	42
4	Ergebnisse	47
4.1	Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen.....	47
4.1.1	CD-31-Antikörperfärbung	53
4.1.2	KI-67-Antikörperfärbung	55
4.1.3	α -SMA-Antikörperfärbung.....	58
4.1.4	Involucrin-Antikörperfärbung	60
4.2	Quantitative Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen.....	62
4.2.1	CD-31-Antikörperfärbung Fläche	62
4.2.2	CD-31-Antikörperfärbung Anzahl:	66
4.2.3	Involucrin-Antikörperfärbung	70

4.2.4	KI-67-Antikörperfärbung	70
4.2.5	α -SMA-Antikörperfärbung.....	71
4.2.6	Ergebnisse im zeitlichen Verlauf.....	73
4.3	Auswertung alternativer Verfahren.....	77
5	Diskussion	78
5.1	Immunhistochemische Färbungen	80
5.1.1	CD-31	80
5.1.2	Involucrin.....	85
5.1.3	KI-67.....	86
5.1.4	α -SMA	87
5.1.5	Zusammenfassung	88
5.2	Das Phänomen des Nachbrennens	88
5.3	Beurteilung der Einbettungs- und Auswertungsmethodik	89
5.4	Limitationen.....	92
5.5	Zusammenfassung und Aussicht.....	96
6	Literatur	99
7	Anhang	116

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist mit einem Anteil von 15% am Gesamtkörpergewicht des Erwachsenen und mit einer Fläche von bis zu 2qm das größte Organ des Körpers [7, 8, 13]. Ihre Funktionen sind vielseitig. Neben mechanischem, thermischem, mikrobiellem und chemisch-toxischem Schutz erfüllt sie diese in der Verhinderung von Wasserverlust und Schädigung durch Strahlen, macht einen wesentlichen Teil der Thermoregulation aus, dient der Sinneswahrnehmung sowie der immunologischen Überwachung und ist an der Entstehung von Vitamin D beteiligt [4, 13]. Je nach Körperregion und damit auch Funktion findet man Unterschiede der Morphologie der Haut, was sich in der Dicke, aber auch in der Verteilung und Ausprägung der Hautanhangsgebilde und anderer Hautbestandteile widerspiegelt [14]. Man unterscheidet die haarlose Leistenhaut der Handflächen und Fußsohlen von der Felderhaut, die den restlichen Körper auskleidet [13]. Die Haut gliedert sich in Epidermis (Oberhaut), Dermis (Korium/Lederhaut) und Hypodermis (Unterhaut), welche Faszien aufliegt und anatomisch streng genommen nicht mehr zur Kutis gezählt wird [7, 8, 13, 14] (siehe Abb. 3). Darüber hinaus bilden Haare, Nägel und Drüsen die Hautanhangsgebilde (Adnexorgane) [13]. Die Epidermis besteht aus verschiedenen Zelltypen. 90-95% derer machen Keratinozyten aus, wohingegen lediglich 5-10% andere, symbiontische Zelltypen darstellen [8, 14]. Die Dermis hingegen besteht aus Kollagenen und elastischen Fasern, Blutgefäßen, freien Nervenendigungen und Rezeptorstrukturen [13]. Die Epidermis bildet die unmittelbare Oberfläche zur Außenwelt [8]. Ihre Schichten werden durch die Differenzierungsstadien der Zellen definiert [8, 13]. Diese beinhalten das Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und das Stratum corneum [8] (siehe Abb. 1).

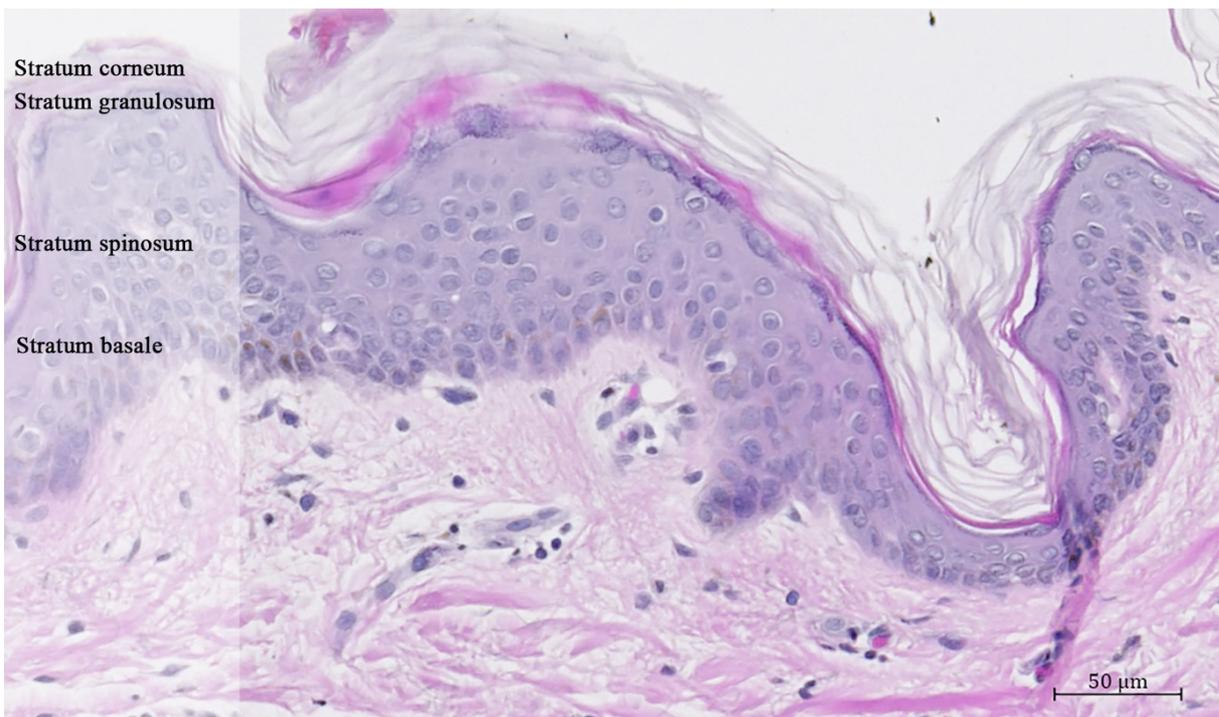


Abb. 1: Schichten der Epidermis

Abb. 1: Schichten der Epidermis am Beispiel der Kontrolle nach 24 Stunden der Haut des Spenders B; Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

Dabei durchlaufen die Keratinozyten in ihrem vierwöchigen Leben eine Transformation von postmitotischen Zellen in den basalen Schichten bis hin zu kernlosen, verhornten Zellen in den obersten Schichten des Epithels [13]. An der Oberfläche angekommen, wird Zelle für Zelle abgeschilfert [13, 14]. Die Mitoserate nativer Epidermis beträgt unter einem Prozent [14]. Die Teilung erfolgt asymmetrisch [14]. Keratinozyten produzieren Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und antimikrobielle Peptide, die die Haut vor schädlichen Mikroorganismen schützen [14]. In der Leistenhaut findet sich zusätzlich das Stratum lucidum, das sich zwischen dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum befindet [8, 13]. Die untere Grenze der Epidermis wird von einer welligen und sägezahnförmigen Basalmembran gebildet [13, 14].

Die Zellen des einschichtigen Stratum basale haben eine kubische, hochprismatische oder zylindrische Morphologie sowie einen großen Nucleus [8, 13, 14]. Hier finden sich Stammzellen und Zellen, die den Zellzyklus durchlaufen und dabei Proliferationsantigene präsentieren, darunter KI-67 und PCNA (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) [8]. KI-67 gilt als Proliferationsmarker, der durch die Darstellung der Zelldynamik gut für die Evaluation von Wundheilung genutzt werden kann [15, 16].

Das Stratum spinosum, die Stachelzellschicht, besteht aus mehreren Schichten Keratinozyten [8, 13]. Die Zellen sind größer als die der unteren Schicht, polygonal geformt und enthalten eosinophiles Zytoplasma [8]. Zellteilung ist hier möglich, findet aber nur unter besonderen Bedingungen, wie im Rahmen der Wundheilung, statt [13, 14].

Das Stratum granulosum (Körnerschicht) ist ein bis drei Zellschichten dick [13, 14]. Die Zellen sind flacher, verlaufen parallel zur Hautoberfläche und enthalten basophile, granuläre Keratohyalinkörper [8, 13, 14].

Das nur in der Leistenhaut befindliche Stratum lucidum ist eine eosinophile Zellschicht, die den Übergang von lebenden und toten Zellen markiert [13]. Hier gehen die Zellen durch eine besondere Form der Apoptose (*Cornification*) zugrunde [13].

Das Stratum corneum (Hornschrift) wird aus Keratinozyten gebildet, die ihren Kern sowie ihre Zellorganellen verloren haben und als Corneozyten bezeichnet werden [8, 13]. Sie bilden einen Schutz gegen die Außenwelt [13]. Die verhornte Hülle dieser Zellen, auch als *cornified Envelope* bezeichnet, besteht aus Proteinen, darunter Involucrin und Lipiden [8, 14]. Sie gilt als Verdichtung des inneren Anteils der Zellmembran [8, 14]. Um sie legt sich eine Schicht aus Lipiden [14]. Die Hornschicht trägt die Barrierefunktion der Haut und ist wasserundurchlässig [14].

Wie bereits erwähnt, findet man neben den Keratinozyten noch weitere, symbiotische Zellen [8]. Langerhanszellen dienen der Immunabwehr [8, 13]. Melanozyten sorgen für Pigmentierung und Schutz vor UV-Strahlen [8, 13, 14]. Ihre Regeneration nach Trauma dauert lange, was die Depigmentierung von Narbengewebe erklärt [14]. Merkelzellen scheinen Mechanorezeptoren zu sein, erfüllen

gegebenenfalls aber auch immunologische Funktion [13, 14]. Darüber hinaus kommen vereinzelt Lymphozyten vor [8, 13].

Drüsen stellen einen Teil der Hautadnexe dar [8]. Es existieren ekkrine Schweißdrüsen, apokrine Duftdrüsen und holokrine Talgdrüsen [8, 13].

Ekkrine Schweißdrüsen sind auf dem gesamten Integument zu finden und tragen thermoregulatorische Funktion [8, 13, 14]. Apokrine Duftdrüsen sind auf menschlicher Haut dagegen selten [8, 13]. Mit ihrem Sekret, das pheromonartige Wirkung hat, scheinen sie eine Rolle für das Reproduktionsverhalten zu spielen [8, 13, 14]. Daneben existieren apoekkrine Schweißdrüsen mit bislang unbekannter Funktion [14].

Holokrine Talgdrüsen (*Gll. Sebaceae*) findet man überall auf der Haut [13, 14]. Ihre Gänge münden meist in Haartrichtern [13]. Sie haben kein Lumen [13]. Auch Myoepithelzellen sind hier nicht zu finden. Sie gehen im Sinne einer holokrinen Sekretion unter.

Ein weiteres Hautanhangsgebilde stellen Haare dar, die außer an den Handflächen, den Fußsohlen und Teilen der Genitalien am gesamten Körper zu finden sind [8, 13]. Es handelt sich hierbei um pigmentierte Keratinfäden [14]. Als trichale Einheit bezeichnet man das System aus Haaren, Haarfollikel, Talgdrüsen, Duftdrüsen und *M. arrector pili* [13].

Die Haarfollikel- und Talgdrüseneinheit reicht bis in die Hypodermis [8].

Das von außen sichtbare Haar wird auch als Haarschaft bezeichnet [13]. Das Haar ist über den Haarfollikel, einer Einstülpung in die Epidermis, in der Haut verankert [13, 14]. Der Haarbulbus umschließt die stark vaskularisierte dermale Papille, die auch die Fibroblasten zur Proliferation der Matrix enthält [13]. Die Matrix schließt sich ihr an und bildet den unteren Teil des Haarbulbus [13]. Hier sind die Zellen teilungsfähig [13]. Die innere Hülle des Haares wird durch die innere epitheliale Wurzelscheide gebildet [13]. Unter der Einmündung der Talgdrüsen wirft die äußere epitheliale Wurzelscheide einen Wulst auf, der Stammzellen der Keratinozyten enthält und den Ansatz des *M. arrector pili* bildet [13]. Diese Stammzellen können bei Traumata auch zur interfollikulären Proliferation beitragen [14]. Die äußere Begrenzung des Haarfollikels wird durch den Haarbalg gebildet [13].

Die Dermis enthält das vaskuläre und nervale System der Haut [8]. Sie besteht aus Zellen, wie Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen, fibrösen Molekülen und einer extrafibrillären Matrix, früher Grundsubstanz [8, 13, 14]. Diese Schicht dient neben der Speicherung von Wasser auch dem Schutz vor Verletzungen [13]. Ein Großteil der dermalen elastischen Fasern, und damit dreiviertel des Trockengewichts der Dermis, wird vom Kollagen gebildet [8, 14]. Es ermöglicht die Reißfestigkeit der Haut [14]. Diese fibrillären Proteine werden zum Großteil von Fibroblasten, manche Typen aber auch von Keratinozyten und Endothelzellen, produziert [14].

Die Dermis unterteilt sich in die papilläre, oberflächliche und die retikuläre Dermis [8] (siehe Abb. 2). Die papilläre Dermis besteht aus dünnen elastischen Fasern und losen Kollagenbündeln [8, 13]. Darüber hinaus enthält sie Nerven- und Gefäßendigungen, darunter viele Blutkapillaren zur Ernährung der Epidermis [8, 13]. Den zellulären Anteil machen vor allem Fibroblasten, dermale dendritische Zellen und Mastzellen aus [8, 14].

Unter der papillären liegt die retikuläre Dermis, deren elastische Elemente dicker sind [8]. Diese Schicht gewährleistet zu großen Teilen die Elastizität und Reißfestigkeit der Haut [14].

Neben Fasern und dermalen Zellen besteht die Dermis aus der extrafibrillären Matrix, früher „Grundsubstanz“, die von Glykoproteinen und Proteoglykanen gebildet wird [8, 14]. Es bildet die Füllsubstanz der Dermis und der Subkutis [14]. In der Dermis erfüllt sie die Funktion der Elastizität, Hämostase, Differenzierung, Wundheilung Zellmigration und bildet den Hautturgor [14].

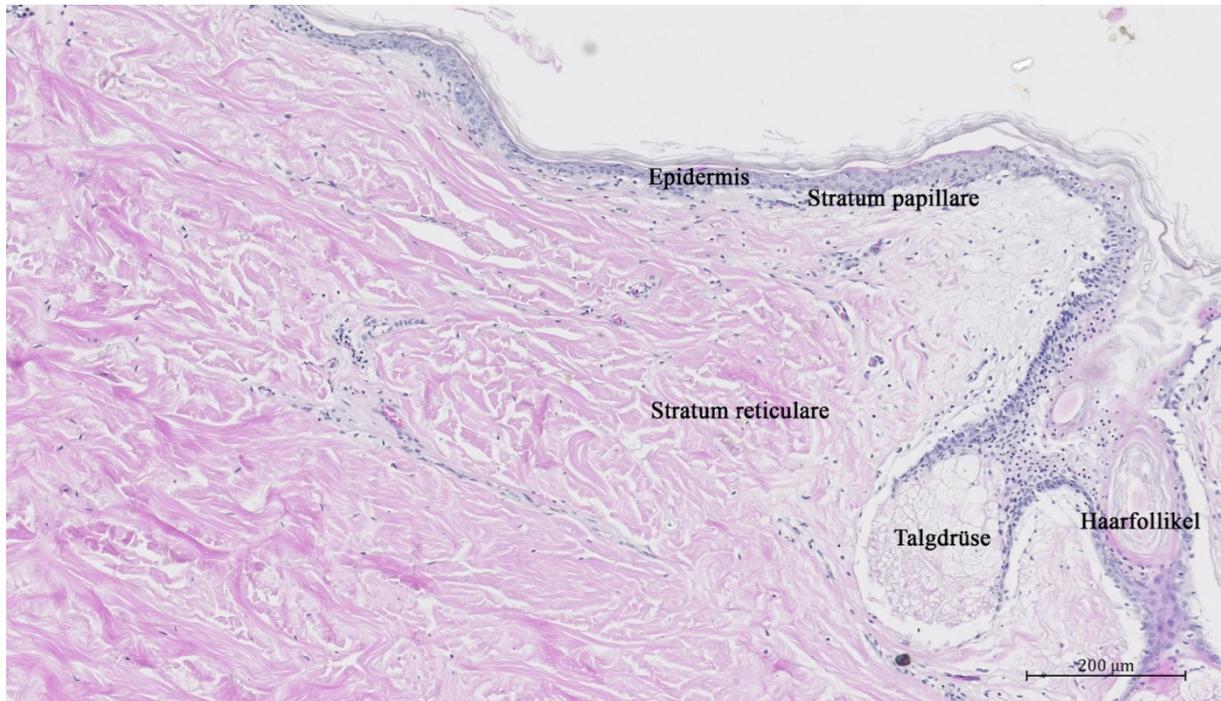


Abb. 2: Schichten der Haut

Abb. 2: Abgebildet sind die Schichten der Haut am Beispiel der Kontrolle nach 9 Tagen der Haut des Spenders A. Sichtbar sind die Epidermis sowie die Schichten der Dermis (Stratum papillare und Stratum reticulare). Im rechten Bildrand sind ein Haarfollikel und eine Talgdrüse zu sehen. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

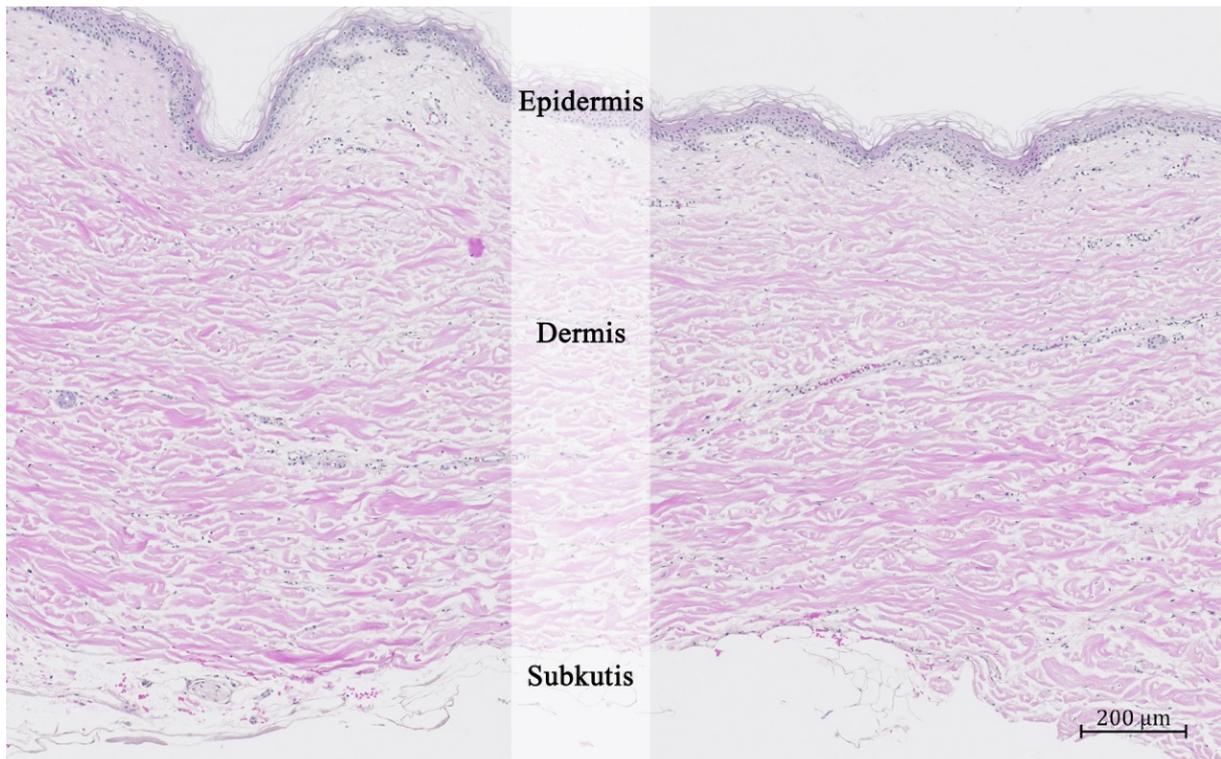


Abb. 3: **Schichten der Haut**

Abb. 3: Abgebildet sind die Schichten der Haut am Beispiel der Kontrolle nach 6 Tagen der Haut des Spenders B. Sichtbar sind die Epidermis, die Dermis sowie Teile der Subkutis. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

Gefäße sind, mit Ausnahme der Epidermis, in allen Schichten der Haut zahlreich vorhanden [8]. Sie erfüllen Funktionen in der Nutrition von Nähr- und Sauerstoff, Wundheilung, Immunreaktion, Blutdruckkontrolle, im Abtransport von Abfallstoffen, im Transport von Blutzellen sowie der Thermoregulation [8, 14]. Die Gefäße bilden einen oberflächlichen Plexus zwischen papillärer und retikulärer Dermis sowie einen tiefen Plexus zwischen Dermis und Hypodermis (siehe Abb. 4) [8, 14]. Beide Plexus stehen miteinander in Verbindung [8, 14]. Die kutanen Lymphgefäße entsprechen grob diesem Verlauf [8, 14]. Die Kapillaren sind von Perizyten umgeben, welche α -SMA (*Smooth-Muscle-Actin*) produzieren [14]. Vaskuläre Endothelzellen produzieren eine Reihe von Faktoren, unter anderem das CD-31-Antigen, welches an der Leukozytendiapedese beteiligt ist und den von Willebrand Faktor (vWF), der in geringen Mengen auch von lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird [8, 14].

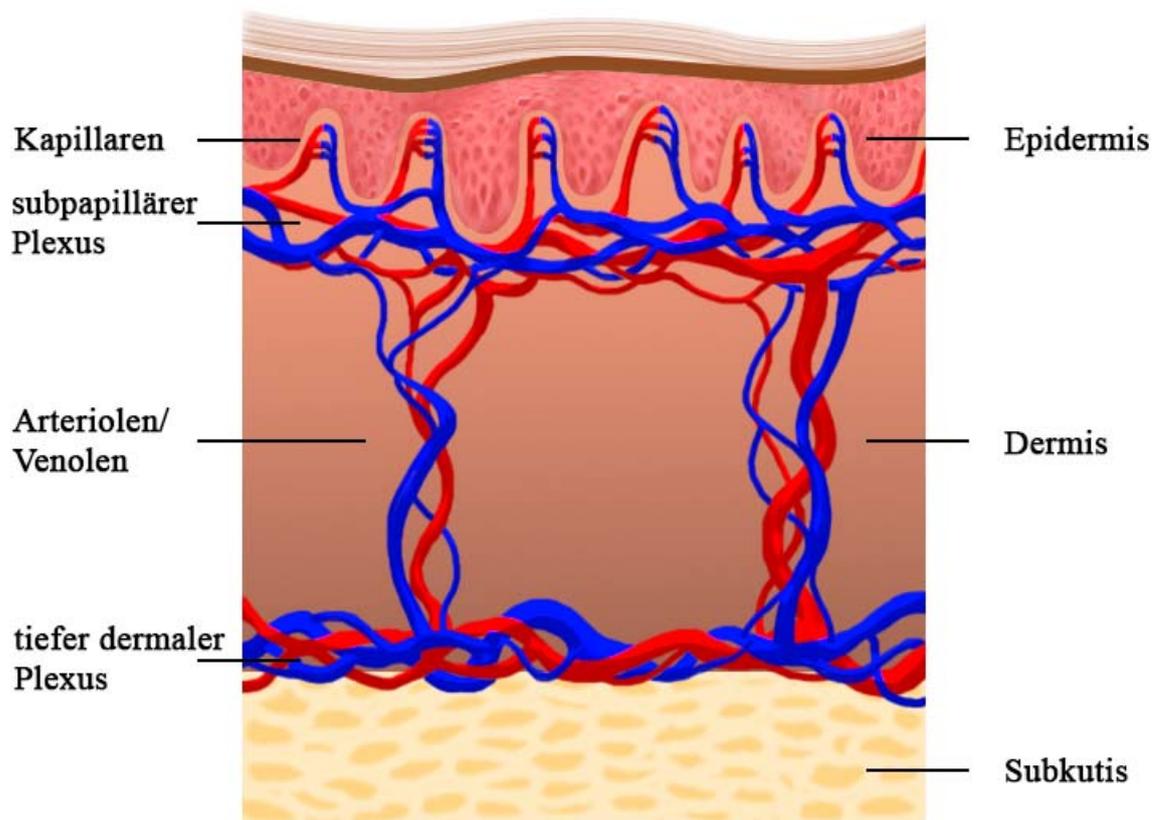


Abb. 4: Blutgefäße der Haut sowie Schichten der Haut (in Anlehnung an „Duale Reihe Anatomie“ Kapitel „Haut und Anhangsgebilde“ Abbildung „Abb. O-1.10 Gefäßplexus der Haut“ [17])

Abb. 4: Die Abbildung verdeutlicht die Blutversorgung der Haut und stellt die Schichten der Haut dar. Es existieren ein oberflächlicher sowie ein tiefer Gefäßplexus, welche miteinander in Verbindung stehen [8]

Unter der Dermis befindet sich die Hypodermis, die auch als Subkutis bezeichnet wird und fast ausschließlich aus Adipozyten besteht [8]. Sie ist an der Thermoregulation, Isolation und Energiebereitstellung beteiligt und dient zudem als mechanisches Schutzpolster [8, 14]. Da das subkutane Fettgewebe bei dieser Arbeit nicht untersucht wird, wird an dieser Stelle auf eine weitere Erläuterung verzichtet.

1.2 Wundheilung

Per Definition beschreibt eine Wunde die Zerstörung von Geweben oder die Lösung aus dem Verbund in Geweben [18]. Die Wundheilung hingegen bezeichnet den Ersatz beziehungsweise Wiederaufbau zerstörten Gewebes bzw. die Vereinigung bei Durchtrennung von Gewebe und dauert in der Regel eine bis mehrere Wochen [14, 18]. Wundheilung kann in Regeneration und Reparation, welche in einer Narbe endet, eingeteilt werden [19]. Bei der Regeneration wird das Gewebe im Sinne eines *Restitutio ad integrum* neu gebildet: das neue Gewebe ist nicht vom Alten zu unterscheiden [19].

Bei der Reparation wird das Ursprungsgewebe hingegen durch ein Flickgewebe ersetzt, das in der Haut aus simplen dichten parallelen Bündeln Kollagen besteht, die Adnexe gehen dabei verloren [14, 19]. Auch verliert die Haut ihre Pigmentierung, da Melanozyten nicht regenerierbar sind [19]. Trotz der gleichen chemischen Zusammensetzung unterscheidet sich das Narbengewebe somit in seiner Struktur vom normalen Gewebe [19]. Das Gewebe ist nun durch eine verminderte Zugfestigkeit und Elastizität ausgezeichnet [18, 19]. Dieser Vorgang findet statt, wenn das Stratum reticulare durch den Schaden betroffen ist [14].

Die Wundheilung gliedert sich in verschiedene Wundheilungsphasen, wobei diese teils anabol (aufbauend) und teils katabol (abbauend) verlaufen [18, 19]. Die Phasen dienen der Anschaulichkeit, überschneiden sich aber in Wirklichkeit [19]. In der Literatur findet man verschiedene Einteilungen der Phasen, die im Folgenden bestmöglich vereint werden.

Insgesamt kann der Prozess mehrere Monate andauern [20].

Zunächst erfolgt die Exsudations- bzw. Entzündungsphase, in der es zu einem provisorischen Verschluss durch ein Fibrinkoagulum kommt, dieser folgt die Resorptionsphase, dann die Granulationsphase, bis schließlich die Reparationsphase die Wundheilung abschließt [14, 18]. Dem schließt sich noch eine Remodellierungsphase an, bei der die Kollagenfasern umstrukturiert und die gefäßreiche rote Narbe zu einer kapillar- und zellarmen weißen Narbe umgewandelt wird [19].

Die erste Phase findet in den ersten 8-12 Stunden nach Akutereignis statt [18]. In dieser Phase kommt es zum sofortigen Wundverschluss, der durch austretende Blutbestandteile und Plasma ermöglicht wird [19]. Zunächst kommt es zur Hämostase [18]. Durch Blutgerinnung wird ein Netz von Fibrinfasern gebildet, das Fibronektin, Vitronektin, Kollagen, aber auch Thrombozyten enthält und als Vorläufer der extrazellulären Matrix den ersten Wundverschluss ermöglicht [14, 18, 21]. Thrombozyten schütten eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Faktoren mit Mediatorfunktion aus, darunter Tumornekrosefaktor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$), *platelet derived growth factor* (PDGF), *platelet activating factor* (PAF) und Thromboxan [20, 21].

Die Thrombozyten beeinflussen darüber hinaus die Endothelzellfunktion [20]. Die Kapillardilatation und gesteigerte Gefäßpermeabilität führen dabei zur Entstehung eines Zell- und Gewebeödems [20].

Durch die Chemotaxis der Thrombozyten werden Entzündungszellen, wie Granulozyten und Monozyten rekrutiert [18]. Die Diapedese der Neutrophilen wird durch Adhäsionsmoleküle an den Endothelzellen ermöglicht [14]. Sie produzieren wiederum mehr proinflammatorische Zytokine, durch die Fibroblasten und Keratinozyten aktiviert werden [14, 20]. Zudem phagozytieren sie Bakterien und durch

die von ihnen produzierten Proteasen (Elastase und Kollagenase) werden darüber hinaus auch beschädigte Matrix und zelluläre Proteine abgebaut [20]. Auch reaktive Sauerstoffradikale und lysosomale Enzyme werden von den Granulozyten gebildet und tragen zusätzlich zur Infektbekämpfung bei [21]. Die Neutrophilen verschwinden normalerweise nach circa drei Tagen, vermutlich durch Apoptose [20]. Wie bereits erwähnt, gelangen auch Monozyten in die Wunde, die sich zu Makrophagen differenzieren und ebenfalls mit der Phagozytose beginnen [14]. Sie produzieren ihrerseits Zytokine und Wachstumsfaktoren [14].

Dies markiert den Übergang in die Resorptionsphase, welche in den ersten vier Tagen nach Trauma einsetzt [18]. Die Makrophagen geben nicht nur Enzyme (Hydrolasen und Proteasen) ab, um das zerstörte Gewebe zu beseitigen, sondern phagozytieren auch Gewebedebris und Bakterien [18]. Außerdem aktivieren sie T-Lymphozyten, die zur spezifischen und unspezifischen Immunantwort beitragen [19, 21]. Durch den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF- β /bFGF) werden die Fibroblastenproliferation sowie eine Neovaskularisation ermöglicht [19]. Nun folgt die Umwandlung von Fibroblasten in Fibrozyten [18].

Ab dem 4. Tag beginnt die Proliferationsphase, bei der das Granulationsgewebe entsteht, welches makroskopisch ein rotes, körniges Gewebe darstellt [18]. Diese Phase ist gekennzeichnet durch abnehmende Fibroblastenproliferation bei zunehmendem Kollagenfaseranteil [21]. Durch von Keratinozyten, Thrombozyten, Makrophagen aber auch aus eigener Produktion erzeugten Wachstumsfaktoren proliferieren die Fibroblasten, wandern ins Fibrinkoagulum/im Bereich der primär gebildeten Vorläufermatrix ein und produzieren kollagene Fasern (vor allem Kollagen III), Fibronectin und Hyaluronsäure [14, 21]. Eine primäre extrazelluläre Matrix entsteht, die vor allem aus Fibroblasten und Myofibroblasten (welche wiederum aus Fibroblasten entstehen) besteht [18, 19, 21]. Myofibroblasten ermöglichen unter Ausbildung kontraktile Myofibrillen die Wundkontraktion [18, 19]. *Alpha-Smooth muscle actin* (α -SMA) ist ein charakteristisches Merkmal von Fibroblasten, die sich in kontraktionsfähige Myofibroblasten verwandelt haben und eine wichtige Rolle in der Fibrogenese und Wundheilung spielen [22, 23]. Der Wundverschluss wird durch sie ermöglicht [22]. Darüber hinaus findet man α -SMA auch in den glatten Muskelzellen, auch in derer der Gefäße [22, 23].

Die Angiogenese wird, wie bereits beschrieben, durch bFGF (stammt aus verletzten Endothelzellen und Makrophagen) und durch *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (stammt aus Makrophagen und Keratinozyten) angeregt [14]. Die neuen Gefäße entstehen aus den Kapillaren des umliegenden Gewebes [14]. Endotheliale Adhäsionsmoleküle, wie das *Platelet Endothelial Cell adhesion molecule-1* (CD-31/PECAM-1), scheinen eine wichtige Rolle in der Angiogenese zu spielen, weshalb man diesen Faktor als Marker verwendet [24-27].

Am 6.-28. Tag nach Trauma schließt sich die Reparationsphase an [18]. Die Myofibroblasten kontrahieren sich weiterhin, wodurch sich die Wundränder annähern [14]. Nach Abschluss des Wundverschlusses gehen die Fibroblasten apoptotisch zugrunde oder treten in den Ruhezustand zurück [14].

Falls durch das Trauma die Hautanhangsgebilde komplett zerstört werden, können diese nicht nachgebildet werden [14].

Bereits einige Stunden nach Wundentstehung beginnt die Reepithelialisierung [14]. Hierbei wird die Verankerung zur Basalmembran über Hemidesmosomen und die Verbindung über *gap junctions* und Desmosomen gelöst [13, 14, 28]. Somit wird eine Wanderung basaler und suprabasaler Zellen vom Wundrand ermöglicht, was als *Shuffling* bezeichnet wird [13, 14, 28]. Der Defekt schließt sich dadurch reißverschlussartig [28]. Zur Reepithelialisierung tragen nicht nur die Keratinozyten des Wundrandes, sondern auch Stammzellen der äußeren Haarwurzelscheide bei [28]. Es ist also von Vorteil, wenn sich Haarfollikel im Zentrum der Wunde befinden, da die Regeneration so nicht nur vom Wundrand aus erfolgen kann [28]. Die Epidermiszellen wandern hierbei über eine provisorische Basalmembran, die aus Fibronectin und Typ-IV-Kollagen besteht [21].

Der normalerweise bestehende *Steady State* zwischen epidermaler Proliferation und Apoptose verliert seine Balance in Zeiten der Wundheilung, sodass einen Tag später eine Welle der Proliferation aus ruhenden Zellen entlang der Grenze von Dermis und Fibrinkoagulum stattfindet [14]. Diese Hyperproliferation führt infolge mangelnder Differenzierung zur Ausbildung von Schuppen [14]. Die Zyklusphasen werden verkürzt und die Apoptoserate verringert [14].

Die Wanderung aber auch die Mitose der Zellen wird durch Signale von Thrombozyten, Keratinozyten, Makrophagen und Fibroblasten ermöglicht [14]. Die wandernden Epidermalzellen lysieren dabei die provisorische Matrix mittels Enzymen wie beispielsweise die Matrix-Metalloprotease zur Lyse des Kollagens [14]. Nachdem der Defekt reepithalisiert wurde, endet die Neubildung und der normale Differenzierungsprozess der Keratinozyten kann wieder aufleben [14].

Bei Verbrennungswunden zweiten Grades (siehe unten) ist die Epithelneubildung entscheidend und eine Kontraktion nicht erforderlich [21].

In dieser Arbeit wird die Wundheilung anhand von Myofibrogenese, Reepithelialisierung und Angiogenese beschrieben und evaluiert. Da oben bereits ausführlich die Reepithelialisierung beschrieben wurde, wird hier nur noch auf die Myofibrogenese sowie die Angiogenese im Detail eingegangen.

Im Allgemeinen entstehen Blutgefäße in drei Schritten [29]. Zunächst bildet sich ein Strang aus Endothelzellen, darauf folgt die Bildung eines Lumens bis zuletzt schließlich der Blutfluss beginnt [29]. Man unterscheidet Vaskulogenese von Angiogenese, wobei beide Mechanismen an der Wundheilung beteiligt zu sein scheinen [30]. Bei der Vaskulogenese entstehen Gefäße aus Vorläufern von Endothelzellen und Angioblasten in der Embryonalphase beziehungsweise aus endothelialen Stammzellen beim Erwachsenen [31]. Es handelt sich also um eine *de novo* Bildung von Gefäßen [29]. Dies geschieht durch Interaktion von Zellen untereinander sowie mit der extrazellulären Matrix im Zusammenspiel mit Wachstumsfaktoren [32-34].

Angiogenese entsteht aus präexistenten Gefäßen und erfordert ein Zusammenspiel von Endothelzellen, pro- und antiangiogene Wachstumsfaktoren sowie der extrazellulären Matrix [29, 30]. Sie beginnt mit einer vor allem durch Stickstoffmonoxid (NO) verursachten Dilatation und Permeabilitätssteigerung der Gefäße [31], welche die Ausschüttung von Plasmaproteinen ermöglichen [35].

NO, aber auch proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hypoxie [36-44] steigern die Exprimierung von Mitgliedern der VEGF-Familie [41, 45, 46], was den Prozess reguliert [30, 31]. Daran

ist unter anderem CD-31 beteiligt [30, 31]. Auch Adenosin scheint durch Modulierung proangiogener und antiangiogener Faktoren ein wichtiger Induktor der hypoxiebedingten Angiogenese zu sein [36, 47].

Man unterscheidet die klassische sprossende Angiogenese von der nicht sprossenden Angiogenese, der Intussuszeption [48, 49]. Durch den Blutfluss ausgelöster mechanischer Stress scheint eines der Triggerfaktoren für Intussuszeption zu sein [50, 51]. Hier entstehen vor allem neue Kapillaren, wo bereits Kapillaren vorhanden sind [36]. Der Prozess spielt insbesondere embryonal eine wichtige Rolle [36]. Beim nicht sprossenden Wachstum entstehen neue Gefäße durch Längsspaltung und Bildung von vertikalen Pfeilern in existierenden Gefäßen [52].

Sprossende Angiogenese ist hingegen durch aussprossende Endothelzellen charakterisiert [53]. Diese wachsen entlang chemotaktischer Signale durch beispielsweise VEGF-A [53].

Bei der sprossenden Angiogenese werden das Stroma und die Basalmembran durch Proteasen teilweise aufgelöst, wodurch es den Endothelzellen möglich ist zu wandern [31, 54, 55].

An der Spitze der auswachsenden Sprossen findet man die sogenannten *tip cells* [53]. Es handelt sich dabei um spezialisierte Endothelzellen, die die Richtung des Wachstums entlang angiogener Gradienten von VEGF-A bestimmen [30, 53], *Stalk cells* hingegen liegen weiter zurück und nehmen in Abhängigkeit der Konzentration von VEGF-A in ihrer Anzahl zu [53]. Sie formen lumenbildende solide Stränge [31, 55], bis diese schließlich miteinander anastomosieren und der Blutfluss einsetzt [56]. Anschließend werden murale Zellen, wie Perizyten oder glatte Muskelzellen, rekrutiert [56].

Murale Zellen stabilisieren die neu gebildeten Gefäße und stimulieren die Bildung von extrazellulärer Matrix [35].

Es gibt mindestens sechs verschiedene Wachstumsfaktoren, die zur VEGF-Familie gehören [56]. Beim Menschen wird die Angiogenese durch VEGF, das auch als VEGF-A bezeichnet wird, VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D reguliert [56]. Hypoxie ist dabei einer der wichtigsten VEGF-steuernenden Faktoren [56]. Sie führt zur Stabilisierung von HIF (*hypoxie-inducible factor*), was wiederum die Expression von VEGF beeinflusst [57] [58].

Der Ablauf der Angiogenese benötigt eine Balance von stimulierenden und inhibierenden Faktoren [56]. Wie oben bereits beschrieben, ermöglichen Myofibroblasten, die eine Form spezialisierter Fibroblasten darstellen, die Kontraktion des Granulationsgewebes [59].

Nachdem die Myofibroblasten ihre Funktion in der Wundheilung erfüllt haben, gehen sie durch Apoptose zugrunde, die Mechanismen hierfür sind noch unklar [60, 61].

Möglicherweise führt ein Ausbleiben dieses Schrittes zur hypertrophen Narbenbildung [62-65].

Myofibroblasten liegen in unterschiedlichen Aktivitätsformen vor und dienen der Kontraktion der Extrazellulären Matrix [66]. Durch chemische und mechanische Reize wird die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten ermöglicht [66]. Nach der Bildung des *Fibrinclots* in der ersten Phase der Wundheilung muss diese prämaturo einer stärkeren extrazellulären Matrix weichen [66]. Hierzu wandern Fibroblasten ein, die auch als Proto-Myofibroblasten bezeichnet werden [66]. Sie entwickeln

kontraktile Fähigkeiten und reifen schließlich zu Myofibroblasten [66]. Um sich kontrahieren zu können, produzieren sie α -SMA, weshalb dieses häufig als Marker der Myofibroblastendifferenzierung genutzt wird [66]. Daneben ermöglicht dieses Protein wiederum weitere Aktivierung der Myofibroblasten, im Sinne eines *Feedback*-Mechanismus [67].

Mechanischer Stress fördert den Fortbestand und die Vermehrung α -SMA-positiver Myofibroblasten [61, 65, 68-70].

1.3 Verbrennungen

Verbrennungen stellen eine große Herausforderung an den Behandelnden dar, weil sie häufig nicht nur zur funktionellen, sondern auch zur ästhetischen Beeinträchtigung führen, was für den Betroffenen erhebliche Narbenbildung und Stigmatisierung zur Folge haben kann [71]. Die Erfolge der Behandlung sind hierbei nicht nur von der Akut-, sondern auch von der Langzeitversorgung und von Rehabilitationsmaßnahmen geprägt [71].

Es existieren 19 Zentren für schwerbrandverletzte Erwachsene in Deutschland [71].

Pro Jahr gibt es circa 100.000 ärztlich behandelte Fälle von Verbrennungen und Verbrühungen, wobei häufig soziale Randgruppen, Kinder und psychisch Kranke betroffen sind [6, 72]. Die Inzidenz leichter Verbrennungen betrifft circa 600 pro 100.000 Einwohner jedes Jahr, die von schweren Verbrennungen 1 pro 50.000 bis 1 pro 60.000 Einwohner jährlich [71].

Verbrennungen der Haut können unterschiedlichen Ursachen zugrunde liegen, darunter Verbrühungen, Kontaktverbrennungen, Flammenverbrennungen, chemische und toxische (auch als Paraverbrennungen zusammengefasst, da ihre Pathophysiologie denen der Verbrennungswunden stark ähnelt), elektrische und aktinische Verbrennungen [2, 6].

Das Ausmaß der Schädigung der Haut bei Kontakt mit einem erhitzten Gegenstand ist abhängig von Objekttemperatur, Einwirkzeit, Dicke der Haut und spezifischer Hitze, worunter man die Hitze bezeichnet, die man brauchen würde, um die spezifische Masse um 1°C zu erhöhen [2]. Je höher die Temperatur, desto weniger Einwirkzeit ist nötig, um zur Nekrose zu führen [6]. Dies ist ein logarithmischer Zusammenhang [6]. Bereits ab einer Temperatur von 40°C kommt es zur Degeneration von Enzymen und Strukturproteinen [5, 6]. Ab 45°C kommt es dagegen bereits zu Nekrosen und bei weiterem Anstieg der Temperatur zu definitiven Proteindenaturierungen und Koagulationsnekrosen [5]. Nicht nur eine Zerstörung der Proteine wirkt schädigend, sondern auch die Entstehung von Zellfragmenten und Proteinlagerungen, die durch die Proteinstrukturveränderungen entsteht [5]. Diese haben ihrerseits giftige und immunmodulatorische Effekte [5].

Man teilt Verbrennungswunden abhängig von der Tiefe in verschiedene Stadien ein, die erstmalig von Fabricius Hildanus beschrieben wurden [2, 6] (siehe Abb. 5).

Stadium I betrifft dabei nur die Epidermis [2]. Die Haut wird trocken, geschwollen und schmerzhaft gereizt [2, 73]. Sie ist rot gefärbt, durch Druck bleicht sie [6]. Es besteht eine Vasodilatation [6]. Zwar findet man eine Ödembildung, es kommt allerdings nicht zur Ausbildung von Blasen [6]. Diese Verletzung heilt innerhalb von 3-4 Tagen narbenfrei ab [2]. Stadium II wird in IIa und IIb unterteilt [2].

Verbrennungen des Grades IIa reichen lediglich bis in die papilläre Dermis, wobei Mikrogefäße beschädigt werden und flüssigkeitsgefüllte Brandblasen entstehen [2, 73]. Die subdermalen Gefäßplexus sind immer noch in der Lage, die Dermis zu versorgen [6]. Der Wundgrund unter den Blasen ist rot, bei Druckapplikation bleicht er, färbt sich bei Nachlassen aber wieder [6]. Es zeigt sich eine spontane kapilläre Blutung bei Anritzen mit einer Kanüle [6]. Hautanhangsgebilde und Rezeptoren bleiben intakt, was ein starkes Schmerzempfinden verursacht [73]. In diesem Stadium heilt die Verbrennung zwar narbenlos innerhalb von zwei bis drei Wochen ab, kann aber Pigmentstörungen hinterlassen [73]. Eine konservative Therapieform ist meist ausreichend [6]. Eine länger andauernde Heilung lässt einen Übergang in ein höheres Stadium vermuten [6].

Im Stadium IIb ist dagegen sowohl die Epidermis als auch die retikuläre Dermis mitbetroffen [2]. Die Schmerzhaftigkeit und das Sensibilitätsempfinden ist durch Schädigung der Schmerz- und Tastrezeptoren vermindert [2, 73]. Teilweise bilden sich Blasen, teilweise auch nicht [2]. Haare sind leicht zu entfernen [71]. Da der subdermale Gefäßplexus nun mitbetroffen ist, ist der Blasengrund blass weißlich [6]. Auch ein Abblassen bei Druckapplikation ist demnach nicht mehr zu finden [6]. Eine spontane kapilläre Blutung bei Anritzen findet sich nicht mehr regelhaft und ist bei Vorhandensein verzögert [6]. Eine Heilung erfolgt meist unter der Bildung hypertropher und instabiler Narben und eine Operationssindikation ist in diesem Stadium meist gegeben, weshalb einer Unterscheidung zum Stadium IIa besonderer Bedeutung zukommt [6].

Verbrennungen des Grades III reichen bis in die Subkutis [2]. Hier kommt es zum Verlust von Haaren und Nägeln sowie der Tast- und Schmerzrezeptoren [73]. Die Durchblutung des subdermalen Gefäßplexus ist nun vollkommen erloschen, die Wunde ist gräulich bis gelblich mit thrombosierten Blutgefäßen, teils auch bräunlich bis rötlich [6, 73]. Man findet weder Abblassen bei Druck, noch spontane kapilläre Blutungen bei Anritzen [6]. Spontane Heilung ist kaum möglich, weshalb eine operative Behandlung indiziert ist [6]. Narben und Keloide können zurückbleiben [73]. Zum Teil wird zusätzlich eine Verbrennung vierten Grades definiert, die bis auf die Muskeln und Knochen reicht [71, 72, 74].

Zur internationalen Vergleichbarkeit wurde 2002 eine neue Einteilung durch die *European Burn Association* beschrieben [6]. Die oberflächlichste Form der Verbrennung, *superficial burns*, entspricht in etwa einer Verbrennung ersten Grades [6]. Die *Superficial partial thickness burns* beschreibt die Läsion der Epidermis und der papillären Dermis, weshalb sie in etwa dem Grad IIa entspricht [6]. *Deep dermal partial thickness burns* umschreibt die Verbrennung der Epidermis bis hin zum Stratum reticulare der Dermis und *full thickness burns* schädigen die gesamte Epidermis und Dermis, können aber auch noch tiefere Strukturen, wie die Subkutis schädigen [6].

Da die retikuläre Dermis weniger bioaktiv ist als die papilläre, heilen Verbrennungen des Grades IIa schneller ab als des Grades IIb [73].

Bei oberflächlichen Verbrennungen kann die Reepithelialisierung aus tieferen Epidermisschichten hervorgehen [75]. Ist die Verbrennung allerdings tiefer, so erfüllen vor allem die Hautanhangsgebilde diese Funktion [75]. Nicht nur die Organisation der Kollagenfasern ist hier minderwertig, was zur Ausbildung hypertropher Narben führt, auch ist der Prozess der Reepithelialisierung verlangsamt [75].

Neben Tiefe ist auch die Ausdehnung der Verbrennung relevant [2]. Diese wird angegeben als KOF-Prozent der Körperoberfläche [2].

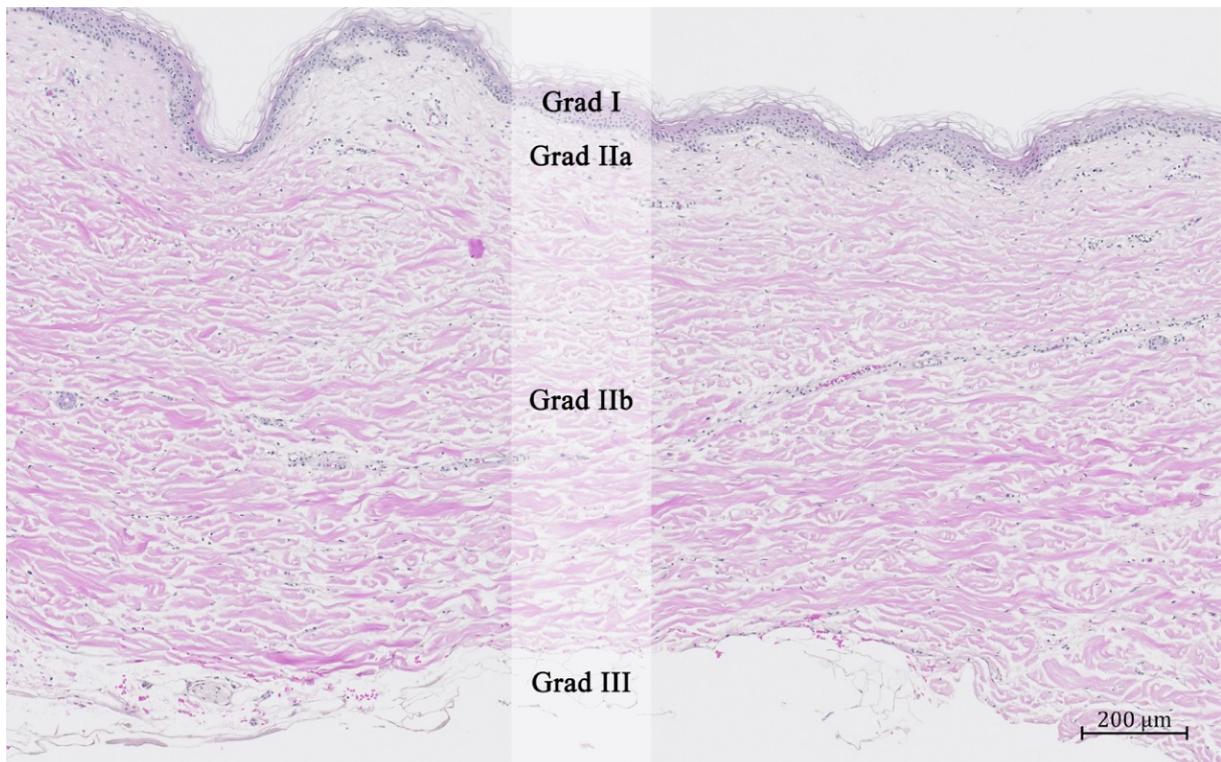


Abb. 5: **Grade der Verbrennung**

Abb. 5: Hier sind die Verbrennungsgrade am Beispiel der Kontrolle nach 6 Tagen der Haut des Spenders B dargestellt. Bei Grad I ist nur die Epidermis betroffen [6]. Grad IIa betrifft die oberflächliche, Grad IIb die tiefe Dermis [2]. Grad III reicht bis in die Subkutis. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441 µm x 0,441 µm

Jackson teilte 1953 die drei zwiebelschalenartigen Zonen der Verbrennungswunde (Abb. 6) ein [76]. Dies lag der Überlegung zugrunde, dass die meisten Verbrennungen im Zentrum am tiefsten und am Rand flacher sind [73, 76]. Diese beschriebenen Zonen sind bei allen tieferen Verbrennungen vorhanden, wobei die Ausprägung variieren kann [76].

Jackson definierte die Nekrosezone als das Innerste der Wunde [73]. Hier sind die Zellen, wie der Name bereits vermuten lässt, abgestorben, die Proteine denaturiert und verklumpt [6, 73]. Daran schließt sich die Stasezone an, in der sich noch vitale Zellen befinden, die im Verlauf noch untergehen können [2, 5, 6]. Man bezeichnet diesen Effekt als Nachbrennen, was die Vertiefung der Verbrennung beschreibt [5, 73]. Zunächst ist sie noch rot, bleicht aber bei Druck [76]. In dieser Zone stagniert der Blutfluss [75]. Die noch vitalen Zellen sind durch eine Vielzahl an Einflussfaktoren gefährdet. Zum einen kann ihnen eine mangelnde Blutversorgung bzw. Sauerstoffmangel durch Dehydratation, Druck, Infektion oder Hypovolämie zum Verhängnis werden [5, 75]. Zum anderen können Zellfragmente, Mediatorenausschüttung, Immunmodulatoren sowie Unterkühlung und Elektrolytungleichgewicht schädigend wirken [5, 75].

Der Rand wird gebildet durch die Hyperämiezone, die vitale Zellen enthält [73]. Jackson beschreibt, dass ein Verlust der Epidermis ohne Beschädigung der Dermis stattfindet [76]. Hier herrscht

Vasodilatation und erhöhter Blutfluss, was dieser Zone ihren Namen verleiht [75]. Vor allem wird dies durch Entzündungsmediatoren ermöglicht [73]. Es kommt zur Aktivierung von Neutrophilen und damit zur Produktion von Radikalen [73]. Die dadurch entstehende Entzündungsreaktion wird außerdem verstärkt durch die Schädigung von Zellmembranen [73]. Durch Oxidantien und Peptidasen wird der Effekt des Nachbrennens weiter begünstigt, da es zu Druckanstieg und Kompressionen kommt und hierdurch die Versorgung des bereits vulnerablen Gewebes der Stasezone beeinträchtigt wird [5, 73].

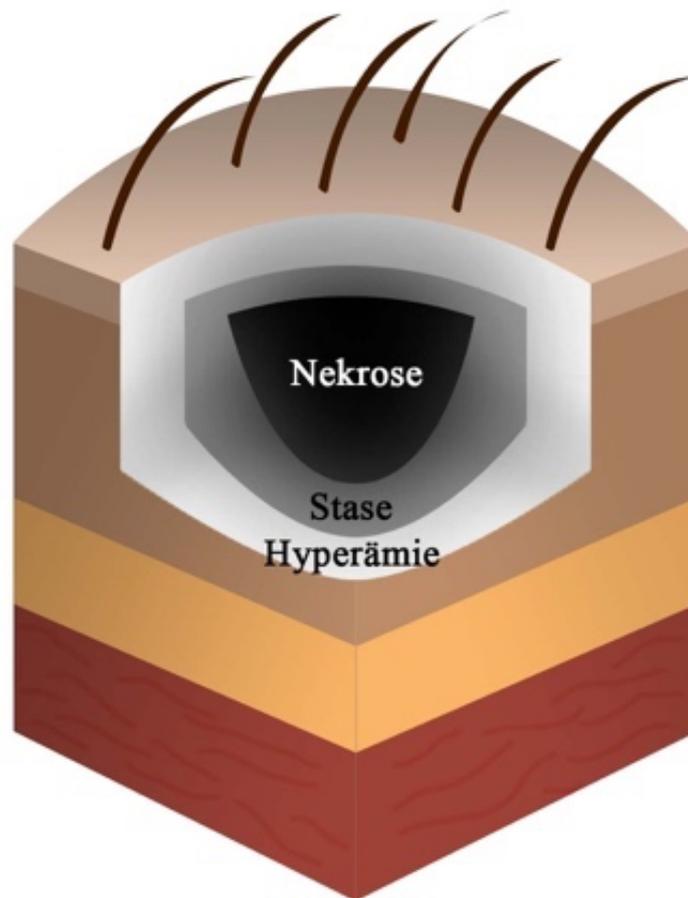


Abb. 6: **Jackson Verbrennungszonen**

Abb. 6: Zu sehen ist der Querschnitt durch eine Hautstanz mit einer Verbrennung in der Mitte. Im Zentrum der Verbrennung befindet sich die Nekrosezone, die abgestorbene Zellen enthält [2]. Daran schließt sich die Stasezone an, in der die gefährdeten Zellen liegen [2]. Die äußerste Zone, die Hyperämiezone, enthält vitale Zellen [2, 5]; in Anlehnung an Akutversorgung des brandverletzten Kindes [9, 10] Abb. 5

Der Untergang von Kollagen führt zur Entstehung eines lokales Ödems, das nach circa 12-24 Stunden maximale Ausprägung erreicht [73, 75]. Während in normalen Wunden Ödembildung zur Wundreinigung beiträgt, ist sie in Verbrennungswunden durch die mögliche Kompression und damit weiterer Ischämie gefährlich [75].

Das Weichteilödem wird durch verschiedene Faktoren gebildet, deren Zusammenwirken als „capillary leak“ bezeichnet wird [5]. Eine erhöhte Permeabilität kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen wird das Endothel direkt geschädigt, zum anderen sind Mediatoren verantwortlich, die eine systemische Entzündungsreaktion bewirken [75]. Es handelt sich hierbei unter anderem um Histamin, Bradykinin,

freie Sauerstoffradikale und Peptide [75]. Die gesteigerte Permeabilität führt zu einer Verschiebung von Plasmaproteinen ins Interstitium und somit zu einer Erhöhung des kolloidosmotischen Drucks [5, 75]. Zusätzlich kommt es zu einem gesteigerten Kapillardruck und zur Vasodilatation [75].

Insgesamt ist ein Zusammenspiel von pathologischen Veränderungen des hydrostatischen und kolloidosmotischen Drucks sowie die Verschiebungen interstitieller Flüssigkeiten Ursache des Kapillarlecks [5]. Im Ergebnis wird mehr interstitielle Flüssigkeit angesammelt, als über das Lymphsystem abfließen kann [5]. Das Ödem entsteht [5].

Durch Zelldebris und denaturierte Proteine wird außerdem ein Verbrennungsschorf gebildet, der ein Nährmedium für Bakterien darstellt [75].

Ab einer Verbrennung von 20%VKOF kann nicht nur ein lokales, sondern auch generalisiertes Kapillarleck entstehen, sodass es zudem zur systemischen Reaktion kommt [5, 72, 73]. Intravasale Hypovolämie und dadurch eine Schädigung des kardiovaskulären Systems sind die Folge [5, 73]. Es kann ein Verbrennungsschock resultieren [73]. Da dieser nicht nur durch Hypovolämie, sondern auch durch Mediatoren bedingt ist, kann er mittels Volumensubstitution nicht vollständig korrigiert werden [73].

Die häufigste Todesursache Schwerbrandverletzter stellt das Multiorganversagen dar [5]. Dieses kann, muss aber nicht, mit Infektionen assoziiert sein [5]. Es geht eine Sepsis voraus, deren Ursache zwei Hypothesen beschreiben, die sich gegenseitig ergänzen [5]. Zum einen kann eine Antwort der Makrophagen auf Erreger Ursache sein, zum anderen könnte eine posttraumatische Immunsuppression, in Form einer Lymphozytenproliferations- und Antikörpersynthesestörung verantwortlich sein [5].

Patienten ab 10% VKOF, bei Kindern schon ab 5%, sind gefährdet, einen Schock zu erleiden [72].

Um das Risiko einer Wundinfektion zu minimieren, wird eine frühe und vollständige Exzision des nekrotischen Gewebes angestrebt, wodurch die Expositionszeit gegenüber möglichen Erregern vermindert wird [5].

Wie bereits erwähnt, kann die Behandlung von Verbrennungen ersten Grades rein konservativ mit pflegenden Salben durchgeführt werden [71]. Im Stadium IIa reicht eine Wundreinigung mit Debridement aus, während bei IIb die Entfernung des nekrotischen Gewebes mit anschließender Deckung via Spalthauttransplantation indiziert ist [71]. Falls diese nicht möglich ist, kann ein Debridement erfolgen und Schließung der Wunde mittels temporären Hautersatz oder antiseptischer Verbände erreicht werden [71]. Bleibt eine Heilung innerhalb der nächsten drei Wochen aus, sollte eine Spalthauttransplantation durchgeführt werden [71]. Bei drittgradigen Verbrennungen ist eine tangentielle oder epifasziale Nekrektomie und Defektdeckung nötig [71]. Falls die Perfusion der Extremitäten, aber auch von Thorax oder Abdomen, durch zirkuläre Verbrennungen gefährdet wird, strebt man eine Escharotomie an, bei der dieser Wundschorf gespalten wird [6]. In jedem Fall ist nach initialer Versorgung und Stabilisierung des Patienten, eine schnellstmögliche Operation bei Verbrennungen des Grades IIb oder höher in den ersten 24h anzustreben [6].

1.4 Wachstumsfaktoren und Wundheilung

Bereits ab Verbrennungswunden zweiten Grades kommt es zu einem Schaden des mikrovaskulären Systems der Haut mit Verlust der Kapillaren [77]. Dies hat eine Ansammlung von Flüssigkeit sowie die Störung der Signalmoleküle zur Folge, darunter auch Wachstumsfaktoren, die, wie im Folgenden beschrieben, eine essentielle Rolle für die Wundheilung zu spielen scheinen [77].

Der derzeitige Goldstandard der Behandlung von Verbrennungswunden – die Spalthauttransplantation – ist ab einem Hautverlust von 70% nicht mehr möglich, sodass Alternativverfahren dringend benötigt werden [78]. Neben dermalen und epidermalen Hautersatzverfahren, die bereits in der Klinik verwendet werden [79], scheinen, wie im Folgenden beschrieben, Wachstumsfaktoren einen vielversprechenden Ansatz darzustellen. Ihre topische Anwendung nutzt körpereigene Zellen, um die Wundheilung zu stimulieren und so die Dauer der Läsion zu reduzieren [80].

Verschiedene Ansätze sind hierfür experimentell getestet worden. Da diese Arbeit ebenfalls den Effekt eines Wachstumsfaktors auf die Wundheilung in Verbrennungswunden erforscht, werden die Ergebnisse einiger dieser Experimente zusammengefasst. Der Faktor EGF (*epidermal growth factor*) steht dabei bisher oft im Fokus der Forschung.

Wachstumsfaktoren sind wichtige Bestandteile der oben beschriebenen Phasen der Wundheilung, da sie die Zellmigration, Differenzierung und Proliferation stimulieren [81-83].

Sie wirken chemotaktisch auf Entzündungszellen [84-88] und ermöglichen deren Aktivierung [87, 89-91], fördern die Fibroblastenproliferation [87], die Synthese der Bestandteile der extrazellulären Matrix [92], insbesondere die Kollagensynthese- und Ausschüttung [87, 92-94], ermöglichen die Angiogenese [81, 85, 95-97] und tragen zur Narbenbildung bei [81, 98].

Bei Betrachtung dieser wichtigen Funktionen der Wachstumsfaktoren für die Wundheilung, ist es naheliegend, dass die Behandlung von Wunden mithilfe von Wachstumsfaktoren Bestandteil der aktuellen Forschung ist.

Der wundheilungsfördernde Effekt konnte in zahlreichen Experimenten bestätigt werden [99, 100]. Auch Hinweise des positiven Einflusses durch lokale Applikation von Wachstumsfaktoren auf Verbrennungswunden konnten bereits geliefert werden [101-103]. Sowohl die Entnahmestelle von Spalthaut als auch die Spalthaut selbst profitierten im Versuch ebenfalls von der Therapie mit Wachstumsfaktoren [102, 104, 105]. Interessant ist hierbei, dass festgestellt werden konnte, dass höhere Dosen des Faktors zu schlechteren Ergebnissen führten [105]. Erklärt wurde dies dadurch, dass höhere Konzentrationen von Wachstumsfaktoren eine inadäquate Antwort der Wundheilung verursachen [105].

Über die genannten vor allem *in vivo* durchgeführten Experimente am Tier hinaus wurden bereits randomisierte kontrollierte Studien an Patienten sowohl für die Förderung der Wundheilung [106, 107] als auch für diese bei Verbrennungswunden im Speziellen durchgeführt [108].

In manchen Ländern sind einige Wachstumsfaktoren bereits klinisch zugelassen, so beispielsweise der Faktor *basic Fibroblast Growth Factor* in Japan [107].

Einige Präparate waren zwischenzeitlich auch in Deutschland für die Behandlung chronischer Wunden zugelassen, so zum Beispiel Becaplermin, welches *Platelet Derived Growth Factor* enthielt und als Gel verfügbar war. Die Herstellung dieses Präparates wurde allerdings 2011 europaweit eingestellt [109].

1.4.1 Die TGF- β Superfamilie

Die TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) Superfamilie ist eine Gruppe von Faktoren, die unter anderem Chemotaxis, Mitose, Chondro- und Osteosynthese [110, 111] sowie die Kollagensynthese beeinflussen [112]. Darüber hinaus wirken sie auch in Mechanismen mit, wie Proliferation [113], Apoptose [114], Differenzierung der Zellen [115] und somit schließlich in der Entwicklung zahlreicher Organe, wie zum Beispiel das Nervensystem, die Nieren, die Haut, die Lungen und die Gonaden [116].

Zu dieser Superfamilie gehören neben der TGF- β Familie selbst, welche eng mit EGF in Beziehung steht [117, 118], die BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) Familie, zu denen wiederum die GDF-Familie (*Growth differentiation Factor*) gehört [119] und viele weitere [120, 121].

BMPs sind 30-38kDa schwere dimere Proteine, die man je nach Aminosäure-Sequenz in Subfamilien unterteilen kann [122]. Sie wurden bereits 1971 beschrieben [123].

Vereinfacht dargestellt binden die Faktoren der TGF- β Superfamilie an einen Rezeptorkomplex, der aus je zwei Molekülen Typ I und Typ II besteht [124, 125]. Diese Untereinheiten des Rezeptors bestehen aus 3 Bereichen: eine kurze extrazelluläre, eine membranüberspannende sowie eine intrazelluläre Domäne mit Serin/Threonin-Kinase-Region [122, 126, 127]. Nach Bindung des Liganden wird die GS-Domäne (glycin- und serinreiche Domäne) des Typ I durch Typ II phosphoryliert und Typ I damit aktiviert, welcher als Effektor der Signaltransduktion fungiert [122, 127]. Ein intrazellulärer Signalweg ist somit aktiviert [122, 127]. Die einzelnen Mitglieder der BMP Familie weisen unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Kombinationen der Typ I und Typ II Untereinheiten auf [128], wodurch vermutlich die unterschiedlichen Effekte ermöglicht werden [122].

Vereinfacht dargestellt führt die Bindung an den Rezeptor zur Phosphorylierung von SMAD Proteinen (*Receptor regulated SMADS* (R-SMADS)) durch den Typ I Rezeptor [129]. Zwei Signalwege scheinen aktiviert zu werden: SMAD2/3 oder SMAD1/5/8, wobei letzteres den Signalweg der BMPs beschreibt [129]. Sie bilden jeweils Komplexe mit SMAD4 und aktivieren oder hemmen schließlich im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren oder Koexpressoren die Genexpression im Nukleus [129]. SMAD6 und 7 scheinen inhibitorische Funktion zu haben, indem sie die Aktivierung der SMAD-Signalwege durch den Typ I Rezeptor verhindern [130, 131]. Somit ermöglichen sie einen auto-inhibitorischen Feedback Mechanismus [131, 132]. Darüber hinaus scheinen noch weitere “*SMAD-independent*”- oder “*non-canonical*“ Signalwege zu existieren [132].

Diese vereinfachte Darstellung scheint allerdings nur einen Bruchteil der Realität zu erfassen, da immer noch fraglich bleibt, wie mehr als 30 Liganden nur sieben Typ I und fünf Typ II Rezeptoren ansteuern können, die hauptsächlich nur zwei Signalwege aktivieren und dennoch zu zahlreichen verschiedenen Effekten in den Zellen führen [130]. Möglich wären hier noch unbekannte Komponenten, Korezeptoren sowie Modulatorproteine, welche die Signale spezifizieren könnten [130].

Als einer der ersten Faktoren der TGF- β Superfamilie wurde TGF- β 1 bereits vor circa 40 Jahren beschrieben [133]. Es ist demnach wenig überraschend, dass vor allem dieser viel erforscht wurde. Da seine Funktionen im Zusammenhang mit Wundheilung schon vielseitig bekannt sind und er als der strukturelle Prototyp der Superfamilie gilt, mit denen er verwandt ist [121], wird im Folgenden weiter darauf eingegangen.

TGF- β gilt im Allgemeinen als Wachstumshemmer, kann paradoxerweise aber auch die Proliferation fördern [134]. Dies wurde unter anderem im Zusammenhang mit Chondrozyten [135], Osteoblasten [134, 136], glatten Muskelzellen [137] und Fibroblasten [138] beschrieben. TGF- β scheint somit ein Induktor der Bindegewebsproliferation zu sein, kann diese aber auch unter bestimmten Bedingungen inhibieren [134]. Der sowohl inhibitorische als auch induzierende Effekt hängt sowohl von den Versuchsbedingungen aber auch von der Konzentration des Faktors ab [134]. Niedrige Konzentrationen scheinen einen wachstumsfördernden Effekt zu haben, während dieser bei hohen Konzentrationen verringert ist [134]. Es konnte außerdem beschrieben werden, dass TGF- β die Bildung von Granulationsgewebe fördert [92]. So induziert es die Angiogenese und Kollagensynthese [92]. Letzteres scheint durch die Aktivierung von Fibroblasten zu geschehen [92]. Es scheint somit ein wichtiger Mediator der Wundheilung zu sein [92, 117], was bereits 1983 *in vivo* im Mausexperiment gezeigt werden konnte [139].

Es gibt drei Isoformen von TGF- β : TGF- β 1, - β 2 und - β 3 [140]. In der Vergangenheit wurden viele Forschungen durchgeführt, die den Zusammenhang zwischen TGF- β , im Speziellen TGF- β 1 und der Wundheilung von chronischen Wunden sowie der Narbenbildung näher beleuchten. Es zeigten sich teilweise kontroverse Ergebnisse, die TGF- β 1, auch in Verbrennungswunden, zum einen für die Bildung hypertropher Narben verantwortlich zu machen scheinen [141-145], aber auch ein Mangel von TGF- β möglicherweise zu einer defekten Wundheilung mit Folge der Entstehung von chronischen, nicht heilenden Wunden sowie Narben führen könnte [143, 146-148].

Dieser Faktor scheint also ein wichtiger Bestandteil der physiologischen Wundheilung zu sein.

Auch die anderen Faktoren der TGF- β Superfamilie sind bereits vielfach untersucht und zum Teil sogar schon für den klinischen Gebrauch genutzt worden, wobei sich die meisten Forschungsergebnisse auf die Wundheilung und Angiogenese im Knochen beziehen [149].

BMPs scheinen eine wichtige Funktion in Zellproliferation, Zelldifferenzierung [150], Apoptose, Melanogenese, Haarfollikelwachstum und Gewebeumbau der Haut, somit also für die Homöostase zu spielen [127, 151, 152]. Demnach haben sie Einfluss auf die wichtigsten Zellen der Haut (darunter epidermale Keratinozyten sowie Keratinozyten aus den Haarfollikeln, dermale Fibroblasten, Melanozyten und epitheliale Stammzellen [127, 152-159]). Ihre Funktion erfüllen sie vermutlich durch Interaktion mit anderen Wachstumsfaktoren [151].

Sowohl Keratinozyten als auch dermale Fibroblasten exprimieren alle Subtypen der BMP-Rezeptoren [127]. In ihnen scheint der BMP-Smad Signalweg aktiv zu sein [127].

BMPs scheinen die Differenzierung der Keratinozyten über Involucrin, Loricrin und Keratin 1 zu steuern, welche als Differenzierungsmarker genutzt werden [152, 154, 160].

Es lässt sich vermuten, dass BMP-4 an der Regulierung des Umbaus der extrazellulären Matrix beteiligt ist [127].

Der eng mit dem von uns untersuchten Faktor GDF-5 verwandte Faktor GDF-6 ist in hoher Zahl in regenerierender Epidermis am Wundrand sowie in Fibroblasten des Granulationsgewebes zu finden [161]. Es wird allerdings ein inhibitorischer Effekt auf die Keratinozyten vermutet [161], da Überexpression zu verzögerter Reepithelialisierung führt [162]. Ähnlich wie bereits bei anderen Faktoren der Familie beschrieben, scheint auch BMP-6 eine konzentrationsabhängige paradoxe Wirkung zu haben [151, 163]. Demnach hemmen hohe Konzentrationen die epidermale Proliferation, während niedrige Konzentrationen diese fördern [151, 163].

Zwei Faktoren der BMP -Gruppe scheinen für die klinische Anwendung zur Knochenheilung interessant zu sein: rhBMP-2 und rhBMP-7 [164-167]. Zur knöchernen Defektdeckung wurde die BMP-2 enthaltene Kollagenmatrix InFUSE angewendet, deren Nutzen im Zusammenhang mit Operationen bei degenerativen Bandscheibenerkrankungen nachgewiesen wurde [168]. In Deutschland war das Produkt als InductOs erhältlich, die Zulassung ruht allerdings seit 2015 [169]. Ein Problem mit den BMPs scheint zu sein, dass im Menschen eine sehr hohe Dosis des BMPs benötigt wird, um ähnliche Wirkungen zu entfalten wie in Tierexperimenten [170]. Eine schnelle Ausscheidung, zu kurze Verweildauer im Gewebe und eine zu geringe Zahl an ansprechenden Zellen könnten mögliche Ursachen sein [170].

Auch im Bereich *Tissue Engineering* scheinen BMPs vielversprechende Helfer zu sein. So wurden BMP-3 und -7 für die Bildung von Knochengewebe erforscht [171, 172].

Ein weiterer wichtiger Faktor der BMP-Familie ist GDF-5. Er scheint bei der Gewebekonstruktion von Sehngewebe [173], Knorpelgewebe, bei der Zahnbildung [174] und bei der Neuronendifferenzierung [175] mitzuwirken [176].

GDF-5 ist auch bekannt als *Bone Morphogenetic Protein 14* (BMP-14), *Morphogenic protein MP52* und *Cartilage-derived Morphogenetic Protein 1* (CDMP-1) [177]. Wie diese Namen bereits vermuten lassen, wurden die Effekte dieses Faktors vor allem im Zusammenhang mit der Osteo- und Chondrogenese beschrieben [178]. Deshalb wurde bisher vor allem der mögliche Nutzen von GDF-5 im Zusammenhang mit der Heilung von Frakturen untersucht.

Yamashita et al. stellten bereits 1997 fest, dass GDF-5 im *in vivo* Experiment die Angiogenese induziert [179]. Dieser Effekt, so beschrieben sie, könnte entweder durch direkte Wirkung auf die endothelialen Zellen entstehen oder aber durch indirekte Wirkung auf Endothelzellen durch umliegende Zellen [179]. Hinweis auf eine direkte Wirkung liefert das Vorhandensein von Rezeptoren für BMPs an den von ihnen untersuchten endothelialen Zellen [179].

GDF-5 scheint außerdem antiapoptotische Wirkung in Fibroblasten aufzuweisen, was an Mäuse-Embryonen getestet wurde [180]. Dieser Mechanismus scheint über Stabilisierung des Apoptose-Inhibitors XIAP zu funktionieren [180]. Wie so viele Funktionen dieser Wachstumsfaktoren, scheint auch die Apoptose durch BMPs entweder inhibiert oder gefördert zu werden. So wirkt BMP2 inhibierend [181]. Die oben bereits erwähnte neurotrophe Wirkung von GDF-5 stellt einen Lichtblick für die Behandlung von Parkinson dar [175, 182]. Es wird vermutet, dass der beschriebene antiapoptotische Effekt dabei

neuroprotektiv wirkt, was, unter anderem, durch die apoptosedarstellende TUNEL-Färbung (*terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) *dUTP nick-end labeling*) sichtbar gemacht wurde [183].

Auch scheint GDF-5 mesenchymale Zellen zur Produktion von Glykosaminoglykane und Kollagen, also der extrazellulären Matrix, anzuregen [176]. Auch Fibroblasten konnten mit GDF-5 zur Bildung von Kollagen sowie zur Differenzierung in eine chondrogene Linie stimuliert werden [184, 185].

In Sehngewebe wurde ebenfalls dieser stimulierende Effekt auf Fibroblasten in Bezug auf Migration, Proliferation sowie Kollagensynthese nachgewiesen [173, 186]. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Kombination aus GDF-5 und bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) die Proliferation und Migration von Fibroblasten sowie die Synthese von Kollagen Typ I anregt [187].

Dass der Faktor für die Sehnenheilung von essentieller Bedeutung ist, wurde in GDF-5 defizienten Mäusen ermittelt, da hier eine längere Zeit benötigt wurde, um Revaskularisierung, Zelldichte sowie den gleichen Gehalt an Glykosaminoglykane und Kollagen zu erreichen [188]. Ein Verlust von GDF-5 scheint außerdem eine Verkleinerung des Durchmessers [189] und einen höheren Anteil irregulär geformter Kollagenfibrillen zu begünstigen [190]. Daher kann vermutet werden, dass er einen entscheidenden Faktor in der Kollagen Fibrillogenese darstellt [190]. Kollagen ist im Zusammenhang mit der dermalen Wundheilung besonders wichtig, da es den größten Bestandteil der extrazellulären Matrix ausmacht [191, 192]. Es scheint der Haut ihre Stärke zu geben und für die Organisation der Matrix zu sorgen [177], während Elastin für Flexibilität und Proteoglykane für Hydratation zuständig sind [80].

Der Effekt von GDF-5 auf die extrazelluläre Matrix wurde bereits an dermalem Gewebe mit Hilfe von GDF-5 überexprimierten Mäusen getestet [177]. Es konnte hier eine starke Vermehrung von Proteinen der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden [177]. Dies betraf Kollagen Typ I, III und IV, Elastin, Fibrillin-2 und Decorin [177]. Zudem war eine Verstärkung der Basalmembran, eine Erhöhung des Hyaluronsäureanteils sowie eine Verminderung der epidermalen Dicke ersichtlich [177]. Vergleichbare Effekte wurden darüber hinaus auch bei direkter Applikation von 1g/ml oder 10g/ml auf die Haut festgestellt [177].

Vorarbeiten von Schiefer et al. 2017 untersuchten bereits die Auswirkung von GDF-5 auf die Heilung von Wunden [193]. Dabei wurden Minischweinen chirurgisch standardisierte Wunden zugefügt, die mit einer Gelatine-Kollagen-Matrix behandelt wurden, in die der Faktor GDF-5 in 3 verschiedenen Konzentrationen integriert wurde [193]. Nach 21 Tagen wurden Biopsien entnommen, an denen eine histologische Untersuchung mit Hämatoxylin-Eosin und Masson Trichrom Färbungen durchgeführt wurde [193]. In allen 3 Konzentrationen (100, 1000 und 5000ng/qm) zeigte sich ein beschleunigter Wundverschluss, eine dickere Epidermis sowie eine erhöhte Zahl epidermaler Zellen [193]. Die Unterschiede in Dicke der Epidermis und epidermaler Zellzahl waren allerdings nur bei den Konzentrationen 100 und 1000ng/qm, nicht aber bei 5000ng/qm von signifikanter Größe [193].

Die Idee GDF-5 als mögliche Behandlungsoption für Verbrennungswunden zu nutzen, wurde schon in einem weiteren Versuch beschrieben [77]. Hier wurden im *in vivo* Schweinmodell Läsionen mit dem Dermatom geschaffen, die bis in die oberflächliche Dermis reichten und somit Verbrennungen zweiten Grades imitierten [77]. Die Ergebnisse ließen einen positiven Effekt von rhGDF-5 auf die Wundheilung

insbesondere auf Reepithelialierung, Organisation des Granulationsgewebes sowie Proliferation und Migration vermuten [77]. Die Analyse der Haut erfolgte in diesem Modell erst nach neun Tagen, ohne Hinweise auf die tägliche Entwicklung zu geben [77]. Zudem bleibt offen, ob eine derartige Behandlung ebendiesen Effekt auch auf menschlicher Haut zeigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TGF- β Superfamilie mit ihren zahlreichen Faktoren eine vielversprechende Aussicht für die Behandlung von Wunden, Verbrennungswunden im Speziellen, darstellt. Besonders interessant erscheint hierbei die Wirkung des Faktors GDF-5. Es lässt sich durch die hier beschriebenen Forschungsergebnisse vermuten, dass er, durch seine Fähigkeit die extrazelluläre Matrix zu regenerieren sowie die Angiogenese zu induzieren, einen Lichtblick für die Behandlung von schweren und großflächigen Verbrennungswunden darstellt.

1.5 Herleitung der Fragestellung und Ziele der Arbeit

Verbrennungswunden stellen auch im heutigen Zeitalter eine große Herausforderung an Kliniker, da die Folgen weitreichend und die Interventionsmöglichkeiten begrenzt sind [71, 78].

Wachstumsfaktoren, insbesondere Mitglieder der BMP-Familie, stellen wichtige Modulatoren der Wundheilung dar [151]. Einige dieser Faktoren wurden bereits klinisch angewendet [164, 168].

GDF-5 ist ein Faktor dieser Familie [177]. Er scheint in den wichtigsten Schritten der Wundheilung positiv einzugreifen, insbesondere in der Angiogenese, Reepithelialisierung und Proliferation der extrazellulären Matrix [77, 176, 179, 193]. Es gibt Hinweise, dass dieser Faktor ebenfalls einen positiven Effekt auf die Wundheilung von Verbrennungswunden zu haben scheint [77].

Genau diese Frage soll das von uns durchgeführte Experiment beantworten. Im Speziellen wird untersucht, ob die wichtigsten Schritte der kutanen Wundheilung (Angiogenese, Myofibrinogenese, Reepithelialisierung und Proliferation der Keratinozyten) durch die Applikation von GDF-5 unterstützt und beschleunigt werden können und ob dieser Faktor sogar den Effekt des Nachbrennens verhindern kann.

2 Methodik:

2.1 Erzeugung der Gewebeproben

2.1.1 Herkunft der Gewebeproben

Da es sich bei der hier beschriebenen Arbeit um eine Kooperation der Universität Witten/Herdecke sowie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf handelt, werden Anträge auf ein Ethikvotum an beide Institutionen gestellt und bewilligt (Universität Witten/Herdecke: Antrag Nummer 78/2017; Heinrich-Heine-Universität: Studiennummer 3634)

Für das *ex vivo*-Verbrennungsmodell erhalten wir menschliche abdominale Vollhaut von drei verschiedenen, weiblichen Spendern (n=3) (A= 36 Jahre, B= 53 Jahre, C= 46 Jahre, Median 46 Jahre, Mittelwert 45 Jahre) aus dem Operationssaal der plastischen Chirurgie des Krankenhauses Köln-Merheim. Die Haut stammt von Abdominoplastiken.

2.1.2 Vorbereitung Hautlappen

Die Kutis wird zunächst mit einem Skalpell vom subkutanen Fettgewebe weitestgehend abgetrennt (Abb. 7). Die Haut wird auf einem mit Alufolie umwickeltem Styroporstück mithilfe von sterilen Nadeln aufgespannt. Eine Petrischale, die unter die Haut geschoben wird, dient als Widerlager.

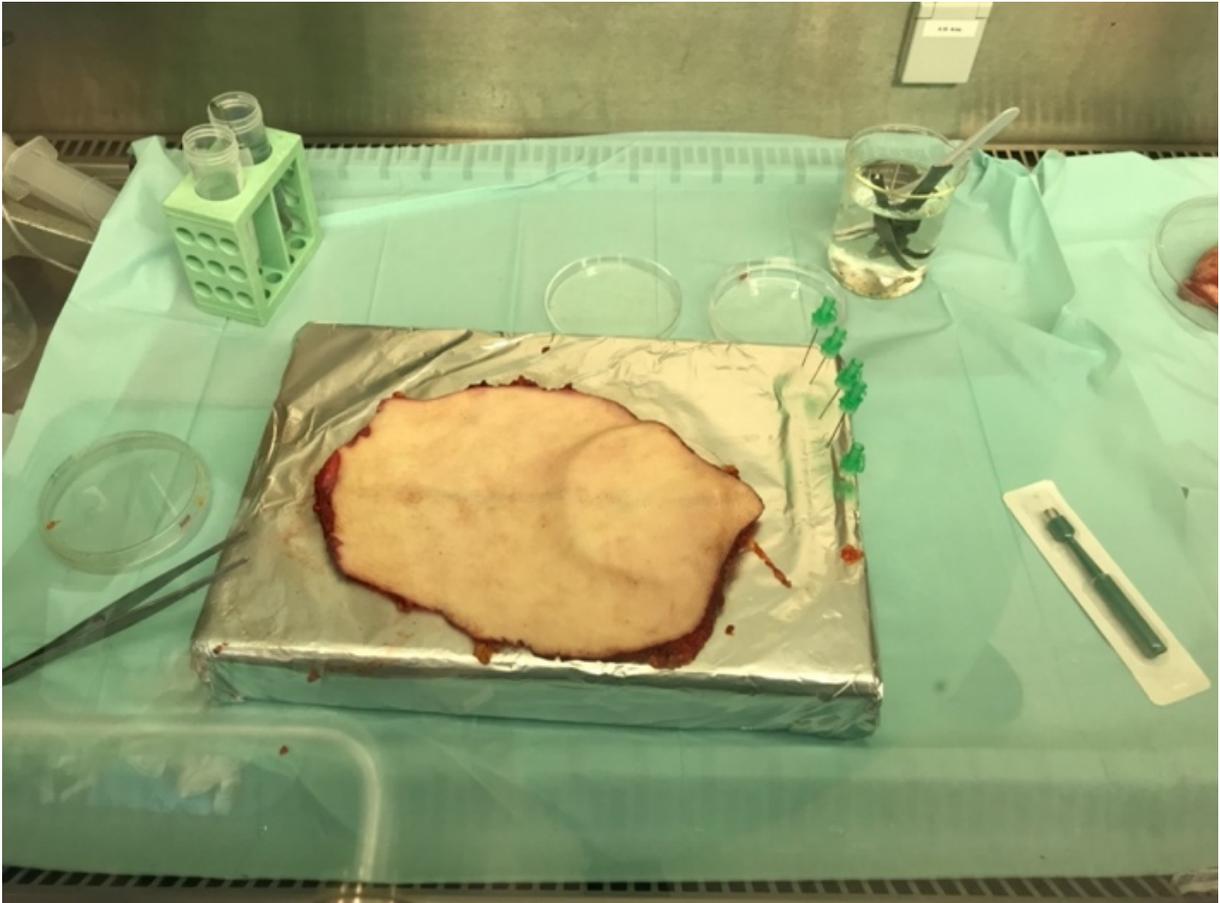


Abb. 7: **Präparation des Hautlappens**

Abb. 7: Die Subkutis wurde bereits von der Kutis gelöst. Um ein Stück Styropor wird Alufolie gewickelt und die präparierte Haut daraufgelegt (im nächsten Schritt außerdem durch Nadeln befestigt). Eine Petrischale wird als Widerlager genutzt und unter den Hautlappen geschoben.

Um einen thermischen Schaden zu erzeugen, wird ein Wärmeüberträger genutzt. Bei diesem handelt es sich um einen Kupferzylinder, welcher an der Spitze einen Durchmesser von rund 3mm trägt. Das Gesamtgewicht des Kupferstempels liegt bei circa 646g. Um die Hautlappen punktuell zu verbrennen, wird der Kupferstempel unmittelbar vor seinem Einsatz im Wasserbad erhitzt.

Zunächst werden in einem Vorversuch verschiedene Temperaturen und Expositionszeiten der Verbrennung evaluiert. Getestet werden dabei Verbrennungen mit Temperaturen von 70, 80 und 90 °C und mit einer Dauer von 5 oder 10 Sekunden. Anschließend werden HE-Färbungen zum Vergleich erzeugt. Da bei den Temperaturen von 70 und 80°C sowie bei 90°C für 5 Sekunden kaum Veränderungen zu sehen sind und wir mindestens Verbrennungen des Grades IIa erzeugen möchten, entscheiden wir uns für die

standardisierte Verbrennung aller Präparate mit 90°C und einer Kontaktzeit von 10 Sekunden. In der Literatur wurden bereits ähnliche Herangehensweisen etabliert und dienen als Vorlage für die ausgewählte Temperatur und Dauer [194-197].

Das Wasserbad wird auf circa 93°C erhitzt, damit die Verbrennung bei einer Temperatur von circa 90°C erfolgen kann. Der Kupferstempel wird ein bis zwei Minuten lang ins erhitzte Wasser gehalten, damit er die geeignete Temperatur annimmt. Diese wird mithilfe eines Thermometers sichergestellt. Anschließend wird der Stempel aus dem Wasserbad entnommen und abgetrocknet, damit möglichst nur Verbrennungen und keine Verbrühungen entstehen. Das Kupfer wird genau 10 Sekunden mit Eigengewicht auf die Haut gehalten, der dabei ausgeübte Druck entspricht circa 2,1bar. Beim Setzen der Verbrennung wird steril vorgegangen (Abb. 8). Anschließend wird der Stempel zurück ins Wasserbad gesetzt, um für **Erzeugung** die nächste Verbrennung erhitzt werden zu können.

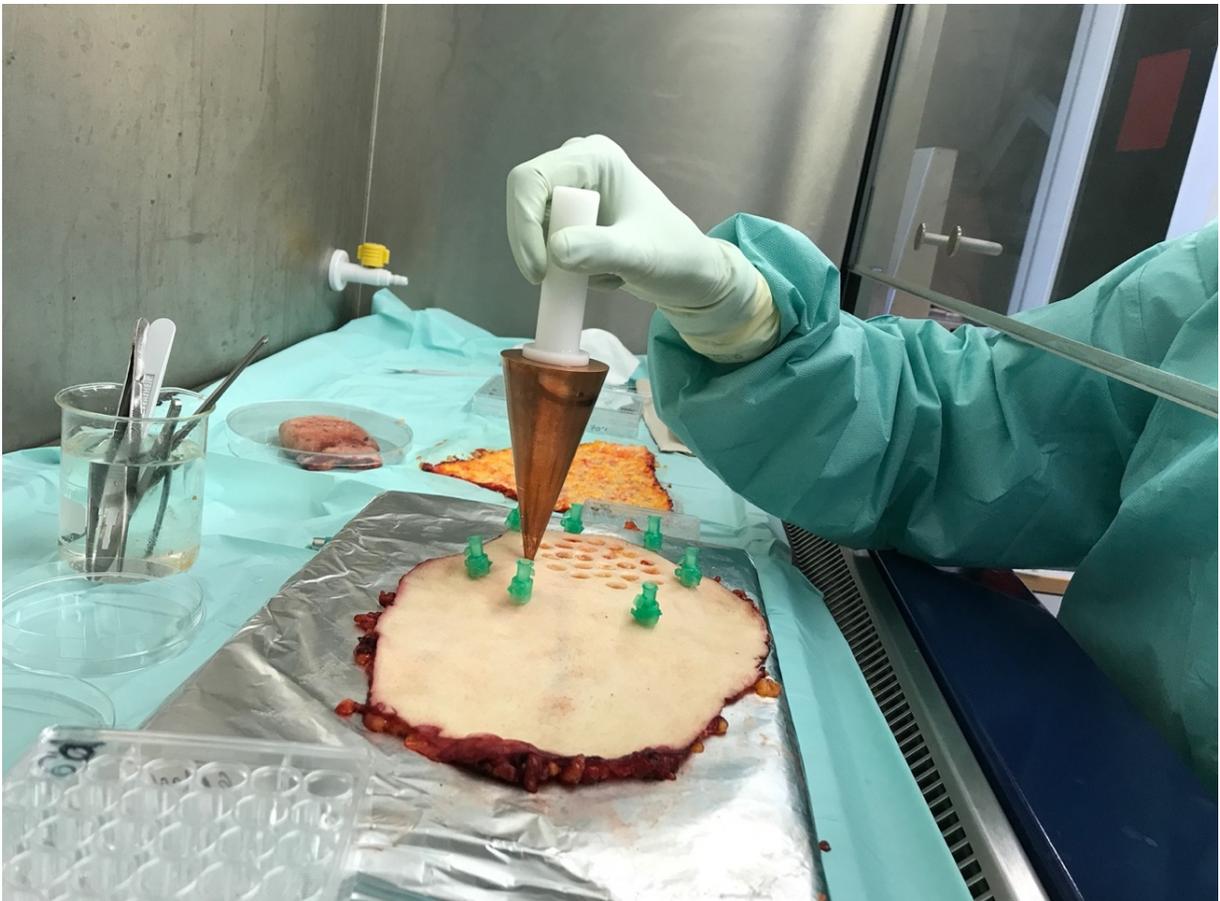


Abb. 8: **Erzeugung der Verbrennungswunde**

Abb. 8: Die Verbrennungswunde wird steril mit Hilfe eines im Wasserbad erhitzten Kupferstempels erzeugt.

Währenddessen wird mit einer 8mm großen Stanze die Verbrennungswunde, die makroskopisch kreisrund zu erkennen ist, ausgestanzt, sodass diese im Zentrum der Stanze liegt (Abb. 9).



Abb. 9: Ausstanzen der Verbrennungswunde

Abb. 9: Ausstanzen der erzeugten Verbrennung, Durchmesser 8mm

Die Stanze wird sofort in Medium, bestehend aus 50mL 10 % FCS (*fetal calf serum*), 10mL Penicillin/Streptomycin (Pen-Strep), 1ml Amphotericin B und 5ml HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid), gelegt.

Für jeden Zeitpunkt existieren 8 Stanzen: +GDF-5 in 5 μ g/mL; +GDF-5 in 1 μ g/mL, -GDF-5 (nur Medium, ohne GDF-5 aber mit Verbrennungswunde), Kontrolle (ohne GDF-5, ohne Verbrennungswunde) und jede der genannten Stanzen für die PCR-Untersuchung (im Folgenden „PCR-Stanzen“) (Abb. 10). Da es zwischenzeitlich Lieferschwierigkeiten des Wachstumsfaktors gibt, wird die Untersuchungsreihe von Spender A nach 6 Tagen beendet. Außerdem wird die Behandlung mit 5 μ g/mL GDF-5 dieses Spenders aus diesem Grund bereits nach 3 Tagen beendet.

Von der verbrannten Haut des Spenders A, die nicht mit GDF-5 behandelt wird, existieren keine Ergebnisse der KI-67-Antikörperfärbung zum Zeitpunkt von 9 Tagen, da die zugehörigen Präparate beim Färben im Verlauf zerreißen.

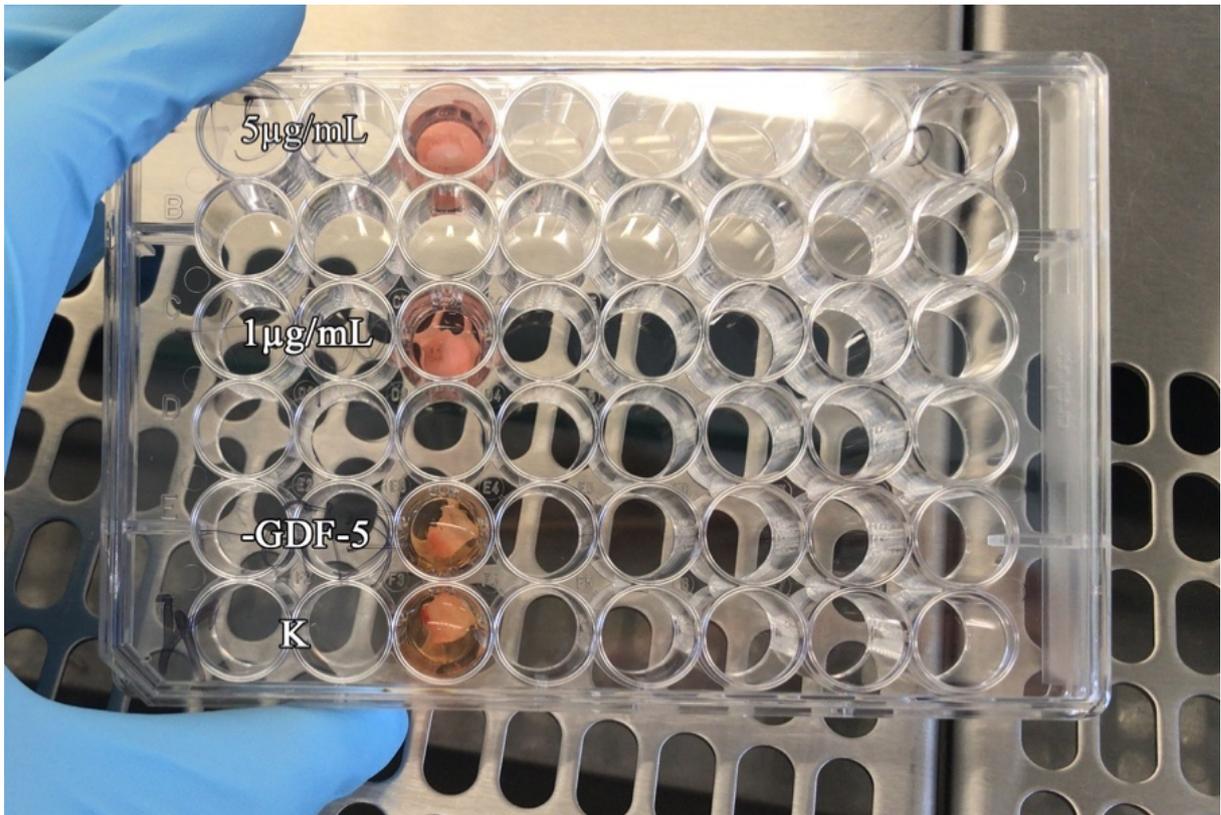


Abb. 10: Well-Platte mit Stanzen im Medium

Abb. 10: Stanzen mit verschiedenen Behandlungen (5µg/mL GDF-5, 1µg/mL GDF-5, -GDF-5/reine Verbrennung, K/Kontrolle)

Abb.11 fasst das Erzeugen der Verbrennungswunden sowie das Ausstanzen und die Vitalerhaltung im Medium zusammen.

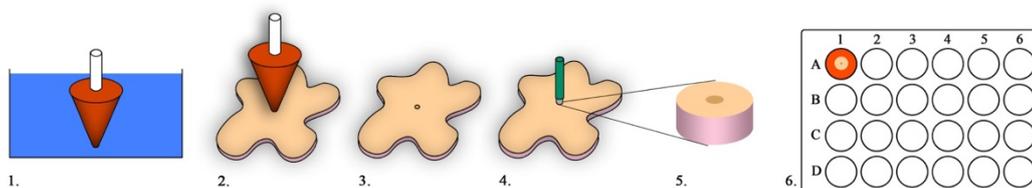


Abb. 11: Erzeugung der Verbrennungswunden und Vitalerhaltung der Haut im Medium

Abb. 11:

1. Erhitzen des Kupferstempels auf 90°C im Wasserbad
2. Erzeugen einer Verbrennungswunde auf dem Hautlappen für 10 Sekunden unter Eigengewicht des Stempels
3. Kreisrunde Verbrennungswunde makroskopisch zu sehen
4. Ausstanzen der Verbrennungswunde
5. Hautstanzen mit der Verbrennungswunde im Zentrum
6. Vitalerhaltung der Haut im Medium bestehend aus 50mL 10 % FCS, 10mL Penicillin/Streptomycin (Pen-Strep), 1ml Amphotericin B und 5ml HEPES, welchem entweder GDF-5 zugefügt wird oder nicht

2.1.3 Mediumhaltung und Einbettung

Die in 24 Well-Platten befindlichen Stanzen werden bis zu 12 Tage im 37°C warmen Brutschrank gehalten. Das Medium (inklusive des GDF-5 beigesetzten Mediums) wird alle zwei Tage gewechselt. In verschiedenen Zeitabständen werden die Stanzen dem Medium entnommen und über Nacht in Formalin eingebettet. Zuvor wurden verschiedene Inkubationszeiten für das Formalin getestet. Die Inkubation für 24 Stunden ergibt Präparate, die sich im Anschluss optimal verarbeiten lassen. Längere Zeiten erbringen in Vorversuchen besonders feste Präparate, die das Schneiden mit dem Mikrotom behindern. Für die PCR-Stanzen werden an den gegebenen Zeitpunkten nur die verbrannte Haut mit 2mm Stanzen ausgestanzt und bei -80°C in Eppendorfgefäßen gelagert.

Nachdem die Stanzen über Nacht in 3.7-4.0% Formalin verweilen, werden sie mit dem Gewebeeinbettautomaten entwässert. Dabei wird folgende Geräteeinstellung vorgenommen:

Position 1: Formalin 1 Stunde

Position 2: Formalin 1 Stunde

Position 3: 70% Ethanol 1 Stunde

Position 4: 90% Ethanol 1 Stunde

Position 5: 100% Ethanol 1 Stunde

Position 6: 100% Ethanol 2 Stunden

Position 7: 100% Ethanol 2 Stunden

Position 8: Xylol 1 Stunde und 45 Minuten

Position 9: Xylol 1 Stunde und 45 Minuten

Position 10: Xylol 1 Stunde und 30 Minuten

Position 11: Paraffin 2 Stunden

Position 12: Paraffin 2 Stunden und 30 Minuten

Anschließend werden die Stanzen in Paraffin eingebettet. Bei der Einbettung wird das Gewebe in 3 Scheiben geschnitten, die mittlere Scheibe schließt die Verbrennungswunde mitsamt ihren Wundrändern exakt ein und ist somit am interessantesten für die weitere Verarbeitung. Die Scheiben werden in das Einbettgeschälchen gelegt, sodass die später entstehenden Schnitte einen Querschnitt durch Epidermis und Dermis (und somit aller Hautschichten) darstellen. Während das Gewebe mit einer Pinzette in dieser Position gehalten wird, überschwemmt man es mit Paraffin und drückt anschließend den Boden einer Einbettkassette auf den heißen Wachs. Die Kassetten werden für mindestens 2 Stunden bei circa -10°C auf eine Kühlplatte gelegt und anschließend bei 4°C im Kühlschrank für mindestens einen Tag bis zur Nutzung verwahrt.

2.1.4 Schneiden des Gewebes

Vor dem Schneiden werden die Schnitte bei circa 15°C auf besagter Kühlplatte gekühlt. Nach dem Einspannen der Präparate ins Mikrotom werden diese in 5µm dicke Scheiben geschnitten und im 30°C warmen Wasserbad aufgefangen, um anschließend auf die Objektträger gezogen zu werden. Die Objektträger werden über Nacht im 60°C warmen Heizschrank gehalten.

Abb. 12 fasst die Bearbeitung der Stanzen zusammen.

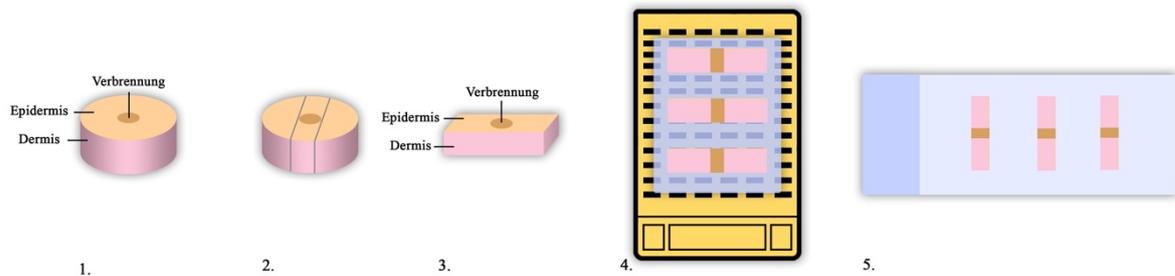


Abb. 12: **Erzeugung der Paraffinschnitte**

Abb. 12:

1. Stanze mit Verbrennung im Zentrum
2. Stanze mit Schnittlinien, an denen mithilfe eines Skalpells geschnitten wird
3. Stanze, nachdem sie mit dem Skalpell zurechtgeschnitten wurde
4. In Paraffin eingebettete Stanzen
5. Schnitte auf dem Objektträger, nachdem sie mit dem Mikrotom geschnitten wurden

2.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen:

2.2.1 Vorbereitung der Präparate für die Färbungen:

Die Schnitte werden zur Entparaffinierung nach laborinternem etabliertem Protokoll 20 Minuten in Xylol gehalten, anschließend 10 Minuten in 100% Ethanol, 10 Minuten bei 95% Ethanol, 10 Minuten bei 70% Alkohol und 5 Minuten in PBS gehalten.

Als Nächstes erfolgt die Antigendemaskierung. Ein Citratpuffer wird hergestellt. Dazu werden 21.01g (0,1M) Zitronensäure und 29.42g (0,1M) Natriumcitrat in jeweils eine Flasche abgefüllt. Anschließend wird 9mL der Zitronensäure (Stammlösung A) mit 41mL des Natriumcitrats (Stammlösung B) in 450mL destilliertem Wasser vermischt. Der pH-Wert des Puffers wird stets auf 6 abgestimmt. Eine Küvette, die Citratpuffer enthält, wird in den Dampfgerar gestellt und dieser 10 Minuten vorgeheizt. Anschließend werden die entparaffinierten Schnitte für 60 Minuten hineingestellt. In einem Vorversuch werden zunächst die Probepräparate für entweder 30 oder für 60 Minuten im Dampfgerar gehalten und die Resultate anschließend mikroskopisch untersucht. Dies schafft die Grundlage, bei allen weiteren Präparaten eine Dauer von 60 Minuten zu verwenden.

Nach verstrichener Zeit wird die Küvette circa 30 Minuten in Eis abgekühlt.

2.2.2 Färbung der Schnitte

Zur Verhinderung der Austrocknung der Schnitte erfolgen die einzelnen Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer.

Die Objektträger werden in einer Küvette dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. 3%iges BSA wird in einem Falcon gemischt, dazu werden 1,5g BSA mit 50mL PBS vermischt. Dieses wird zum Blocken der Schnitte verwendet. Zur Permeabilisierung wird 0,03%iges Triton erzeugt, indem 10mL PBS mit 3 μ L Triton gemischt werden. In einem Versuch wird zuvor ebenfalls die Verdünnung zu 0,15% Triton sowie das Auslassen der Triton Behandlung getestet. Unter mikroskopischer Begutachtung der Ergebnisse entscheiden wir uns für die hier angegebene Konzentration.

Die Schnitte werden nun mit einem Fettstift umkreist, damit sich die Flüssigkeiten nicht auf dem gesamten Objektträger verteilen, sondern nur auf den Präparaten befindlich sind. Triton wird für 10 Minuten bei Raumtemperatur darauf gegeben. Die Schnitte werden dabei in einer feuchten Kammer gehalten. Anschließend wird das Triton abgeschüttelt und BSA auf die Schnitte gegeben, welches dort für 30 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer verweilt. Danach wird auch das BSA abgeschüttelt und die Antikörperverdünnungen (mit BSA verdünnt) werden aufgetragen. Parallel wird ein Präparat einer Tonsille als Positivkontrolle mitgefärbt.

Die einzelnen Antikörper und ihre Funktion werden in Tabelle 1 aufgeführt.

Für die Konzentrationen der verschiedenen Antikörper sowie deren Einwirkzeiten testen wir in Anlehnung an die jeweiligen Datasheets verschiedene Zeiten und Verdünnungen für jeden Antikörper aus. Der CD-31-Antikörper wird dabei in den Verdünnungen 1:50, 1:25 sowie 1:100 für je 20 Minuten, eine Stunde oder über Nacht bei 4°C getestet. Der KI-67-Antikörper wird in den Konzentrationen 1:100, 1:200, 1:250 und 1:300 verwendet und die Einwirkzeiten 20, 35 und 60 Minuten werden ausprobiert. Der α -SMA-Antikörper wird im Verhältnis 1:400, 1:200, 1:600, 1:300, 1:800 verdünnt und für je 20, 60 Minuten sowie über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Involucrin-Antikörperfärbung wird in den Konzentrationen 1:100, 1:200, 1:300 sowie 1:400 für 30 Minuten oder über Nacht bei 4°C getestet. In Tabelle 2 sind die Vorversuche mit den einzelnen Antikörpern zu Zwecken der Übersicht aufgeführt. Nach Mikroskopieren der erzeugten Präparate entscheiden wir uns für die im Folgenden angegebenen Konzentrationen und Einwirkdauern.

Die ursprünglich geplante Verwendung des Angiogenesemarkers vWF wird verworfen, da nach Testung der Konzentrationen 1:100, 1:600, 1:1500, 1:2000, 1:4000 immer noch keine Färbungen produziert werden kann, die aussagekräftig und nicht vollkommen überfärbt ist. Die Verdünnung wird jeweils mit 3%igen BSA durchgeführt. Zur Darstellung der Angiogenese wird ein Antikörper gegen CD-31 verwendet [24]. Dieser wird in einer Konzentration von 1:100 (in BSA verdünnt) für eine Stunde auf das Präparat gegeben.

Zur Darstellung der Keratinozyten wird ein Antikörper gegen Involucrin verwendet und in einer Konzentration von 1:300 über Nacht bei 4°C auf die Schnitte aufgetragen [198, 199].

Fibroblasten werden sichtbar mit Hilfe des Antikörpers gegen α -SMA [64]. Dieser wird in einer 1:800 Verdünnung für 20 Minuten auf den Schnitt gegeben.

Zum Nachweis der Proliferation dient der Antikörper gegen KI-67 [200]. Dieser wird in einer 1:200 Konzentration für 20 Minuten auf die Präparate gegeben.

Nach dem Auftragen des Erstantikörpers werden die Schnitte 3-mal je 5 Minuten in PBS gewaschen (dabei wird die Küvette mit den darin befindlichen Objektträgern stets bewegt). Die Schnitte werden anschließend 15 Minuten im Phosphatpuffer gehalten.

Die Färbung erfolgt mit dem *Dako REALtm Detection System*. Für das Dako Färbekit entscheiden wir uns, da es gegenüber der anderen zunächst getesteten Verfahren (Fluoreszenzfärbung und DAB System) die anschaulichsten Ergebnisse liefert, indem es die Antikörperbindungen rot färbt.

Protokollgerecht wird nun das Fläschchen A (biotinylierte Ziege-Anti-Maus- und Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobuline) für 15 Minuten aufgetragen. Anschließend erfolgt eine erneute 15-minütige Waschung in frischem Phosphatpuffer. Nun wird Fläschchen B für 15 Minuten aufgetragen (an alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin). Erneut wird 15 Minuten mit frischem Phosphatpuffer gewaschen. Es folgt die Auftragung des Farbstoffes, *Chromogen Red*, der sich aus 3 Komponenten zusammensetzt, die zunächst gemischt werden müssen.

Nach dieser protokollgerechten Färbung werden die Schnitte circa 5 Minuten in Aqua dest (destilliertes Wasser) gehalten und danach für 3 Minuten in Hämalun gefärbt. Es folgt eine kurze Spülung für 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Anschließend werden die Schnitte mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquatex eingedeckt.

In Vorversuchen werden die Einwirkdauern 1, 2 und 3 Minuten des Hämaluns getestet. Die Dauer von 3 Minuten liefert die bestmögliche Gegenfärbung, da die anderen Zeiten zu kurz und die Färbungen daher zu blass erscheinen.

In unserem Modell werden die Stanzen in Paraffin eingebettet und anschließend zu 5µm dünnen Schnitten verarbeitet. Diese Methode hat zur Folge, dass ein Schnitt entweder aus dem Rand der Stanze stammen kann und somit weder die Verbrennung, noch den direkten Wundrand beinhaltet, direkt aus dem Zentrum der Verbrennung stammen kann und somit mutmaßlich mehr zerstörtes Gewebe enthält oder aus dem unmittelbaren Wundrand stammt und somit hier mutmaßlich am meisten Wundheilung stattfindet.

Dies hat zur Folge, dass je nachdem, aus welchem Bereich der Schnitt stammt, Unterschiede in den Parametern erwartet werden. Um diese Fehlerquellen möglichst gering zu halten, werden für jedes Präparat mehrere Schnitte produziert.

Wir streben an, von jeder Stanze mindestens drei Schnitte zu erzeugen. Da auf den Objektträgern manchmal mehr Schnitte im Wasserbad aufgefangen werden (vergleiche Schritt **Schneiden des Gewebes**) und da einige Schnitte während der Färbungen zerreißen und daher nicht mehr verwertbar sind, kann die feste Anzahl von drei Schnitten allerdings nur teilweise eingehalten werden.

2.3 Digitalisierung und Auswertung der Präparate

2.3.1 Digitalisierung der Präparate

Die Präparate werden mithilfe des ZEISS Axio Scan Gerätes im Hellfeldmikroskop digitalisiert. Dabei werden folgende Einstellungen verwendet:

Image Dimension:

Scaling (per Pixel): 0,441 μ m x 0,441 μ m

Bit Depth: 24 Bit

Acquisition Information:

Microscope: AxioScan.Z1

Objective: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27

Contrast Method: Brightfield

Light Source Intensity: 265%

Channel Name: TL Brightfield

Imaging Device: Hitachi-HV-F202SCL

Camera Adapter: 1x Camera Adapter

EM Gain: 0

Exposure Time: 200 μ s

Depth of Focus: 5,43 μ m

Binning Mode: 1,1

Teilweise gibt es Unebenheiten in den Präparaten, die dazu führen, dass diese nur verschwommen gescannt werden. Wir schließen diese Schnitte von der anschließenden Analyse aus.

2.3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Insgesamt produzieren wir 1590 immunhistochemisch gefärbte Schnitte. Aufgrund dieser enormen Menge entscheiden wir uns für eine quantitative Auswertung der Präparate. Die Firma Biovoxxel wird daher von uns beauftragt, ein *Macro* für das Programm Fiji (Version heruntergeladen am 21.12.2019), welches hier im Anhang hinterlegt ist, zu programmieren. Das *Macro* ermöglicht, dass nicht jeder Schnitt einzeln ausgewertet wird, sondern eine standardisierte Auswertung für alle Schnitte durchgeführt wird. Dies stellt nicht nur eine große Erleichterung der Arbeit dar, sondern verhindert auch, dass sich Fehler in der Auswertung einzelner Schnitte einschleichen.

Das *Macro* berechnet die rot gefärbte Fläche pro Gesamtfläche in Prozent für die Antikörperfärbungen mit CD-31, KI-67, Involucrin und α -SMA. Für CD-31 gibt es darüber hinaus ein weiteres *Macro*, welches die Anzahl der roten Flächen und somit die Anzahl der Gefäße zählt.

Für die Analyse mit Fiji muss man zunächst einen Farbbereich definieren, den das Programm erkennen soll. Wichtig hierfür ist, dass dieser sich deutlich vom Hintergrund und damit der Gegenfärbung

abgrenzt, was durch die intensive Rotfärbung, die durch das von uns gewählte Färbekit gewährleistet ist, in unseren Präparaten ermöglicht wird. Das von Experten geschriebene *Macro* wird dabei für alle Präparate gleich eingestellt, um vergleichbare und damit auswertbare Ergebnisse zu erhalten.

Zunächst werden mithilfe einiger Beispielbilder, die die Farbvarianz darstellen, optimale Einstellungen ermittelt. An ihnen wird, nachdem sie in den HSB Farbraum umgewandelt werden, in den drei Kanälen für Farbton, Saturierung und Helligkeit die Einstellungen so definiert, dass möglichst viele der zu ermittelnden Pixel registriert werden. Die Pixel, die in allen drei Bereichen positiv sind, werden anschließend ermittelt. Dieses Verfahren mit den so bestimmten Einstellungen (*Hue*:180-255, *Saturation*: 100-255, *Brightness*: 0-255) wird bei allen auszuwertenden Präparaten in gleicher Weise durchgeführt.

Für die Antikörper gegen KI-67, α -SMA und Involucrin werden dabei für die Einstellung „*min. saturation*“ ein Wert von 100, für „*max. brightness*“ ein Wert von 255 und für „*min. stained area (pixel)*“ ein Wert von 5 verwendet. Für den Antikörper gegen CD-31 werden die gleichen Einstellungen verwendet und zusätzlich für die Anzahl der gefärbten Flächen die Einstellung „*CD-31 separation control*“ auf 2 festgelegt. Diese definiert, ab wann zwei Bereiche, die nebeneinander liegen, als eine Fläche registriert werden und bis wann sie separat gezählt werden.

Die Einstellungen werden mit Biovoxxel zusammen erarbeitet, indem man verschiedene Werte ausprobiert und sich für die Werte entscheidet, die den Großteil der gewünschten Bereiche aufzeichnet, ohne dabei unspezifisch zu werden.

Die Präparate, die mit dem Antikörper gegen KI-67 bearbeitet werden, bringen das Problem, dass die verbrannte und damit abgestorbene Haut ebenfalls rot gefärbt wird. Darüber hinaus sind einige Kerne deformiert, was im Zusammenhang mit thermischen Wunden bereits beschrieben wurde [201]. Da dieser Fehler bei allen dieser Präparate auftaucht, entscheiden wir uns, ein weiteres *Macro* vor der Bestimmung der roten Flächen vorzuschalten, welches ebenfalls im Anhang zu finden ist. So werden die falsch positiven Bereiche und die deformierten Nuclei von der Analyse ausgeschlossen, was mit dem Vorgehen in der Literatur übereinstimmt [201]. Zur Veranschaulichung wird dieses Vorgehen in Abb. 13 dargestellt.

Mit diesem Verfahren wird bei allen 377 KI-67-Färbungen das Zentrum der Verbrennung markiert und vor der späteren Berechnung ausgeschnitten. Hierbei wird meist das Werkzeug *Rotated Rectangle* genutzt, bei besonders zerrissenen Präparaten der Bereich mit dem Werkzeug *Polygon selection* frei transformiert. Dabei wird nicht nur die Epidermis, sondern auch die darunter befindliche Dermis, möglichst rechteckig ausgeschnitten.

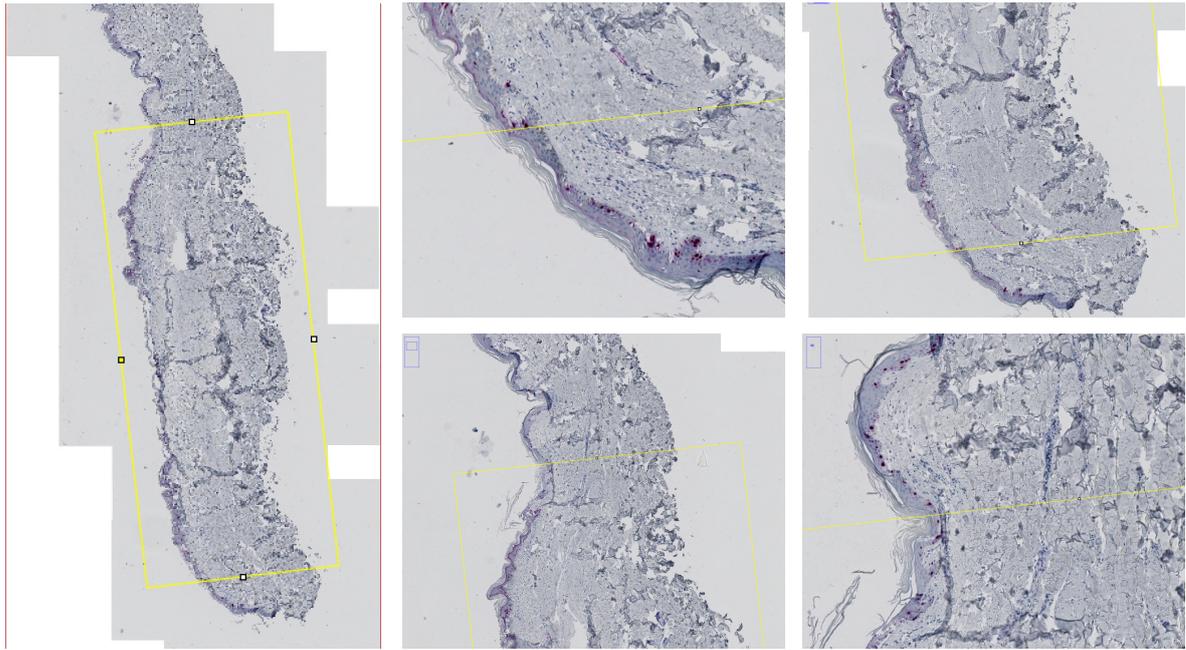


Abb. 13: Vorgeschaltetes Macro für KI-67-Färbungen

Abb. 13: Hier sieht man die Verwendung des vorgeschalteten *Macros* für die KI-67-Antikörperfärbung anhand des Beispiels einer Stanze, die von Spender B stammt und mit $1\mu\text{g}/\text{mL}$ GDF-5 für 6 Stunden behandelt wurde. Dargestellt ist die Verwendung des *Rotated Rectangle-Tools*

2.3.3 Statistische Analyse der Ergebnisse

Zur Auswertung der mit Fiji bestimmten Rohdaten der immunhistochemischen Färbungen, die entweder die Fläche oder die Anzahl der rotmarkierten Bereiche angeben, werden zunächst alle Werte pro Zeitpunkt mit dem Programm Microsoft Excel (Version: 16.30) in Tabellen sortiert und der Mittelwert sowie die Standardabweichung für jeden der Spender A, B und C und für jede Behandlung pro Zeitpunkt bestimmt (Abb. 14). Zudem werden die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle drei Spender berechnet (Abb. 15).

positive Fläche/Gesamtfläche als Reaktion auf die Behandlungen mit:				
	1µg/mL GDF-5	5µg/mL GDF-5	- GDF-5	Kontrolle
Schnitt 1	0,245278	0,230089	0,153879	0,138757
Schnitt 2	0,251719	0,198161	0,160061	0,17449
Schnitt 3	0,173756	0,197234	0,165545	0,138757
Schnitt 4	0,2344	0,81206	0,154779	0,17449
Ergebnisse				
MW	0,22628825	0,359386	0,158566	0,1566235
Stabw	0,035743398	0,302168957	0,005392921	0,020630457

Abb. 14: Auswertung am Beispiel für Spender A der Färbung mit α -SMA nach 6 Stunden

Fläche/Gesamtfläche aller Spender als Reaktion auf die Behandlung mit:				
	1µg/mL GDF-5	5µg/mL GDF-5	-GDF-5	Kontrolle
MW	0,291821	0,408980917	0,31462825	0,220557941
Stabw	0,23611128	0,284259516	0,287133791	0,121987941

Abb. 15: Auswertung am Beispiel der Färbung mit α -SMA nach 6 Stunden für alle Spender zusammengefasst

Abb. 14: Auswertung am Beispiel für Spender A der Färbung mit α -SMA nach 6 Stunden

Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen für jeden Zeitpunkt und jede Behandlung anhand des Beispiels der Färbung mit α -SMA von Spender A, zum Zeitpunkt von 6 Stunden nach Verbrennung, die Werte geben Anteile an

Abb. 15: Auswertung am Beispiel der Färbung mit α -SMA nach 6 Stunden für alle Spender zusammengefasst

Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen zusammengefasst für alle drei Spender am Beispiel der Färbung mit α -SMA zum Zeitpunkt von 6 Stunden nach Verbrennung jeweils für die Behandlungen mit 1µg/mL GDF-5, 5µg/mL GDF-5, -GDF-5/ohne GDF-5, K/Kontrolle; die Werte geben den Anteil der gefärbten Fläche pro Gesamtfläche an

Darüber hinaus werden für jeden Antikörper mithilfe dieser Standardabweichungen und Mittelwerte Grafiken erzeugt, die den zeitlichen Verlauf je nach Behandlung visualisieren (Abb. 16).

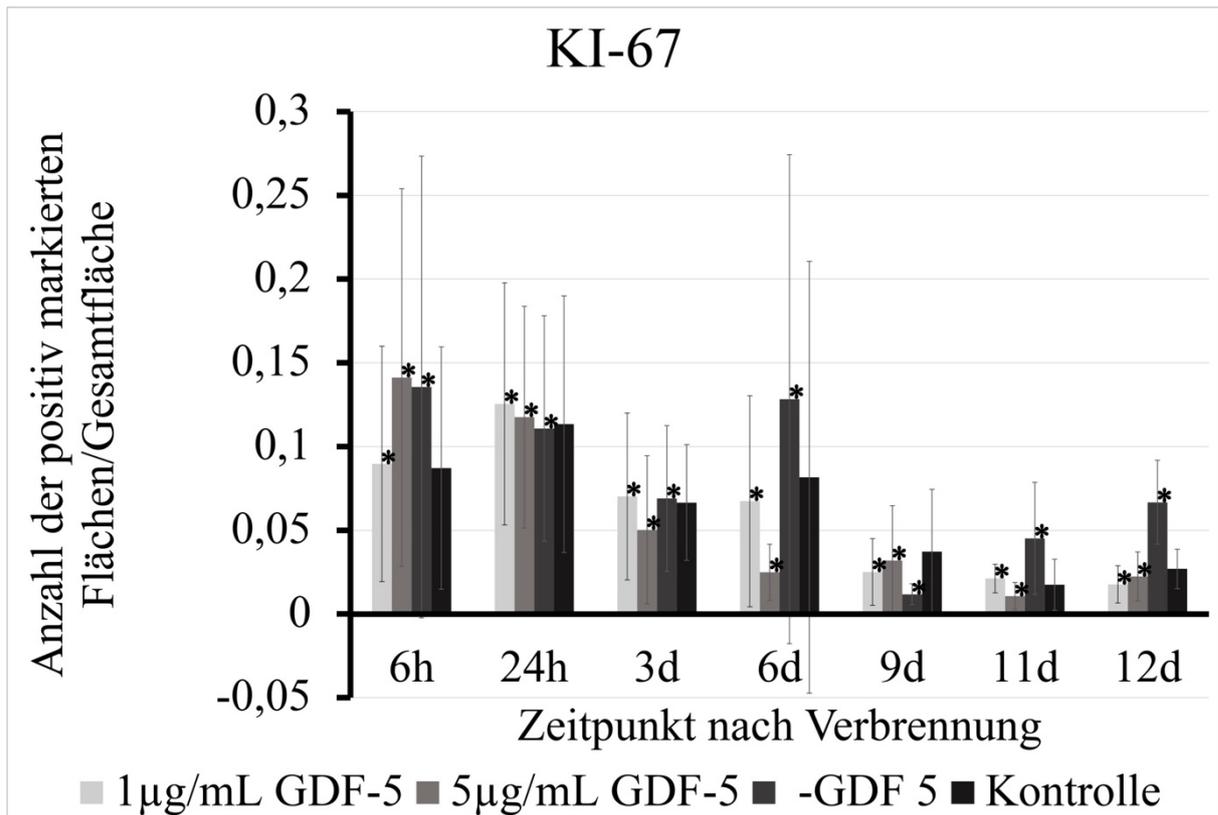


Abb 16: Zeitlicher Verlauf der KI-67-Antikörperfärbung für jede der Behandlungen

Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der Proliferation für alle 3 Spender zusammengefasst. Die X-Achse beschreibt die Zeitpunkte (6 Stunden, 24 Stunden, 3 Tage, 6 Tage, 9 Tage, 11 Tage, 12 Tage), die Y-Achse beschreibt die Anteile der gefärbten Flächen pro Gesamtfläche. Die grauen Balken stellen dabei den Mittelwert dar, die Ausziehungen stellen die Standardabweichung dar. Die Behandlungen, die im zeitlichen Verlauf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Präparaten zeigen, sind mit einem „*“ markiert.

Aus den entstandenen Tabellen kann entnommen werden, dass einige Werte gleich oder annähernd null sind, andere dagegen viel zu hohe Werte im Vergleich zu den Übrigen zeigen. Bei solchen Ausreißern werden die eingescannten Präparate nochmals digital betrachtet. Bei den auffällig niedrigen Werten handelt es sich meist um Präparate, die Unebenheiten aufweisen und vom ZEISS Axio Scan nur unscharf aufgenommen werden (Abb. 17). Da diese Präparate für die Auswertung unbrauchbar sind, werden sie von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die erwähnten ungewöhnlich hohen Werte zeigen bei Betrachtung der dazugehörigen Präparate Schnitte, die bei der Antikörperfärbung ausgetrocknet und als Folge vollkommen überfärbt sind (Abb. 18). Auch sie werden, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, von den folgenden Schritten eliminiert.



Abb.17: **Verschwommenes Präparat**

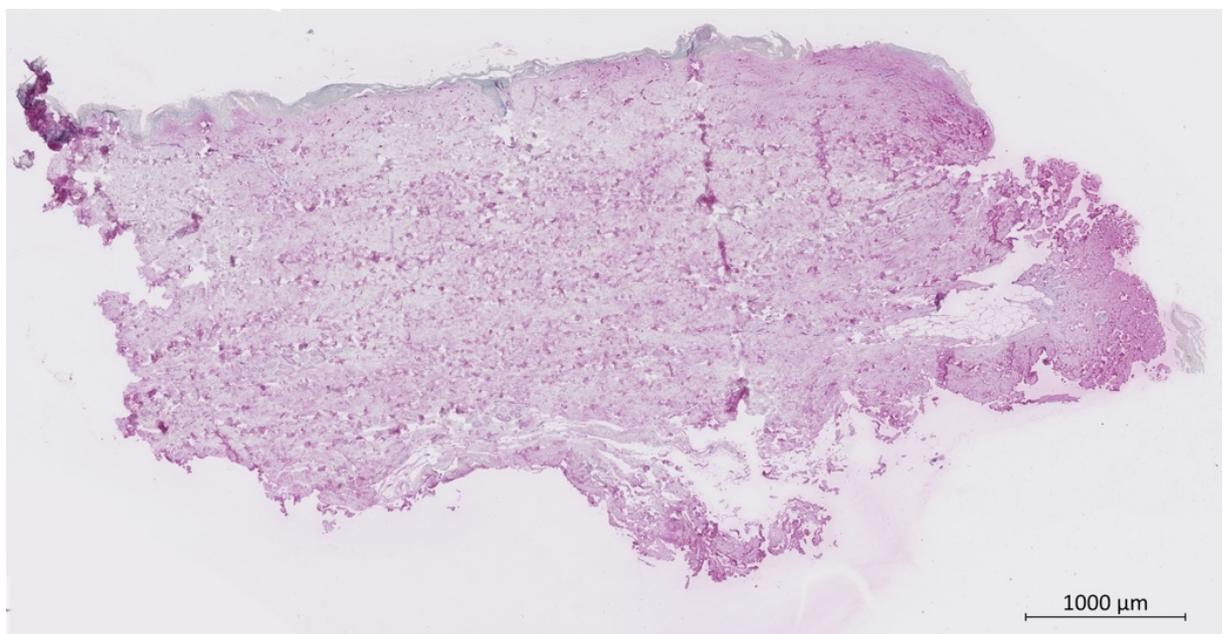


Abb. 18: **Überfärbtes Präparat**

Abb. 17 und 18: Abbildung 17 zeigt ein verschwommen aufgenommenes, Abbildung 18 ein ausgetrocknetes und daher überfärbtes Präparat. Diese Präparate werden von der Analyse ausgeschlossen. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

Für die weiteren Schritte arbeiten wir mit dem „Institut für Systemische Neurowissenschaften“ des Uniklinikums Düsseldorf eng zusammen. Durch dessen Mitarbeiter erfolgen die nun beschriebenen statistischen Tests.

So werden zwei unterschiedliche Mehrgruppenvergleiche mittels einfaktorieller ANOVA Tests mit dem Programm Matlab durchgeführt. Diese Tests stellen eine Erweiterung von T-Tests dar, bei denen, im Gegensatz zu diesem, auch mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden [202]. Da in unserem Versuch vier verschiedene Behandlungen miteinander verglichen werden sollen, entscheiden wir uns für diese Methode [202].

Zum einen wird jede Behandlung im zeitlichen Verlauf für jeden Antikörper dargestellt und somit ermittelt, ob es signifikante Unterschiede der Werte über die Zeit gibt. Somit überprüfen wir, ob eine Veränderung über die Zeit und damit eine mögliche Wundheilung stattfindet. Zum anderen werden für jeden Zeitpunkt die vier Behandlungen an einem bestimmten Antikörper miteinander verglichen, um so Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen feststellen zu können. Unsere vier verglichenen Behandlungen sind die Verwendung von GDF-5 mit einer Konzentration von 5 µg/mL, GDF-5 mit einer Konzentration von 1 µg/mL, die verbrannte Haut ohne die Behandlung mit GDF-5 sowie die nicht verbrannte Haut, die ebenfalls keine Behandlung mit GDF-5 erhielt als Kontrolle. Unser Einflussfaktor ist die jeweilige Behandlung der Haut, unsere Zielvariable ist die mit Fiji ermittelte rot markierte Fläche pro Gesamtfläche, bzw. im Falle von CD-31 darüber hinaus die Anzahl der markierten Flächen. Für den Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf ist der Zeitpunkt der Einflussfaktor. Die Zielvariable bleibt dabei gleich. Das Signifikanzniveau wird stets als $p < 0,05$ definiert.

Bei multiplen Testungen wird die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers der ersten Art gesteigert [202], was als α -Fehler-Inflation bezeichnet wird. Hier kann also fälschlicherweise die Nullhypothese abgelehnt und ein statistisch signifikantes Ergebnis vorgetäuscht werden [203].

Um dies zu verhindern, schließen wir an die ANOVA-Testung die Bonferroni-Korrektur an. Eine Abwandlung des Bonferroni-Tests stellt die Bonferroni-Holm-Korrektur dar, die verlässlicher ermöglicht, falsche Hypothesen abzulehnen und daher immer zu bevorzugen ist [204]. Aufgrund dessen wird diese Methode auch hier verwendet.

Fehlerkorrigiert wird hierbei entweder die *False Discovery Rate* oder die *Family Wise Error Rate*. Bei der *Family Wise Error Rate* handelt es sich um eine Irrtumswahrscheinlichkeit, mindestens eine der Testhypothesen abzulehnen, obwohl diese korrekt ist und somit fälschlicherweise die Nullhypothese zu bestätigen [205-207]. Mit der *False Discovery Rate* wird der erwartete Anteil falsch abgelehnter Hypothesen an allen abgelehnten Hypothesen überprüft [206, 207].

Die *False-Discovery-Rate* wird mit der Methode nach Benjamini & Hochberg (1995) ermittelt.

Im Weiteren wird allerdings nur mit den Werten der *Family Wise Error Rate* gearbeitet.

Ein ANOVA-Test beschreibt lediglich, ob es Unterschiede zwischen den Gruppen gibt, allerdings nicht zwischen welchen Gruppen diese auftreten [208, 209]. Zum Vergleich zweier Gruppen schließen wir daher *post-hoc* Analysen in Form von T-Tests an. Hierbei wird jede der vier Behandlungen (+GDF-5 in 5 µg/mL; +GDF-5 in 1 µg/mL, nur Verbrennung aber ohne GDF-5, Kontrolle) mit den drei anderen Behandlungen verglichen. Erneut werden Fehler durch den *Family Wise Error approach* behoben. So kann zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$ bestimmt werden, ob ein signifikanter Unterschied zwischen jeweils zwei Behandlungen vorliegt. Ist das Ergebnis signifikant, werden anschließend die Mittelwerte aus den Excel Tabellen miteinander verglichen, um zu ermitteln, welche der Behandlungen zu höheren Flächenanteilen beziehungsweise im Fall von CD-31 zu einer vermehrten Anzahl an Gefäßen führt.

2.4 Andere Verfahren

Zum anschaulichen Vergleich der Antikörperfärbungen mit den nativen Präparaten entscheiden wir uns für zwei Routinefärbungen: Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Masson-Goldner-Färbung. Letztere Färbung werden freundlicherweise vom Institut für Anatomie I der Heinrich-Heine-Universität übernommen. Zudem werden zu jedem Zeitpunkt Stenzen für eine PCR-Analyse erzeugt. Darüber hinaus wird, wie unten beschrieben, zur Darstellung der Apoptose ein weiteres Verfahren angewendet.

2.4.1 HE-Färbung

Für die Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung werden die Objektträger zunächst entparaffiniert. Dazu nutzt man die absteigende Alkoholreihe:

- 2x 5 Minuten Xylol bei Raumtemperatur
- 1x 5 Minuten Ethanol 100% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 100% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 95% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 85% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 70% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 50% bei Raumtemperatur

Anschließend erfolgt das Färben mit Hämalaulösung nach Mayer für 5-10 Minuten. Die Präparate werden dann kurz mit destilliertem Wasser gespült. Es folgt das Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 15 Minuten. Erneutes Spülen mit destilliertem Wasser wird für zwei Minuten durchgeführt. Nun wird in Eosin G-Lösung inkubiert, in welchem zuvor 1 Tropfen Eisessig pro 100 mL Flüssigkeit gelöst wird. Erneutes Spülen mit destilliertem Wasser folgt. Die Präparate werden schließlich über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Depex eingedeckt.

2.4.2 Masson-Goldner-Färbung

Die benötigten Lösungen werden angesetzt wie in Tabelle 3 aufgeführt. Die Protokolle entsprechen hierbei den Standards des Instituts für Anatomie I der Heinrich-Heine-Universität.

Zunächst werden die Präparate für 15 Minuten bei 70°C im Wärmeschrank gelagert. Anschließend erfolgt das zweimalige Inkubieren in Xylol für je 15 Minuten. Dann werden die Präparate wie folgt in der absteigenden Alkoholreihe getränkt:

- 2x 3 Minuten Ethanol 100% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten bei Ethanol 96% Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 90% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 70% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 50% bei Raumtemperatur

1x 3 Minuten in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur

Es folgt die Inkubation mit Weigert's Eisenhämatoxylin für 1-2 Minuten, wobei eine Überfärbung verhindert werden muss. Unter fließendem Leitungswasser werden die Präparate nun für 10-15 Minuten gespült. Anschließend folgt die Färbung mit Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin für 5-7 Minuten. Abgespült werden die Präparate nun in 1%iger Essigsäure. Es erfolgt die vollständige Entfärbung des Bindegewebes mit Wolframatophosphorsäure-Orange, welche in der Regel einige Minuten dauert. Erneut erfolgt das Abspülen in 1%iger Essigsäure. Nun wird mit Lichtgrün für 5 Minuten gegengefärbt. Erneutes Auswaschen mit 1%iger Essigsäure für 5 Minuten wird dem angeschlossen. Nun wird erneut für eine Minute in absolutem Alkohol entwässert. Die Präparate werden dann drei Mal je 5 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend mit DePex eingedeckt.

2.4.3 PCR

Die PCR erfolgt nach etablierten Standards unseres Labors.

2.4.3.1 Probenvorbereitung

Die Eppendorfgefäße, in denen sich die Gewebeprobe befinden, werden nun aus dem -80°C kalten Kühlschrank geholt. Dem Gewebe werden 500µL Trizol zugesetzt. Hierbei wird mehrfach auf- und abpipettiert. Das Gewebe wird zerdrückt und im Vortex Mixer bearbeitet. Anschließend werden die Proben für mindestens eine Stunde erneut bei -80°C gelagert. Nun werden die Spitzen der Eppendorfgefäße kurz in ein Wasserbad gehalten. Erneut werden sie im Vortex Mixer gemischt. Hat sich das Gewebe bis hierhin noch nicht gut aufgelöst, erfolgt das erneute Zerdrücken und die Bearbeitung im Vortex Mixer. Es werden weitere 500µL Trizol zugefügt und die Proben erneut für 30 Minuten im Kühlschrank gelagert. Anschließend erfolgt erneutes Auftauen im Wasserbad. Danach wird die Zentrifuge auf 11200rpm für 10 Minuten bei 4°C eingestellt.

2.4.3.2 RNA-Isolation

Es werden 200µg Chloroform zu den Proben gegeben und diese erneut für etwa 15 Sekunden im Vortex Mixer vermischt. Nun wartet man circa 10 Minuten bei Raumtemperatur, bis sich die Phasen deutlich voneinander gelöst haben. Anschließend werden die Proben mit den oben genannten Voreinstellungen zentrifugiert. Es werden nun deutlich mehrere Phasen sichtbar. Eine farblose, wässrige Phase, die der RNA entspricht, eine schmale, weiße Phase, die die DNA darstellt sowie eine rote Phenol-Chloroform-Phase, welche aus Proteinen besteht, sind nun differenzierbar.

Die RNA-Schicht wird vorsichtig entnommen und in frische 1,5mL Eppendorfgefäße gegeben. Nun erfolgt das Zugabe von 500µL Isopropanol (pro mL Trizol). Es wird kräftig im Vortex Mixer gemischt. Erneut wird 10 Minuten bei Raumtemperatur gewartet. In der Wartezeit erfolgt die Vorbereitung einer 75%igen Ethanol-Lösung aus 7,5mL 100%igem Ethanol und 2,5mL H₂O. Das Gemisch wird im Kühlschrank verwahrt. Mit den gleichen Grundeinstellungen werden die Proben nun wieder in die Zentrifuge gestellt. Der Überstand wird abgezogen und die RNA mit einem Milliliter der Ethanol-Lösung

gewaschen. Es wird mehrfach auf- und abpipettiert und erneut im Vortex Mixer gemischt. Nun wird mit den Einstellungen 8 800rpm für 7 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgezogen. Der Waschschrift mit der Ethanollösung wird wiederholt. Erneut wird mit den letzten Einstellungen zentrifugiert. Es folgt nochmals das Abziehen des Überstandes. Anschließend wird ein letztes Mal zentrifugiert. Nach erneutem Abziehen mit der Pipettenspitze werden die offenen Eppendorfgläser unter dem Abzug getrocknet, bis das Ethanol verdampfen kann. Dieser Schritt dauert circa 5 bis 10 Minuten. Nun wird 10µL reines H₂O auf die Proben gegeben. Diese werden anschließend auf Eis gelagert. Zur Aufreinigung werden die Proben mit dem *DNA free Kit* der Firma Ambion AM1906 wie folgt gereinigt. Zu 10µL RNA in H₂O wird 1µL des DNase Puffers (10mM Tris HCL, 2,5mM MgCl, 0,5mM CaCl bei pH6) gegeben. Zudem wird 1µL rDNA Enzym beigelegt. Erneut wird im Vortex Mixer vermischt und die Lösung schließlich 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Probe mit Hilfe des *Inaktivating* –Puffers 1,2µL gefällt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt erneute Zentrifugation bei 10.000rpm und Raumtemperatur (22°C) für 2 Minuten. Die klare Flüssigkeit, reine RNA, wird in ein neues Eppendorfgläser überführt, auf Eis gelagert und die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop Photometers bestimmt. Dieser wird auf Nucleid Acid-RNA Messung bei einer Wellenlänge von A260 und Multiplikation mit dem Faktor 40 eingestellt.

2.4.4 TUNEL

Für die TUNEL-Färbung (*DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System*) werden die Schnitte, ähnlich wie bei den Antikörperfärbungen, nach folgender Vorgehensweise entparaffiniert:

- 2x 5 Minuten Xylol bei Raumtemperatur
- 1x 5 Minuten Ethanol 100% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 100% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 95% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 85% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 70% bei Raumtemperatur
- 1x 3 Minuten Ethanol 50% bei Raumtemperatur
- 1x 5 Minuten NaCl 0,85% bei Raumtemperatur
- 1x 5 Minuten PBS bei Raumtemperatur
- 1x 15 Minuten Formaldehyd 4% bei Raumtemperatur
- 2x 5 Minuten PBS bei Raumtemperatur

Nun setzt man die Proteinase K Stocklösung an. Dazu mischt man 10mg Proteinase K (Promega Kit) mit 1 mL Proteinase K-Buffer (zusammengesetzt aus 100mM Tris-HCL (pH 8.0) + 50m M EDTA). Nun wird eine 20µg/mL Proteinase-Lösung vorbereitet, indem sie mit PBS im Verhältnis 1:500 vermischt wird. Es wird mit einem Tuch jegliche Flüssigkeit vom Objektträger entfernt, ohne die Proben zu berühren. Es wird 100µL der verdünnten Proteinase K Lösung auf jeden Schnitt gegeben und 8-10

Minuten lang inkubiert. Anschließend wäscht man erneut 5 Minuten in PBS. Jetzt wird mit 4%igen Formaldehyd nachfixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS für 5 Minuten, wird die Positivkontrolle vorbereitet. Es wird 100µL DNase-Puffer (10mM Tris HCL, 2,5mM MgCl, 0,5mM CaCl bei pH 6) für 5 Minuten auf den für die Positivkontrolle verwendeten Schnitt gegeben. Anschließend werden 100µL DNase-Puffer und 5,5-10 Units DNase I vermischt. Nach Entfernen von Flüssigkeit vom Objektträger, wird 100µL der angesetzten DNase im Puffer auf den Schnitt gegeben und 10 Minuten inkubiert. Nun wird viermal in destilliertem Wasser gewaschen. Es ist darauf zu achten, dass bei den folgenden Schritten die Positivkontrolle stets von den anderen Proben getrennt zu halten ist. Sie dürfen nicht in einem gemeinsamen Gefäß aufbewahrt werden.

Die folgenden Schritte beziehen sich wieder auf alle Proben.

Die Flüssigkeit auf den Objektträgern wird entfernt und die Schnitte mit 100µL Equilibrationspuffer (aus dem Promega-Kit) für 5 bis 10 Minuten bedeckt. Es wird nun berechnet, wie viel Inkubationspuffer für den folgenden Schritt benötigt wird. Dabei ergibt die Summe aus 45 µL multipliziert mit der Schnittzahl, 5µL multipliziert mit der Schnittzahl und 1µL rTdT Enzym (aus dem Promega-KI) multipliziert mit der Schnittzahl die Menge an Inkubationspuffer. Zusätzlich erzeugt man eine Negativkontrolle, bei der man nicht das rTdT-Enzym sondern 1µL H₂O verwendet.

Nach Entfernung des zuvor aufgebrauchten Equilibrationspuffers, wird sofort 50µL des angefertigten Inkubationspuffers auf den Schnitt gegeben. Die Schnitte müssen vor Austrocknung sowie vor direktem Licht geschützt werden. Die Schnitte werden mit Plastik Coverslips aus dem Promega-Kit bedeckt.

Anschließend inkubiert man sie in einer feuchten Kammer bei 37°C für 60 Minuten bei Dunkelheit.

Nun wird der SSC-Puffer vorbereitet. Dazu wird die SSC-Stocklösung (aus dem Promega-Kit) im Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Die Plastik Coverslips werden nach der Inkubation von den Präparaten entfernt und die Objektträger für 15 Minuten im SSC-Puffer getränkt.

Es wird erneut drei Mal in PBS gewaschen. Eingedeckt werden die Objektträger nun mit der DAKO Mounting Lösung und DAPI im Verhältnis 1:1000.

Die Bearbeitung der PCR-Stanzen erweist sich als schwierig, da die Stanzen nur einen Durchmesser von 2 mm betragen sollen, um diese sinnvoll für eine PCR verwenden zu können. Da wir so leider nur wenige PCR-Proben erzeugen können, entschließen wir uns diese für die Arbeit nicht zu verwenden.

Die ursprünglich geplante TUNEL-Färbung zur Darstellung der Apoptose gestaltet sich ebenfalls als problematisch, da bei Betrachtung der Präparate unter dem Fluoreszenz-Mikroskop alle Proben stark positive Markierungen zeigen. Dies gilt auch für die Kontrollen, in denen keine Verbrennung vorhanden sind. Da wir hier von einem Fehler im Färbeprotokoll ausgehen, entscheiden wir uns ebenfalls, diese Methode von der Arbeit auszuschließen.

2.5 Verwendete Antikörper

Antikörper	Funktion
KI-67	Stellt die Proliferation dar. Das durch diesen Antikörper visualisierte nukleare Antigen wird in der G1, S, G2 und M Phase des Zellzyklus, nicht aber in der G0 Phase exprimiert [200]
CD-31/PE-CAM-1	Stellt die Angiogenese dar. Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, lokalisiert in der lateralen Plasmamembran [24, 210, 211]
VEGF	Stellt die Angiogenese dar [211]
Involucrin	Differenzierungsmarker der Keratinozyten. Bestandteil der verhornten Hülle differenzierter Keratinozyten. [198, 199, 212]
α -SMA	Differenzierungsmarker kontraktiler Myofibroblasten [64]

Tabelle 1: **Verwendete Antikörper sowie deren Funktion**

Antikörper	Mischungsverhältnis	Inkubationsdauer
vWF	1:100 1:600 1:1500 1:2000 1:4000	Jeweils 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C
CD-31	1:25 1:50 1:100	Jeweils 20 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C
KI-67	1:100 1:200 1:250 1:300	Jeweils 20, 35 und 60 Minuten bei Raumtemperatur
α -SMA	1:200 1:300 1:400 1:600 1:800	Jeweils 20, 25 und 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C
Involucrin	1:100 1:200 1:300 1:400	Jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C

Tabelle 2: **Verwendete Antikörper mit getesteten Mischungsverhältnissen und Inkubationszeiten im Vorversuch**

Lösung	Bestandteile
--------	--------------

Masson-Lösung	0,2g Ponceau de Xylidine 0,1g Säurefuchsin in 300mL Aqua dest. Kurz kochen, dann 0,6mL Eisessig hinzufügen
Azophloxin-Lösung	0,5g Azophloxin 100mL Aqua dest. 0,2mL Eisessig
Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin	88mL 0,2%ige Essigsäure 7mL Masson-Lösung 2mL Azophloxinlösung
Wolframatophosphorsäure-Orange	3-5g Wolframatophosphorsäure 2g Orange G 100mL Aqua dest
Lichtgrün	0,1-0,2 Lichtgrün SF 100L Aqua dest. 0,2mL Eisessig

Tabelle 3: Ansätze für die Masson-Goldner-Färbung (entsprechend Protokoll des Instituts für Anatomie I der Heinrich-Heine-Universität)

3 Materialien

Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 4 dargestellt.

Material	Hersteller:
Skalpell	Feather Disposable Skalpell; Skalpellklinge Nummer 11; Socorex Isba SA; Champ-Colomb 7a; 1024 Ecublens; Schweiz
sterile Nadeln	BD Eclipse™ Hypodermic Injection Needle with SmartSlip™ Technology, Thermo Fisher Scientific Inc.; Arendalsvägen 16; 418 78 Göteborg; Schweden
Maße Zylinder + Gewicht	645g
Wasserbad	Memmert WTB, Memmert GmbH & Co. KG; Äußere Rittersbacher Straße 38; 91126 Schwabach; Deutschland
Thermometer	VOLTCRAFT IR 1201-50D USB Infrarot-Thermometer Optik 50:1 -50 bis 1200°C Pyrometer; Conrad Electronic SE; Klaus-Conrad-Straße 1; 92240 Hirschau; Deutschland
8mm Stanze	pfmmedical, Kai Industries Co. Ltd.; 1110 Oyana, Seki-shi; Gifu 501-3992 Japan Europäischer Bevollmächtigter; Kai Europe GmbH; Kottendorfer Straße 5; 42697 Solingen; Deutschland
Dulbecco's Modified eagle medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific; 168 Third Avenue; Waltham; MA USA 02451
NaCl 0,9%	1000mL Plastipur, Fresenius Spüllösung, Fresenius Kabi, Else-Kröner-Straße 1; 61352 Bad Homburg; Deutschland
FCS	Sera Plus, EU approved regions, special processed FBS, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach Deutschland

Penicillin/Streptomycin	Gibco Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL); Thermo Fisher Scientific GmbH; Waltham; Massachusetts; USA
Amphotericin	Gibco™ Amphotericin B 50mL; Fisher Scientific GmbH, Im Heiligen Feld 17; 58239 Schwerte; Düsseldorf; Deutschland
HEPES	Sigma Aldrich Hepes Solution; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Eschenstr. 5; 82024 Taufkirchen; Deutschland
GDF-5	Recombinant Human GDF-5 Protein; R & D Systems; Minneapolis; Minnesota; USA
Formaldehyd 3.7-4.0%	PanReac AppliChem ITW Reagents, AppliChem GmbH; Ottoweg 4; 64291 Darmstadt; Deutschland
Petri Schale	Sarstedt AG & Co. KG; Sarstedtstr 1; 51588 Nümbrecht; Deutschland
Gewebeeinbettautomaten	Thermo Electron Corporation Shandon Citadel; Anatomical Pathology (International); 168 Third Avenue; Waltham, MA USA 02451
Ethanol 70%	VWR Chemicals bvba-Gedenaaksebaan 464, 3001 Leuven; Belgium
Ethanol 90%	VWR Chemicals Ethanol 90% (v/v), TechniSolv®, VWR International GmbH; Hilpertstraße 20a; 64295 Darmstadt; Deutschland
Ethanol 95%	Otto Fischar GmbH & Co. KG; Kaisterstraße 221; 66133 Saarbrücken; Deutschland
Ethanol 100%	Shell Deutschland Oil GmbH; Zentralapotheke Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf; Deutschland
PBS	Dulbecco's Phosphate buffered Saline modified without calcium, chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered suitable for cell culture; Sigma-aldrich; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Eschenstr. 5; 82024 Taufkirchen; Deutschland
Xylol	Xylol (Isomerenmischung) ≥98%; VWR chemicals; Rue Carnot; 94126; Fontenay-sous-Bois; France
Paraffin	LeicaBiosystems Surgipath Paraplast Plus; Leica BioSystems; 1700 Leider Lane; Buffalo Grove; 60089; USA
Einbettgerät	Einbettgerät Pathisto TPS-1 EVO2 BG2; Gerätenummer 950.002.1105.008; Typ-Nr: 230V 50Hz 0,4 KW, Baujahr 2005; Pathisto GmbH; Medizintechnische Laborgeräte; Bürgermeister-Wehrmann-Straße 23; 30826 Garbsen; Deutschland
Einbettkassetten	Biopsie- Einbettkassetten Swingsette; Carl Roth Schoemperlenstraße 3-5; 76185 Karlsruhe; Deutschland
Kühlplatte	Pathisto TPS-1 EVO2 BG1, Gerätenummer 950.001.1105.008, Typ Nr.: 230V 50Hz 0,3 kW, Baujahr 2005; Pathisto GmbH; Medizintechnische Laborgeräte; Bürgermeister-Wehrmann-Straße 23; 30826 Garbsen; Deutschland
Mikrotom	SLEE Mainz CUT 6062 SN: C110851; Lise-Meitner-Straße 11; 55129 Mainz; Deutschland
CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific Heracell™ 150i CO2 Incubator, 150 L per chamber, Electropolished Stainless Steel; 168 Third Avenue; Waltham, MA USA 02451

Mikrobiologischer Brutschrank	Thermo Fisher Scientific Heraeus UT 6060 Kelvitron; 168 Third Avenue; Waltham, MA USA 02451
Zitronensäure	Citric Acid C ₆ H ₈ O ₇ ; Merck; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Eschenstraße 5; 82024 Taufkirchen; Deutschland
Natriumcitrat	tri-Natriumcitrat-Dihydrat C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ * 2 H ₂ O, Merck; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Eschenstraße 5; 82024 Taufkirchen; Deutschland
Aqua dest.	Ampuwa Spüllösung, 1000mL Plastipur, LOT 12PMP13; Fresenius Kabi Deutschland GmbH; Else-Kröner-Straße 1; 61346 Bad Homburg; Deutschland
BSA	Albumin Fraktion V, 8076.4, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Triton	Triton X-100; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Eschenstr. 5; 82024 Taufkirchen; Deutschland
Fettstift	Dako Pen Code S2002; Agilent Dako; 5301 Stevens Creek Blvd. Santa Clara; CA 95051; USA
CD-31	Invitrogen; Thermo Fisher Scientific; 168 Third Avenue; Waltham, MA USA 02451
KI-67	KI-67 Monoclonal Mouse Anti-Human, Clone MIB-1, Agilent Dako; 5301 Stevens Creek Boulevard; Santa Clara; CA 95051; United States
α -SMA	Abcam; 152 Grove Street; Waltham, MA 02453; USA
Involucrin	Involucrin, mouse monoclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Bergheimer Straße 89-2; 69115 Heidelberg; Deutschland
VEGF	Forward-VEGF-A: CTTGCCTTGCTGCTCTACC (19) Reverse-VEGF-A CACACAGGATGGCTTGAAG (19) Eurofins genomics; Anzingerstraße 7a; 85560 Ebersberg; Deutschland
vWF	Abcam; 152 Grove Street; Waltham, MA 02453; USA
Phosphatpuffer	OXOID Phosphate buffered Saline (Dulbecco A) BR0014G; Thermo Fisher Scientific; 168 Third Avenue; Waltham, MA USA 02451
Dako Färbekit	Dako REALtm Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (Code K5005); Agilent Dako; 5301 Stevens Creek Blvd.; Santa Clara; CA 95051; USA
Dab Färbekit	DAB Chromogen/Substrate Kit (High Contrast) (RUO), Dianova GmbH, Lübeckstraße 128 / Landwehr 2, 22087 Hamburg; Deutschland
Hämalaun	Carl Roth GmbH Schoemperlenstraße 3-5; 76185 Karlsruhe; Deutschland
Aquatex	Aquatex; (aqueous mounting agent) for microscopy; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Eschenstr. 5; 82024 Taufkirchen; Deutschland
Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)	Agilent Dako; 5301 Stevens Creek Blvd.; Santa Clara; CA 95051; USA
DePeX mounting medium	SERVA Electrophoresis GmbH; Carl-Benz-Straße 7; P.O.B. 10 52 60; 69115 Heidelberg; Deutschland

Weigert-Hämatoxylin	Lösung A Haematoxylin (Merck Art. 4302) Lösung B. Salzsäure 25% (Merck Art. 316) Merck; Feldbergstraße 80; 64293 Darmstadt; Deutschland
Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin	Ponceau de Xylidine (Chroma C.I.16150) 1B207 Säurefuchsin (Merck C.I.42685) Certistain Azophloxin Chroma (C.I.18050) 1B103 Merck; Feldbergstraße 80; 64293 Darmstadt; Deutschland
Essigsäure	Merck; Feldbergstraße 80; 64293 Darmstadt; Deutschland
Wolframatophosphorsäure Hydrat	Acros Organics Code; Thermo Fisher Scientific; 168 Third Avenue; Waltham, MA USA 02451
Lichtgrün	Lichtgrün SF gelblich Merck Certistain; Merck; Feldbergstraße 80; 64293 Darmstadt; Deutschland
Deckgläser	Marienfeld Superior, Paul Marienfeld GmbH & Co.; Am Wöllerspfd 4; 97922 Lauda-Königshofen; Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research plus Pipette, variables Volumen; Merck; Feldbergstraße 80; 64293 Darmstadt; Deutschland
Pipettenspitzen	TipOne, Bevelled Tip, Starlab International; GmbH; Neuer Höltingbaum 38; 22143 Hamburg; Deutschland
Eppendorfgefäß	Eppendorf Research fix 0,5-10 µl / 2-20 µl / 10-100 µl / 20-200 µl / 100-1000 µl; Eppendorf AG, Barkhausenweg 1; 22339 Hamburg; Deutschland
Reagiergefäß PCR	Sarstedt Ag & Co. KG; Sarstedtstraße 1 D-51588 Nümbrecht; Deutschland
24 Wells Platte	Greiner Bio-One Cellstar 24 Well Cell Culture Plate; Merck; Feldbergstraße 80; 64293 Darmstadt; Deutschland
pH-Meter	Hanna instruments HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter; Hanna Instruments Deutschland GmbH; An der Alten Ziegelei 7; 89269 Vöhringen; Deutschland
pH-Meter 2	Hanna Instruments; HI2020 edge Multiparameter-Tablet-Messgerät für pH; Hanna Instruments Deutschland GmbH; An der Alten Ziegelei 7; 89269 Vöhringen; Deutschland
Waage 1	Sartorius Extend M-prove; Sartorius Corporate Administration GmbH; Otto-Brenner-Straße 20; 37079 Goettingen; Deutschland
Waage 2 (Feinwaage)	Sartorius Extend; Ultra-Micro Balances; Sartorius Corporate Administration GmbH; Otto-Brenner-Straße 20; 37079 Goettingen; Deutschland
Kipp-/Rollenmischer	RS-TR-Serie Modell RS-TR 05 Carl Roth; Carl Roth GmbH Schoemperlenstraße 3-5; 76185 Karlsruhe; Deutschland
Kleinschüttler	Kleinschüttler KM2; Edmund Bühler GmbH; Schindäckerstraße 8; D-72411 Bodelshause; Deutschland

Laborschüttler	See-saw Rockers – SSM4, SSL4; Stuart-Equipment; Cole-Parmer; Beacon Road; Stone, Staffordshire; ST15 OSA; UK
Lichtmikroskop	Zeiss Xiovert 200 Mikroskop Axio Scope.A1 für Durchlicht-Hellfeld HAL50; Carl Zeiss AG (Global Corporate Headquarter); Carl-Zeiss-Straße 22; 73447 Oberkochen; Deutschland
Vortex Mixer	Labinco L46; Labinco BV; PO Box 3259; 4800 DG Breda; The Netherlands
Mikrozentrifuge	Thermo Scientific™ Fresco™ 17 Mikrozentrifuge, gekühlt, 230 V, mit doppelreihigem 18 x 2.0/0.5 ml-Rotor; Thermo Fisher Scientific; 168 Third Avenue; Waltham, MA USA 02451
NanoDrop Photometers/ Multimode Plate Reader	PerkinElmer VictorX3; Thermo Fisher Scientific; 168 Third Avenue; Waltham, MA USA 02451
Pipettierhelfer	Brand Accu-jet pro; Brand GMBH + CO KG; Otto-Schott-Str. 25; 97877 Wertheim; Deutschland
Stripetten	25mL, 10mL, 5mL Costar Corning Incorporated, Coning, New York 14831; 836 North Street, Building 300 Suite 3401; Tewksbury MA 01876; USA
Falcon	Cellstar Tubes Greiner Bio One; Fisher Scientific GmbH; Im Heiligen Feld 17; 58239 Schwerte; Deutschland
Gefrierschrank –80°C HeraFreeze	Heraeus Holding GmbH, Heraeusstraße 12 – 14; 63450 Hanau; Deutschland
Gefrierschrank –20 °C Premium No- Frost	Liebherr-International AG; Rue Hans-Liebherr 7; 1630 Bulle, Schweiz
Desoxyribonuclease I (DNase I) / Desoxyribonuklease I (DNase I)	DNase I Digest Kit, peqGOLD, Produktnummer: 12-1091-1, VWR International GmbH; Hilpertstraße 20a; 64295 Darmstadt; Deutschland
Promega Kit TUNEL	DeadEnd Fluorometric TUNEL System; Promega GmbH; Gutenbergring 10; 69190 Walldorf; Deutschland
rDNA Enzym PCR	Ambion Kit AM1906; Thermo Fisher Scientific; 168 Third Avenue; Waltham, MA USA 02451
Orangene Pipettenspitzen	Eppendorf 1-10µL ep dualfilter tips pcr clean; Eppendorf AG; Barkhausenweg 1; 22339 Hamburg; Deutschland
EDTA	OmniPur® EDTA, Disodium Salt, Dihydrate, Solution 0.5 M, 100mL, Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Eschenstraße 5; 82024 Taufkirchen; Deutschland
Magnesiumchlorid	Magnesiumchlorid Hexahydrat, 1 kg, Kunst.; Carl Roth GmbH und Co. KG; Schoemperlenstraße 1-5; 76185 Karlsruhe; Deutschland
Tris HCL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Eschenstr. 5; 82024 Taufkirchen; Deutschland
CaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Eschenstr. 5; 82024 Taufkirchen; Deutschland

Tabelle 4: **Verwendete Materialien**

Aufgeführt sind die verwendeten Materialien sowie die jeweiligen Hersteller

4 Ergebnisse

4.1 Qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen

In Abb. 19-24 sind die Färbeprodukte der Antikörperfärbungen mit CD-31, KI-67, α -SMA und Involutin sowie der HE- und Masson-Goldner-Färbung anhand von Beispielpräparaten in der Übersicht und in Abb. 25-30 in der Vergrößerung dargestellt. Es handelt sich jeweils um die Kontrolle des Spenders C nach 9 Tagen.

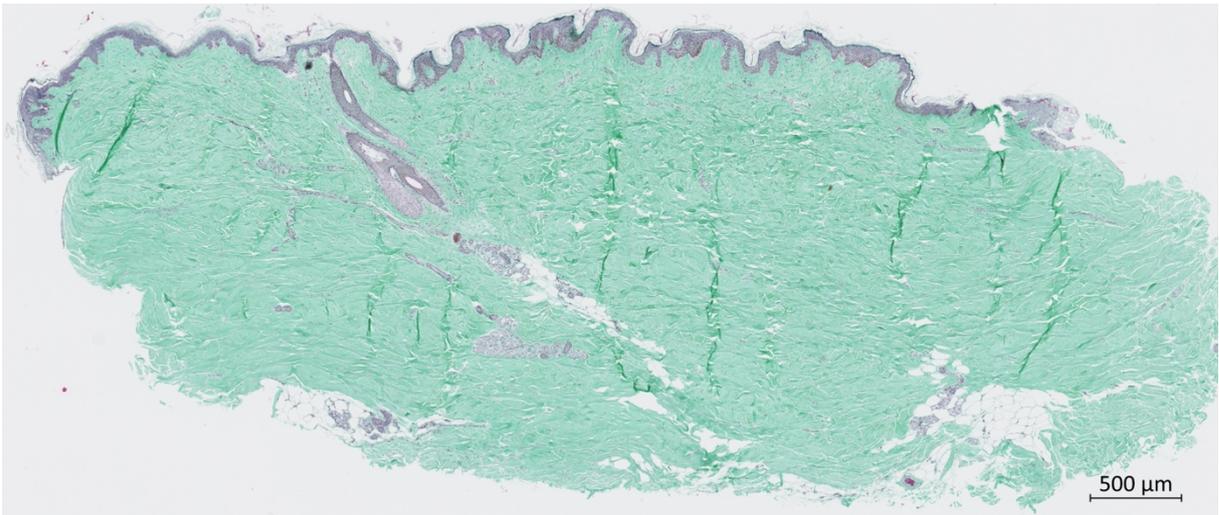


Abb. 19: Masson-Goldner-Färbung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

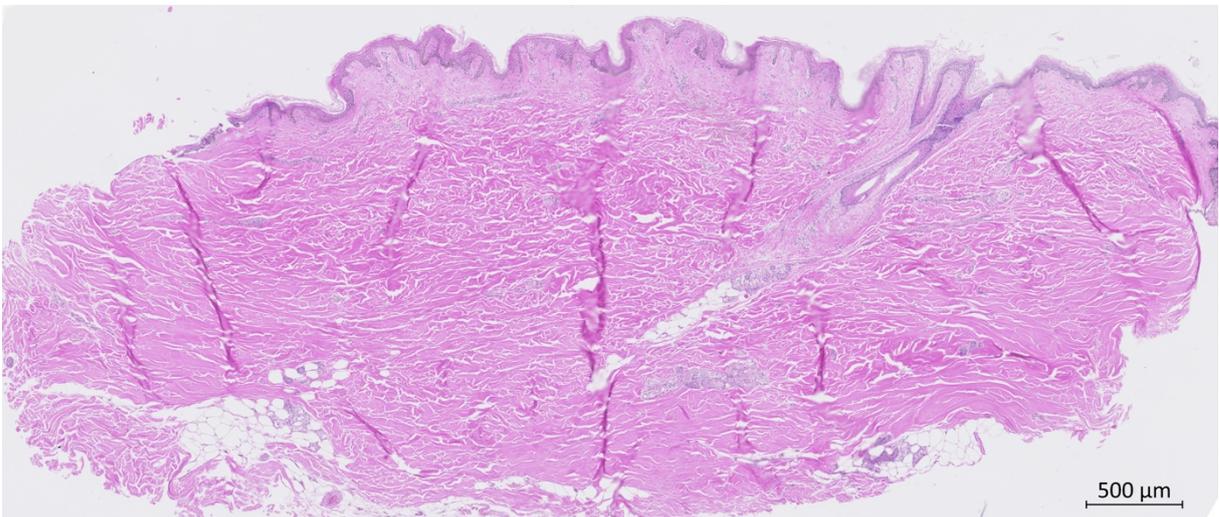


Abb. 20: HE-Färbung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

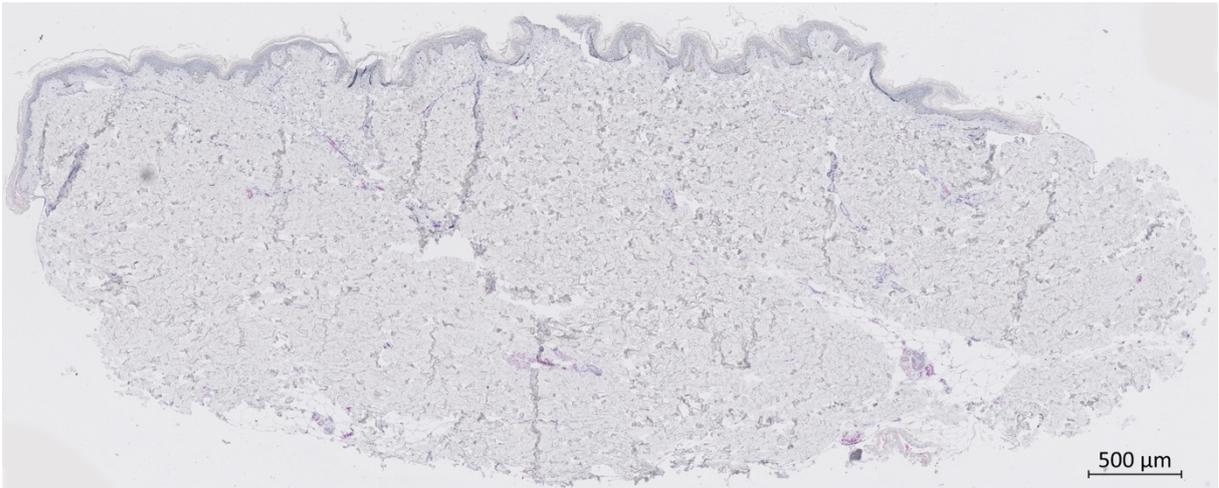


Abb. 21: CD-31-Antikörperfärbung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

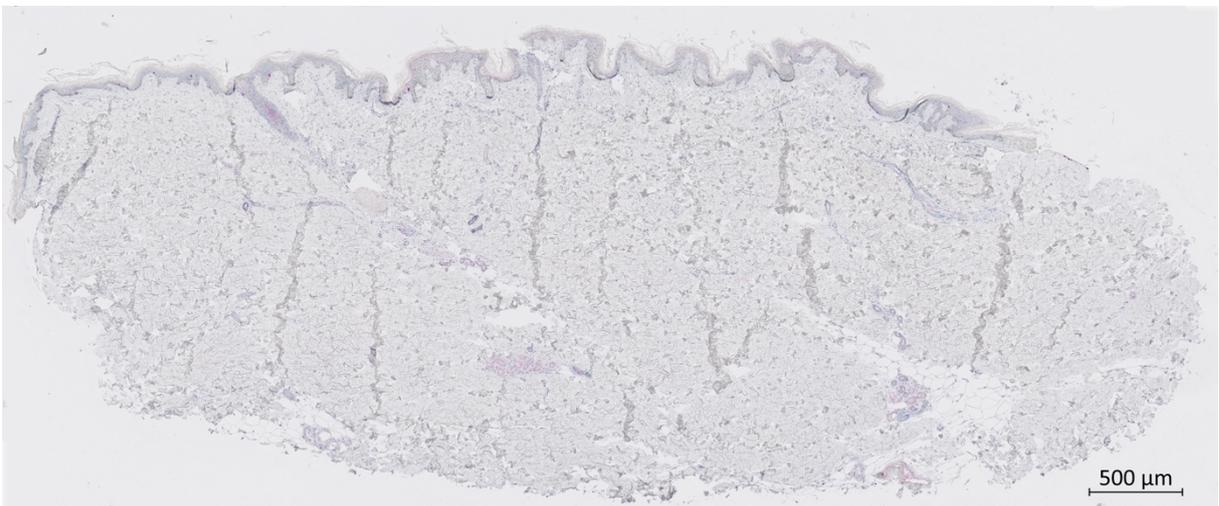


Abb. 22: KI-67-Antikörperfärbung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

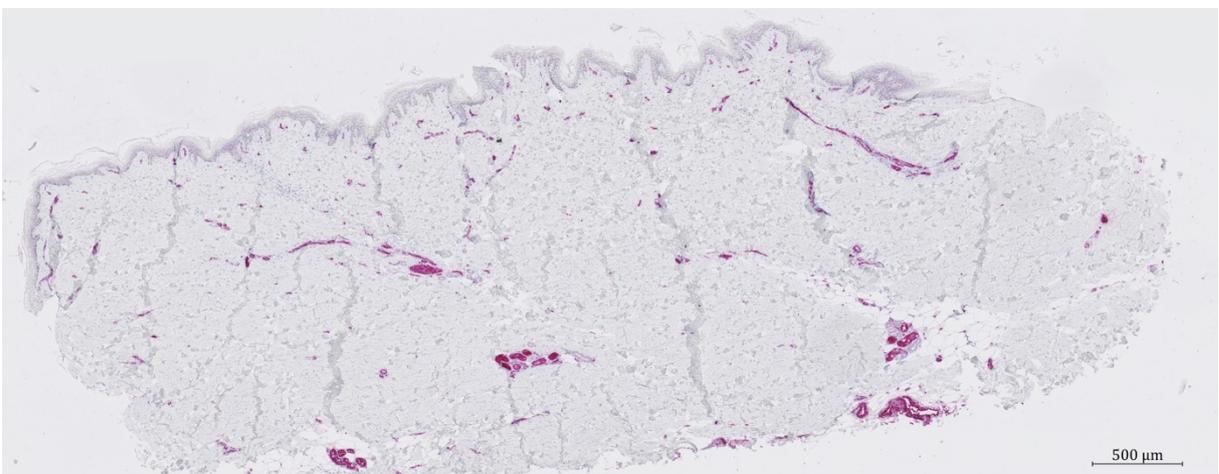


Abb. 23: α -SMA-Antikörperfärbung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

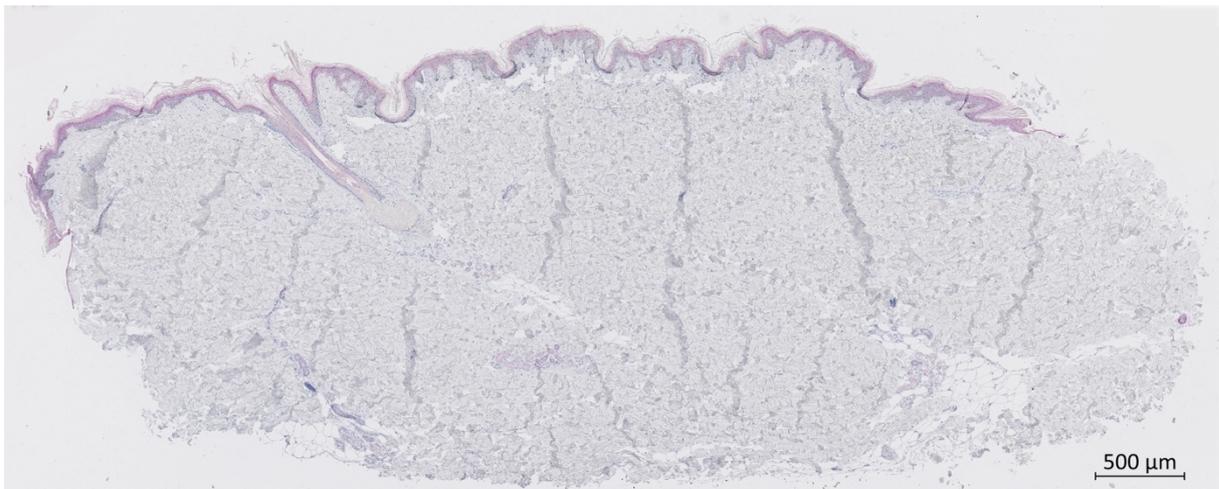


Abb. 24: Involucrin-Antikörperfärbung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

Abb. 19, 20, 21, 22, 23 und 24: Zeigen jeweils die 6 Färbungen am Beispiel der Kontrolle von Spender C nach 9 Tagen in der Reihenfolge: Masson-Goldner-Färbung, HE-Färbung, CD-31-Antikörperfärbung, KI-67-Antikörperfärbung, α -SMA-Antikörperfärbung, Involucrin-Antikörperfärbung. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441 μ m x 0,441 μ m

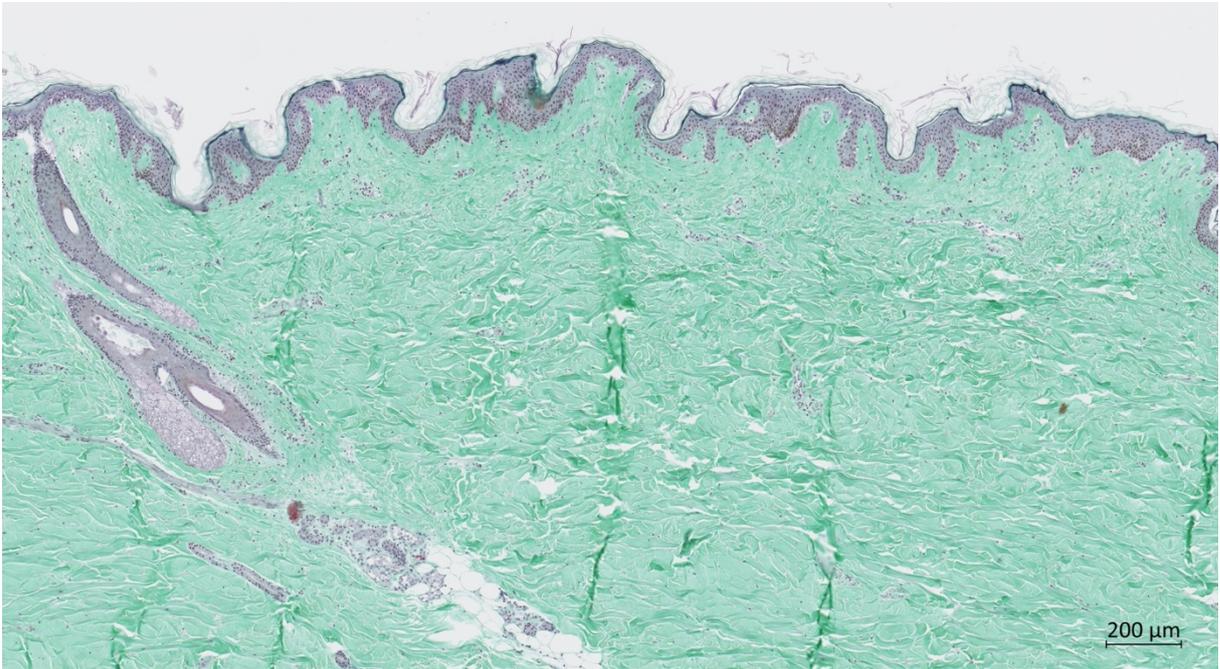


Abb. 25: Masson-Goldner-Färbung Vergrößerung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

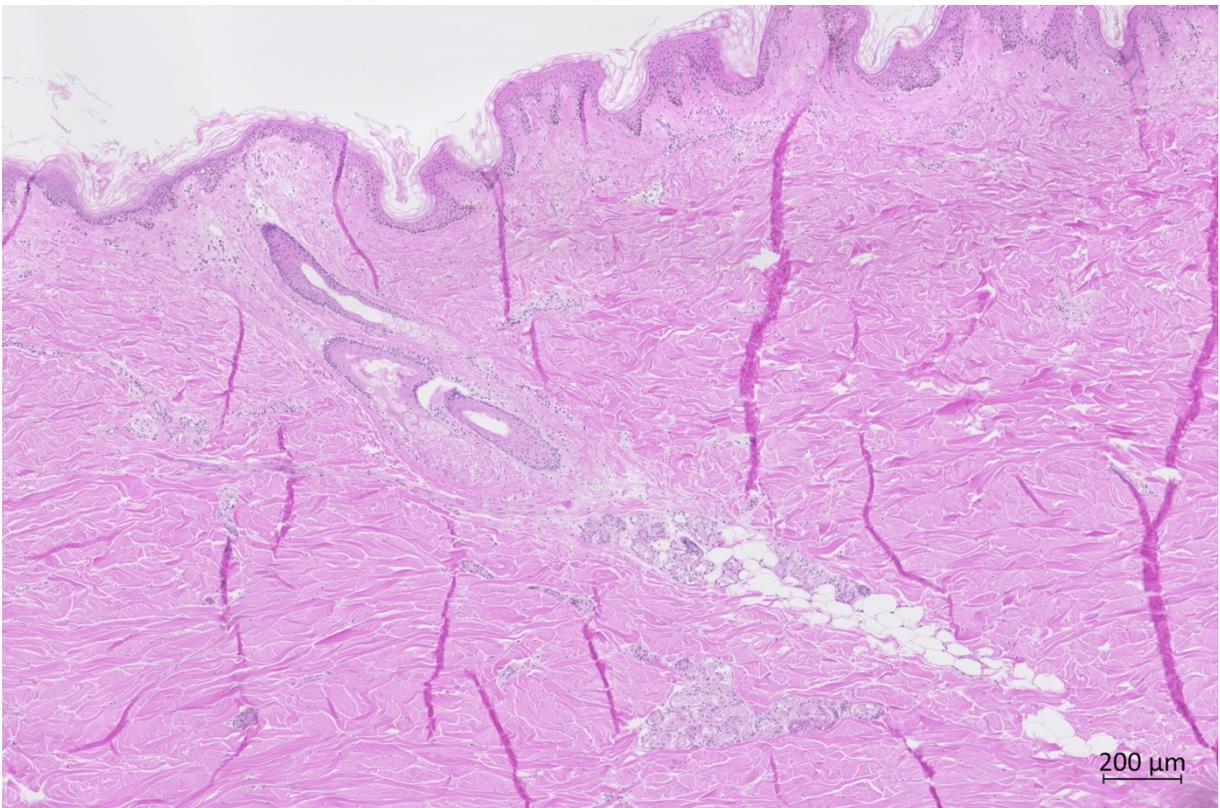


Abb. 26: HE-Färbung Vergrößerung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

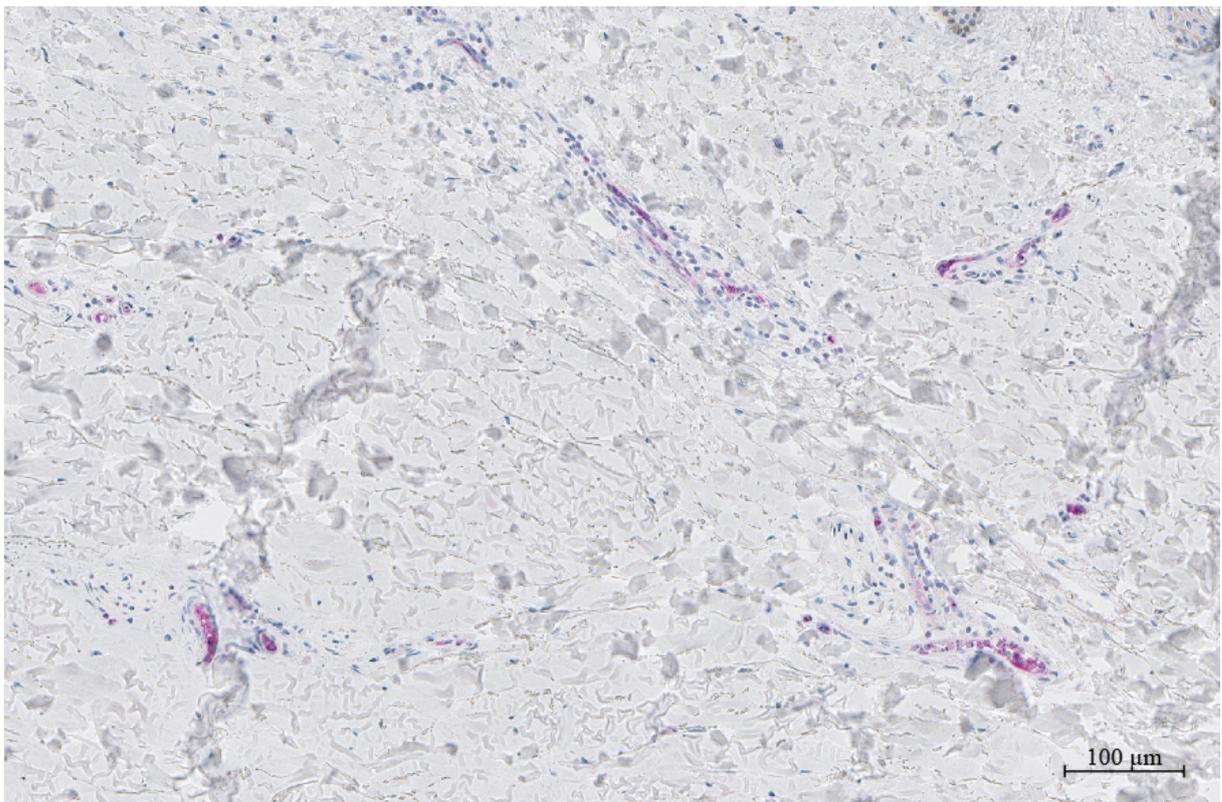


Abb. 27: CD-31-Antikörperfärbung Vergrößerung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

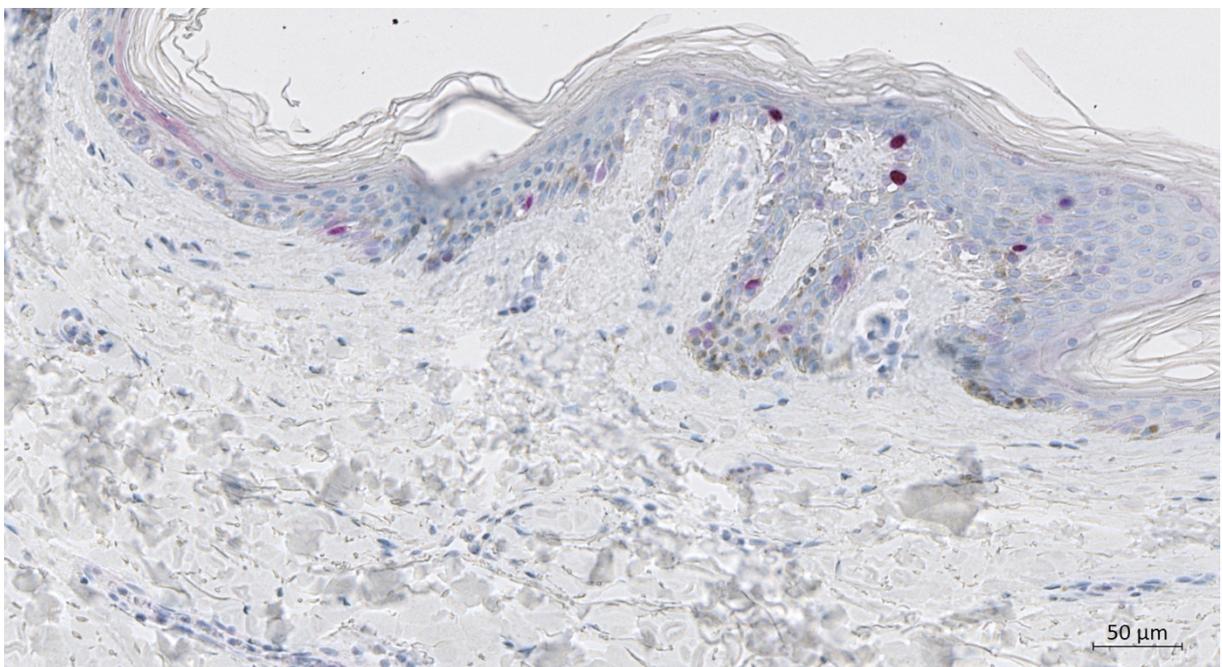


Abb. 28: KI-67-Antikörperfärbung Vergrößerung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

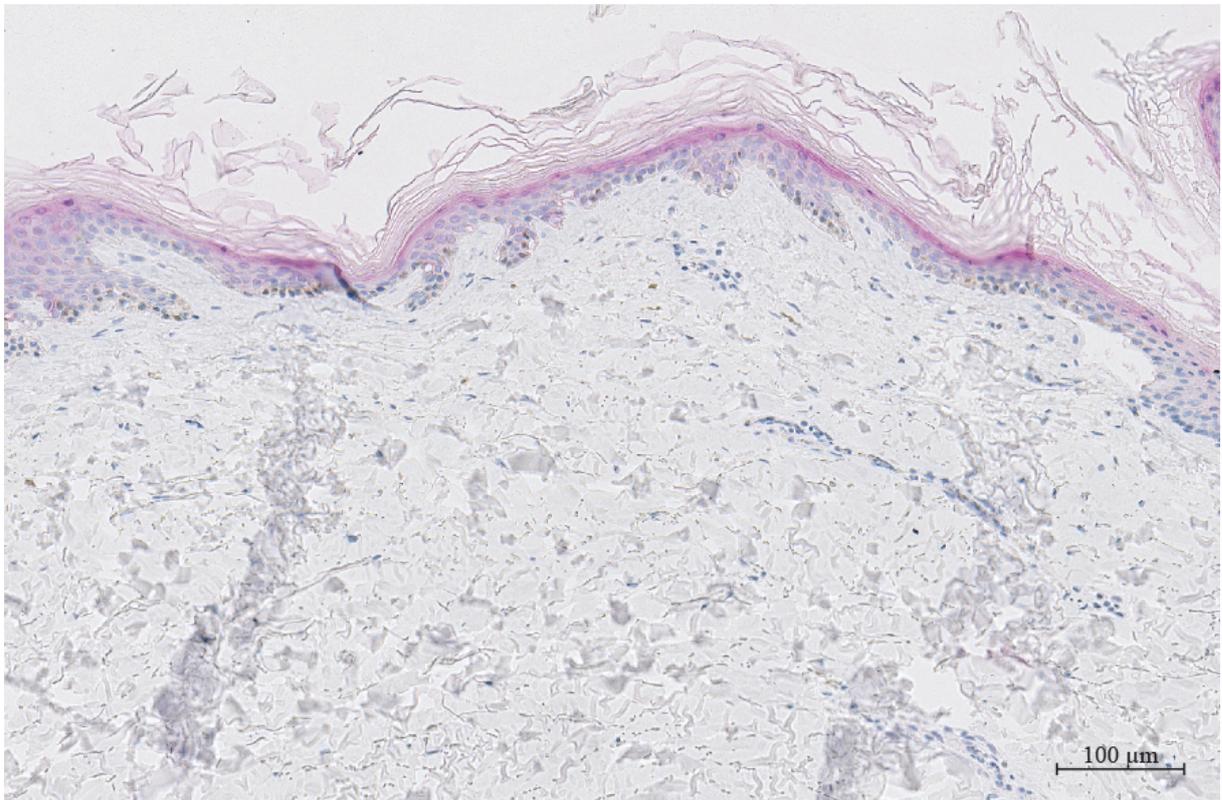


Abb. 29: Involucrin-Antikörperfärbung Vergrößerung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

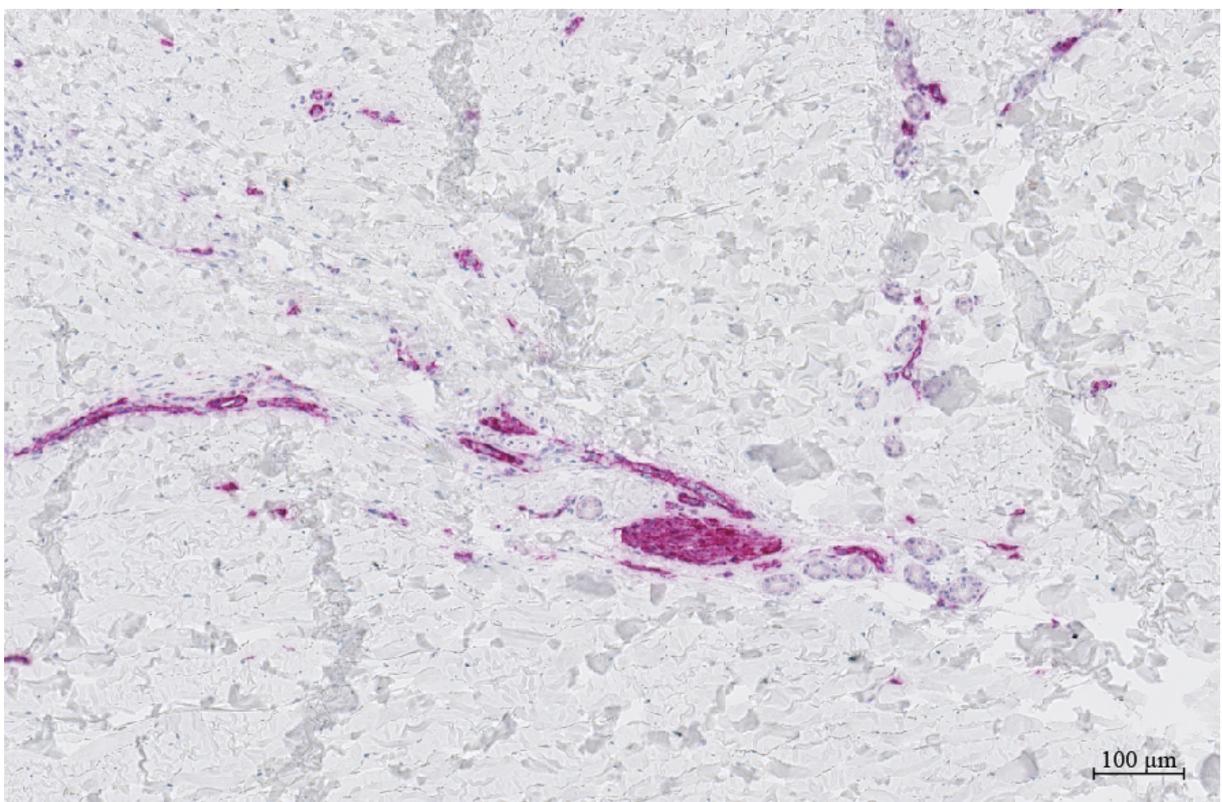


Abb. 30: α -SMA-Antikörperfärbung (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)

Abb. 25, 26, 27, 28, 29 und 30: zeigen jeweils die 6 Färbungen am Beispiel der Kontrolle von Spender C nach 9 Tagen in der Reihenfolge: Masson-Goldner-Färbung, HE-Färbung, CD-31-Antikörperfärbung, KI-67-Antikörperfärbung, Involucrin-Antikörperfärbung, α -SMA-Antikörperfärbung; Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441 μ m x 0,441 μ m

4.1.1 CD-31-Antikörperfärbung

Der Antikörper gegen CD-31 dient in unserem Experiment der Darstellung von Gefäßen und dadurch der Beurteilung der Angiogenese. In unseren Präparaten scheint der Marker, soweit ersichtlich, zuverlässig die Endothelzellen der meisten Gefäße im Zellverband zytoplasmatisch in einem intensiven Rot zu färben (Abb. 21 & 31). Einige Gefäße sind etwas blasser gefärbt und daher eventuell in der Auswertung nicht berücksichtigt worden (Abb. 33).

Es könnte sich hierbei um sehr kleine Venolen und Arteriolen handeln, deren Epithel nur aus einer dünnen Endothelzellschicht besteht oder aber um kutane Lymphgefäße, die von einer Schicht flacher Endothelzellen [8] umgeben sind.

Ob es sich hierbei tatsächlich um schwach gefärbte Gefäße handelt oder um unspezifisch gefärbte Bereiche, die optisch den Eindruck von Gefäßen erwecken, ist aufgrund der Qualität der Präparate schlecht beurteilbar.

Darüber hinaus scheinen noch einzelne Zellen im Bindegewebe angefärbt zu sein (Abb. 32). Es könnte sich hierbei um Makrophagen, Monozyten oder neutrophile Granulozyten handeln [213, 214]. In der Literatur wird vor einer Verwechslung von Makrophagen mit Endothelzellen aufgrund der Färbung mit CD-31 gewarnt [214]. Da das Vorhandensein solcher Zellen auch bei unseren Präparaten aufgrund der stattfindenden Wundheilung möglich ist, könnte dies die Beurteilung der Angiogenese verfälschen. Durch das sporadische Auftreten dieser einzelnen Zellen und durch die zu erwartende Kontinuität dieses Fehlers in allen Präparaten unabhängig von Behandlung und Zeitpunkt, wird dieser mögliche Fehler vernachlässigt.

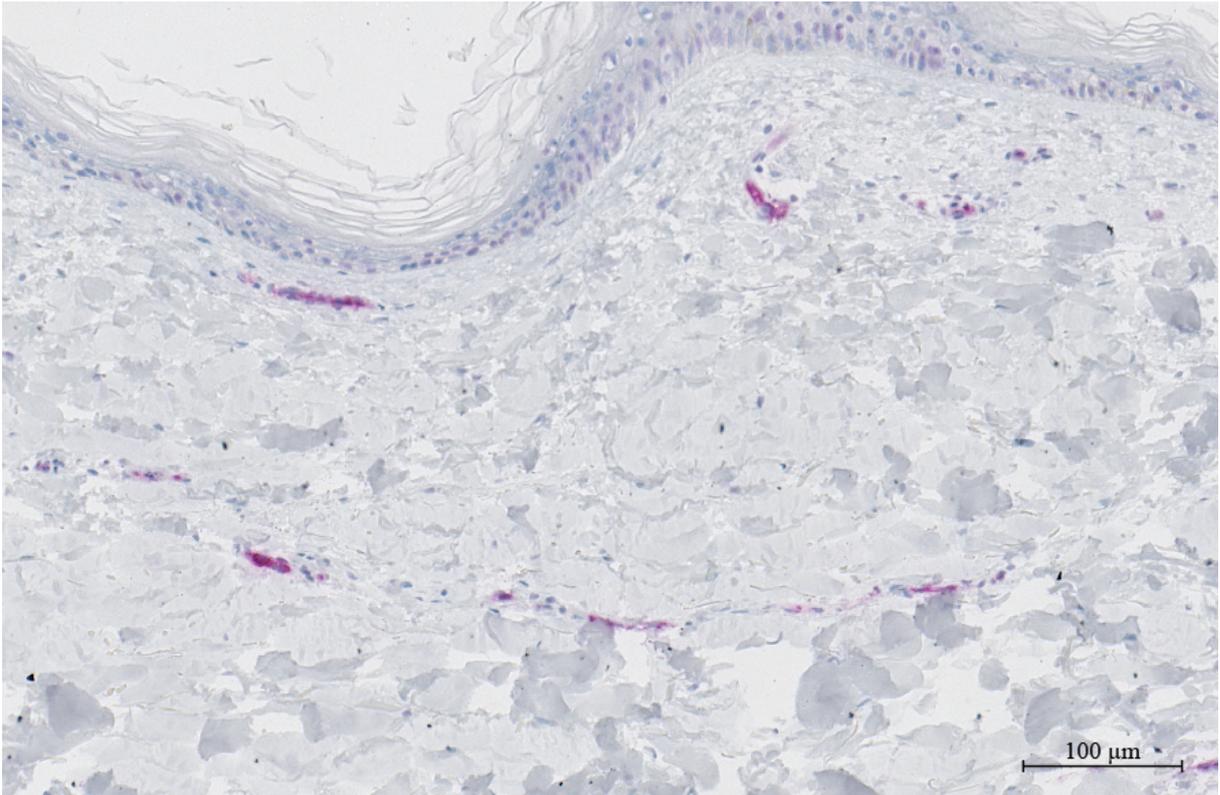


Abb. 31: Beispiel der Antikörperfärbung mit CD-31 (Spender B, 11 Tage, Kontrolle)

Abb. 31: Abbildung 31 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit CD-31 nach 9 Tagen in der Kontrolle. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441μm x 0,441μm

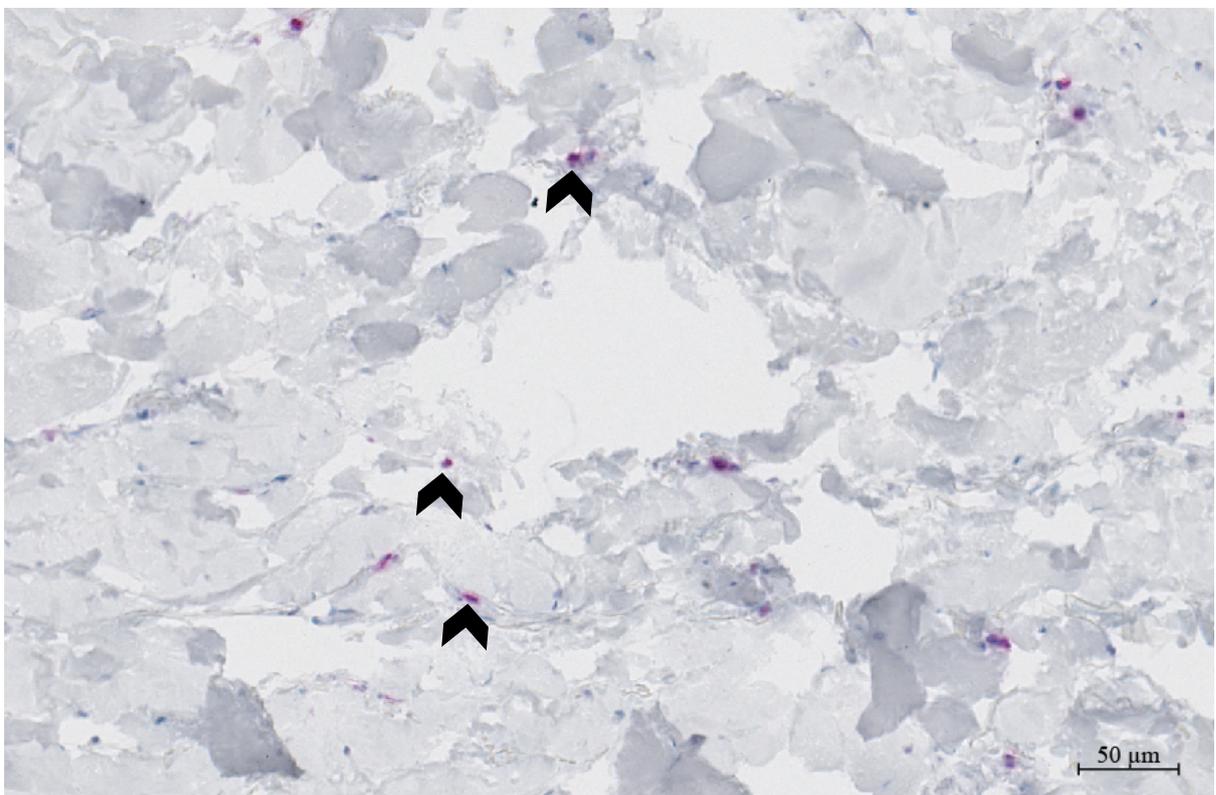


Abb. 32: Beispiel der Antikörperfärbung mit CD-31 (Spender B, 11 Tage Kontrolle)

Abb 32: Abbildung 32 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit CD-31 nach 11 Tagen bei der Kontrolle. Die Pfeilspitzen zeigen auf einzelne angefärbte Zellen. Hierbei könnte es sich um Zellarten, wie Makrophagen, Monozyten oder neutrophile Granulozyten oder aber um sehr kleine Gefäße handeln. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441 μm x 0,441 μm

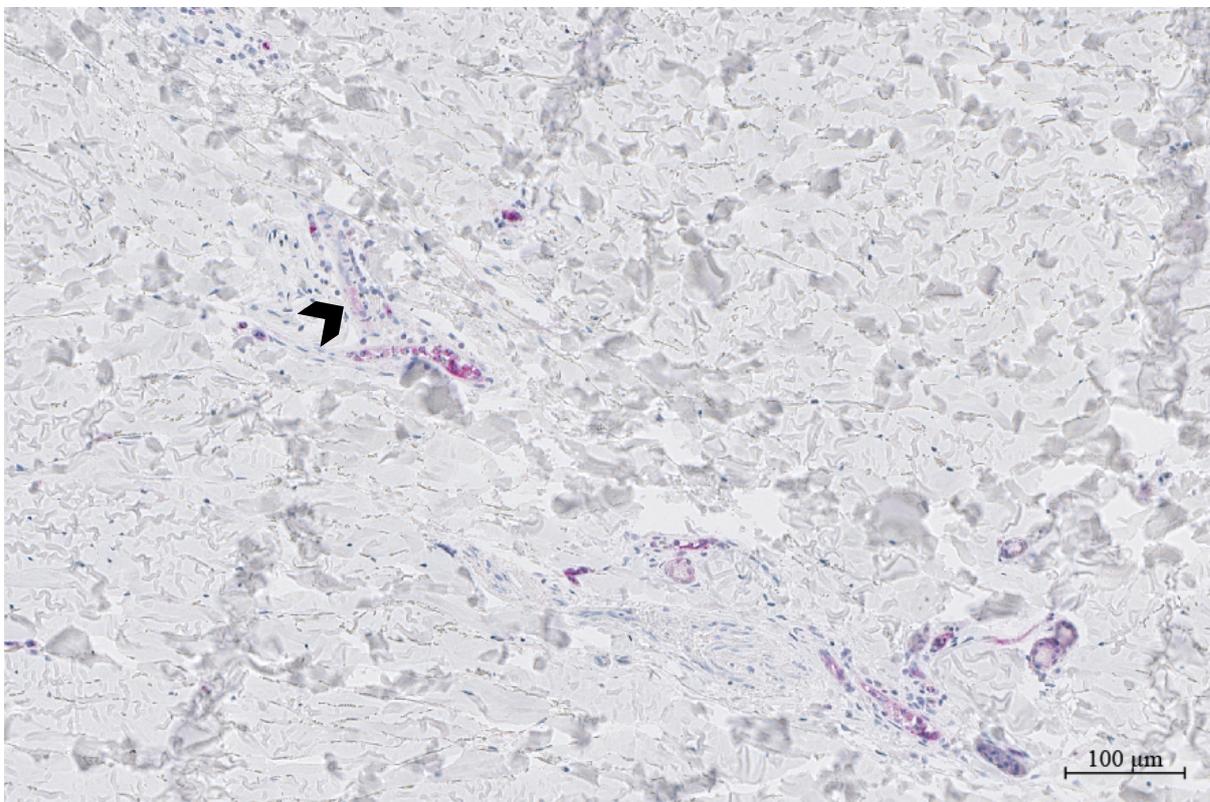


Abb. 33: **Beispiel der Antikörperfärbung mit CD-31 (Spender C, 9 Tage, Kontrolle)**

Abb. 33: Abbildung 33 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit CD-31 nach 9 Tagen in der Kontrolle. Die Pfeilspitze zeigt auf ein blass angefärbtes Gefäß. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441 μm x 0,441 μm

4.1.2 KI-67-Antikörperfärbung

Proliferierende Zellen scheinen mit der rein nukleären Färbung zuverlässig angezeigt zu werden. Die tiefrot markierten Zellkerne liegen vor allem im Bereich des Stratum basale der Epidermis, sind aber auch rund um Haarfollikel, im Drüsenepithel sowie in einzelnen dermalen Zellen zu finden (Abb. 34 sowie 35 & 38)

Teilweise kommt es auch zu unspezifischen Färbungen, die aber so blass sind, dass sie gegebenenfalls gar nicht in die Auswertung einfließen (Abb. 36).

Wie oben bereits erwähnt, kommt es regelhaft zu falsch positiv gefärbten Bereichen innerhalb der Verbrennung (Abb. 37). Diese werden, nach dem in „Methodik“ beschriebenen Verfahren, von der Bildanalyse ausgeschlossen (Abb. 13).

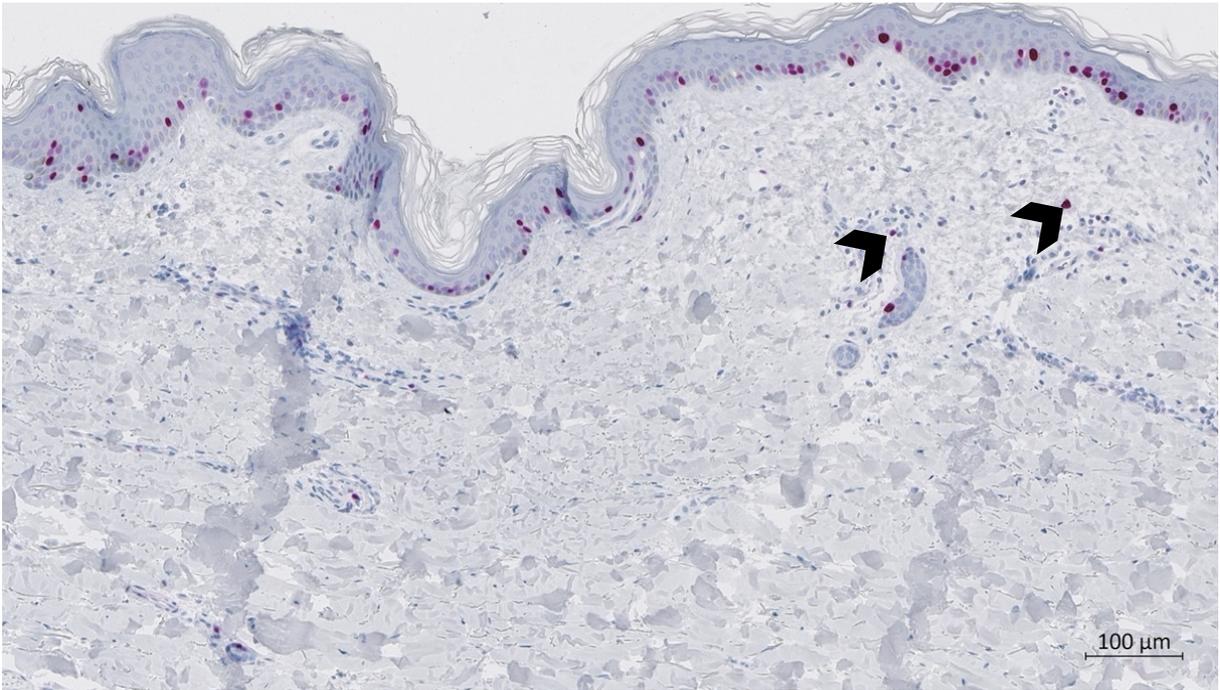


Abb. 34: Beispiel der Antikörperfärbung mit KI-67 (Spender B, 24 Stunden, Kontrolle)

Abb. 34: Abbildung 34 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit KI-67 nach 24 Stunden in der Kontrolle. Die Pfeilspitzen zeigen auf einzelne gefärbte dermale Zellen. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

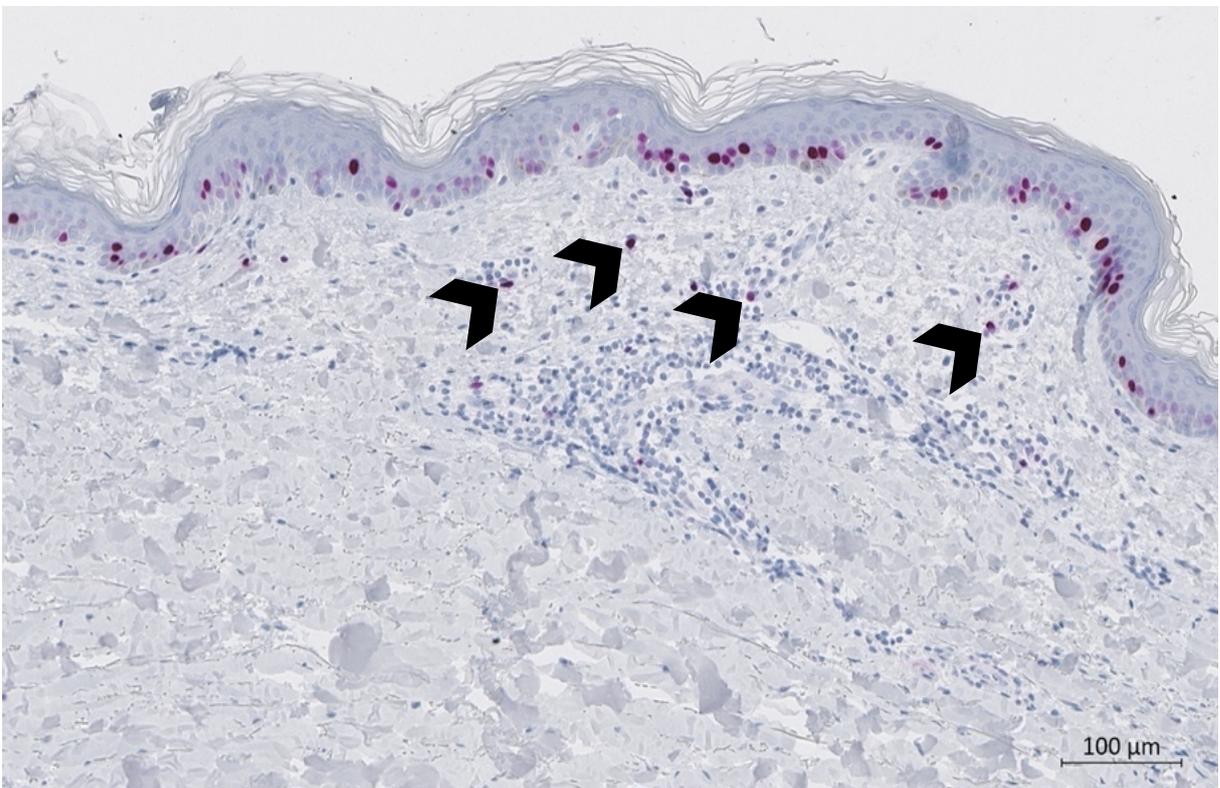


Abb. 35: Beispiel der Antikörperfärbung mit KI-67 (Spender B, 24 Stunden, Kontrolle)

Abb. 35: Abbildung 35 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit KI-67 nach 24 Stunden in der Kontrolle. Die Pfeilspitzen zeigen auf einzelne gefärbte dermale Zellen. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

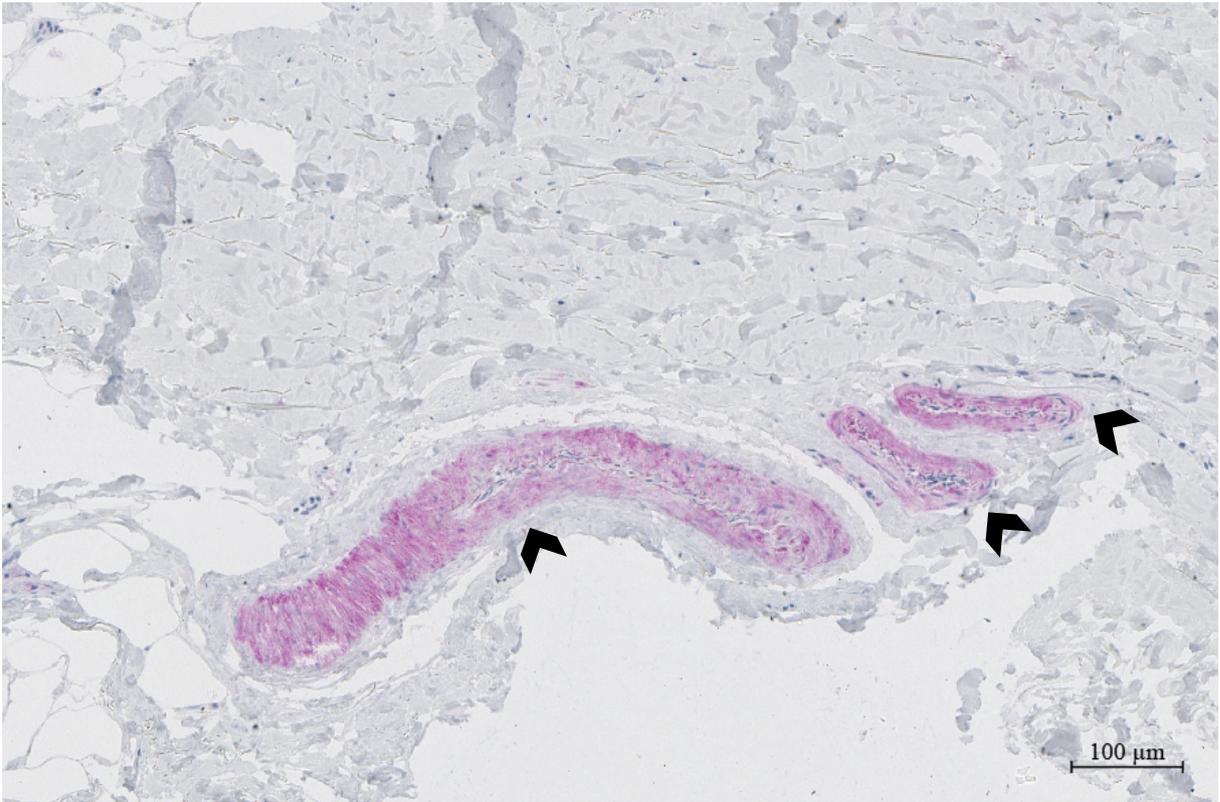


Abb. 36: Beispiel der Antikörperfärbung mit KI-67 (Spender B, 3 Tage, verbrannte, unbehandelte Haut)

Abb. 36: Abbildung 36 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit KI-67 nach 3 Tagen in der verbrannten, aber nicht behandelten Haut. Die Pfeilspitzen zeigen auf blasse Bereiche, bei denen es sich am ehesten um unspezifische Färbungen handelt. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441μm x 0,441μm

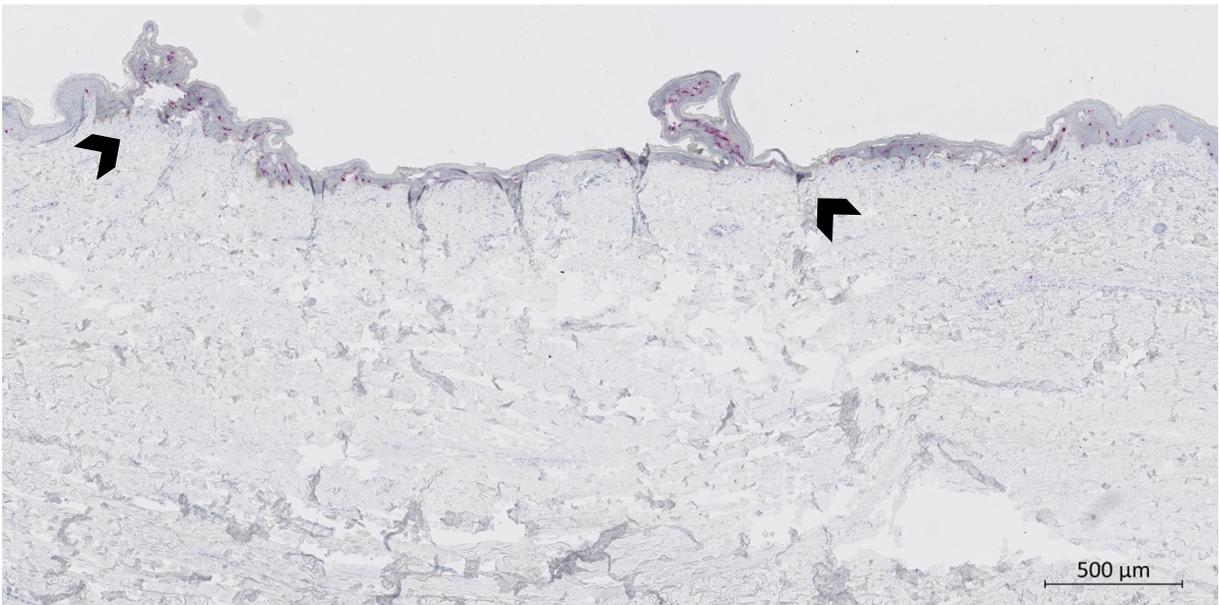


Abb. 37: Beispiel der Antikörperfärbung mit KI-67 (Spender C, 6 Stunden, Behandlung mit 1µg/mL GDF-5)

Abb. 37: Abbildung 37 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit KI-67 nach 6 Stunden in der mit 1µg/mL behandelten Haut. Die Pfeilspitzen zeigen auf die Ränder der Verbrennung. Hier ist der, wie oben beschrieben, regelhaft vorkommende falsch positive Bereich in der Verbrennung ersichtlich. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

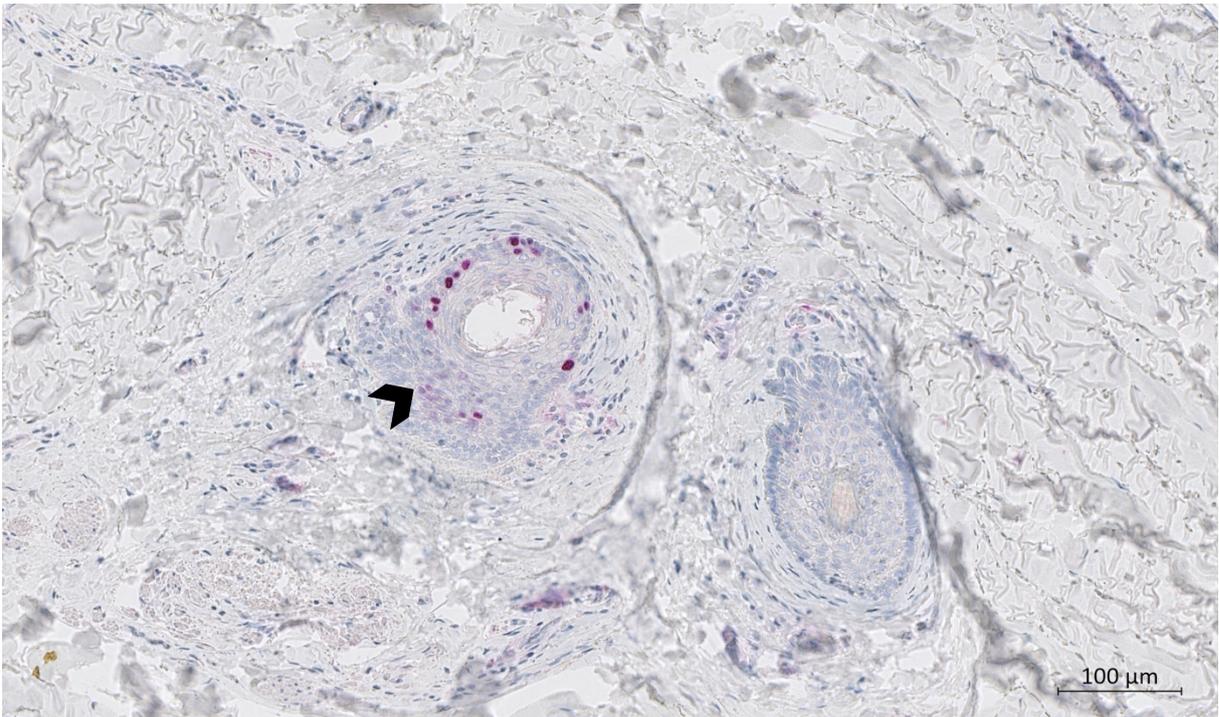


Abb. 38: Beispiel der Antikörperfärbung mit KI-67 (Spender C, 6 Tage, Kontrolle)

Abb. 38: Abbildung 38 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit KI-67 nach 6 Tagen in der Kontrolle. Die Pfeilspitze zeigt auf ein Haarfollikel im Querschnitt. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

4.1.3 α-SMA-Antikörperfärbung

In unserem Projekt dient die zytoplasmatische Antikörperfärbung mit α-SMA der Darstellung der Differenzierung von Fibroblasten, welche eine große Rolle in der Wundheilung spielen (siehe **Einleitung**). Es ist bekannt, dass dieser Marker nicht nur in Myofibroblasten, sondern auch in der glatten Muskulatur von Gefäßen vorkommt [22, 23] (Abb. 39 und 40). Auch Myoepithelzellen [215, 216] und Perizyten [217] sind durch eine Expression von α-SMA charakterisiert. Somit gilt: Obwohl α-SMA der meistgenutzte Marker für die Myofibroblasten-Differenzierung darstellt, kommt er auch in anderen Zellen vor [64, 218].

Dementsprechend sind in unseren Präparaten nicht nur Myofibroblasten, sondern auch Gefäße und Drüsen mit der Färbung in einem intensiven Rot markiert.

Dies hat zur Folge, dass die unabhängige Betrachtung der Myofibroblasten in unserem Experiment nicht gewährleistet wird.

Auf der anderen Seite produzieren nicht alle Myofibroblasten α -SMA [64, 218].

Zur sicheren Identifikation von differenzierten Myofibroblasten wäre also eine kombinierte Färbung verschiedener Marker, die von Myofibroblasten produziert werden, sinnvoll [64].

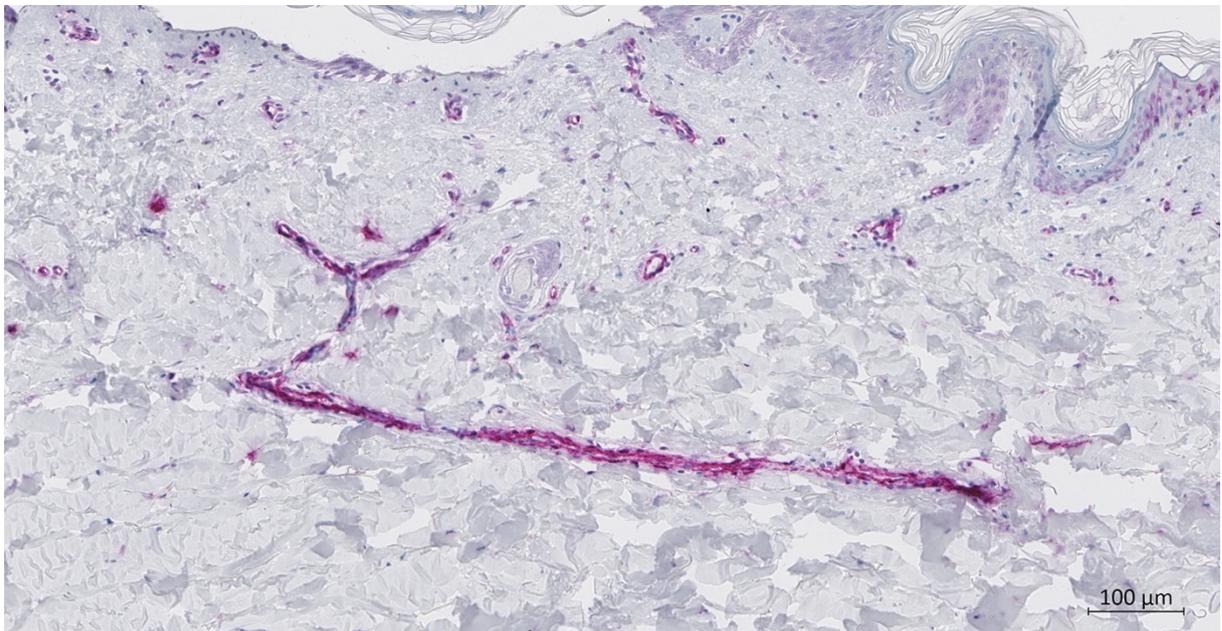


Abb. 39: Beispiel der Antikörperfärbung mit α -SMA (Spender A, 6 Stunden in der mit 5 μ g/mL GDF-5 behandelten Haut)

Abb. 39: Abbildung 39 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit α -SMA in der mit 5 μ g/mL GDF-5 behandelten Haut nach 6 Stunden. Angefärbt sind auch zahlreiche Gefäße. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441 μ m x 0,441 μ m

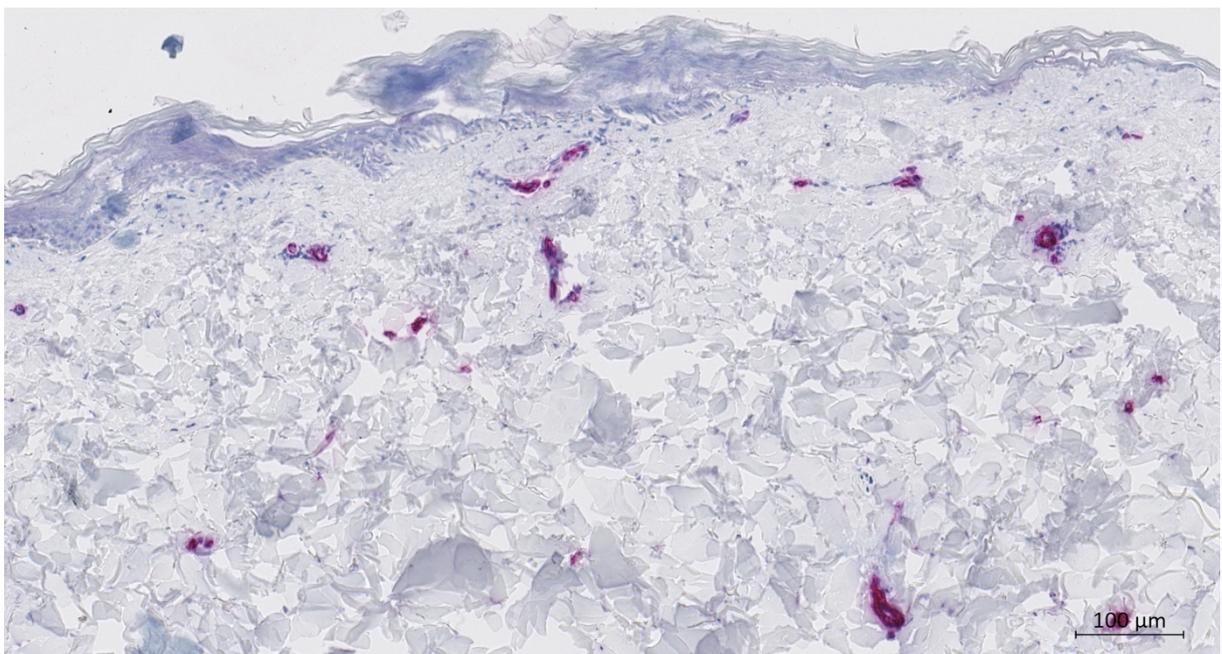


Abb. 40: **Beispiel der Antikörperfärbung mit α -SMA (Spender A, 3 Tage in der mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 behandelten Haut)**

Abb. 40: Abbildung 40 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit α -SMA in der mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 behandelten Haut nach 3 Tagen. Angefärbt sind auch zahlreiche Gefäße. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: $0,441\mu\text{m} \times 0,441\mu\text{m}$

4.1.4 Involucrin-Antikörperfärbung

Die zytoplasmatische Färbung zur Darstellung der Keratinozytendifferenzierung mit Involucrin scheint in unserem Versuch spezifisch zu funktionieren. Zwar wird die gesamte Epidermis blassrosa gefärbt, einen intensiven Rotton tragen allerdings nur das Stratum granulosum sowie eventuell der oberflächliche Anteil des Stratum spinosum (Abb. 41).

Obwohl immer die gleiche Einwirkzeit und Antikörperverdünnung genutzt wird, sind einige Präparate nur sehr blass oder gänzlich ungefärbt (Abb. 42). Die Ursache hierfür ist uns unerklärlich. Da wir es als Manipulation der Daten ansehen, entscheiden wir uns dagegen, diese Präparate von der Auswertung zu exkludieren.

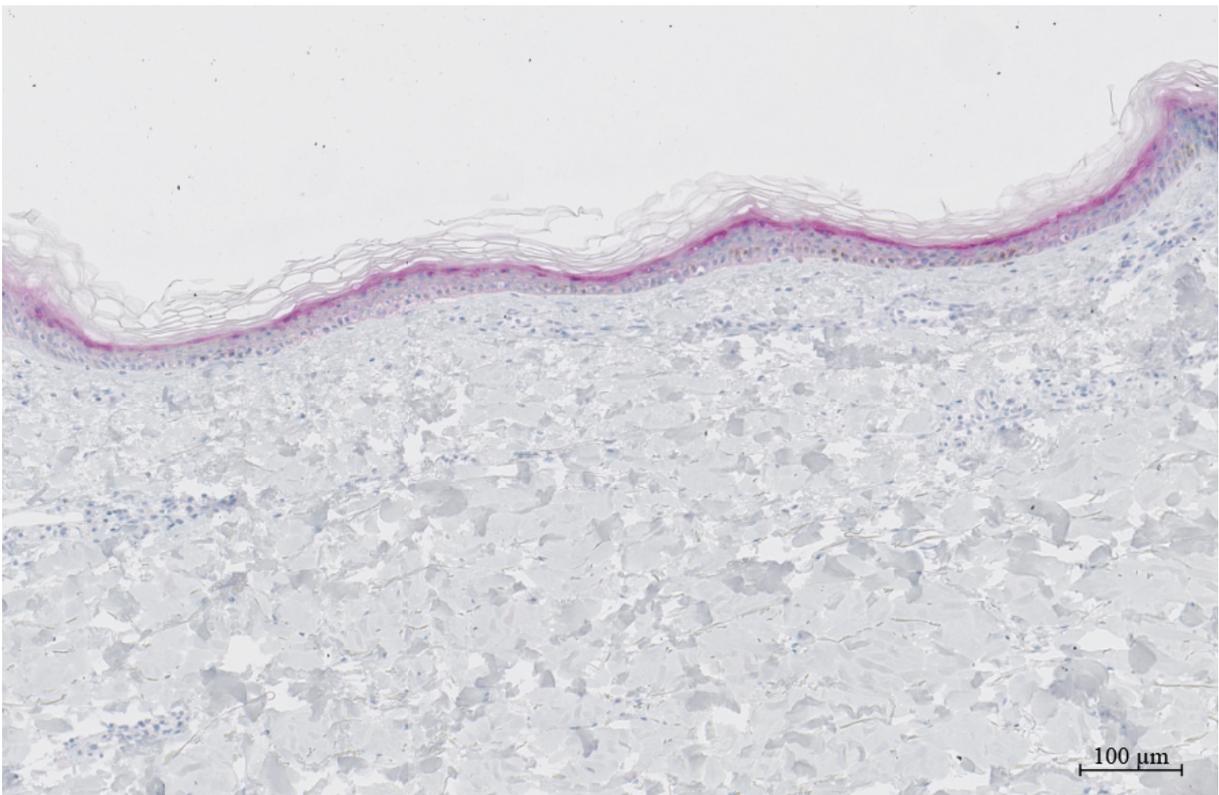


Abb. 41: **Beispiel der Antikörperfärbung mit Involucrin (Spender B, 11 Tage in der Kontrolle)**

Abb. 41: Abbildung 41 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit KI-67 in Kontrolle nach 11 Tagen. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: $0,441\mu\text{m} \times 0,441\mu\text{m}$

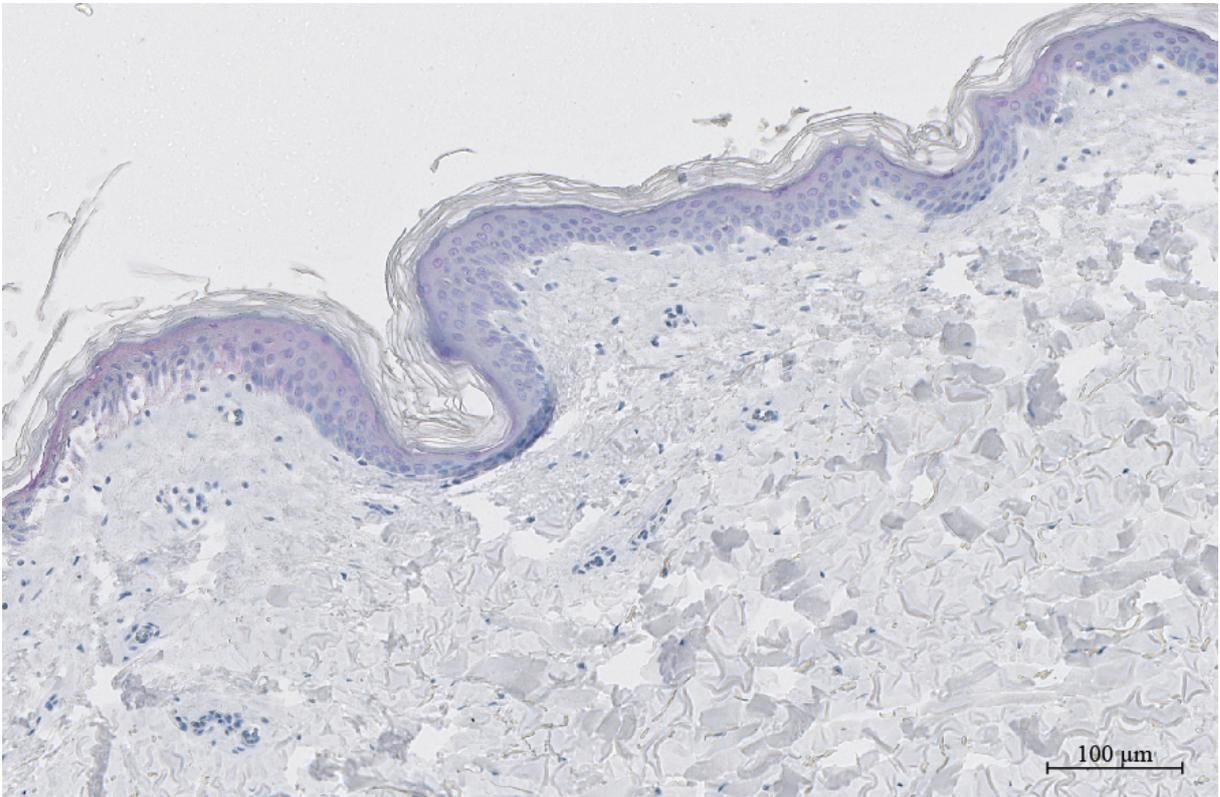


Abb. 42: Beispiel der Antikörperfärbung mit Involucrin (Spender A, nach 6 Stunden in der verbrannten, unbehandelten Haut)

Abb. 42: Abbildung 1 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Färbung mit Involucrin in der verbrannten, un-
behandelten Haut nach 6 Stunden. Das Präparat erscheint nur sehr blass gefärbt. Objektiv: Plan-Apochromat
10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441μm x 0,441μm

4.2 Quantitative Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen

4.2.1 CD-31-Antikörperfärbung Fläche

Die statistische Analyse der Flächenergebnisse der Antikörperfärbungen mit CD-31 pro Zeitpunkt ergibt folgende Werte:

Zeitpunkt 0: $F(1,24)=2,39$ and $p = 0,1352$

Zeitpunkt 6 Stunden: $F(3,73)=6,42$ and $p = 0,0006$

Zeitpunkt 24 Stunden: $F(3,54)=3,12$ and $p = 0,0334$

Zeitpunkt 3 Tage: $F(3,40)=2,35$ and $p = 0,0869$

Zeitpunkt 6 Tage: $F(3,41)=11,99$ and $p = 0,00000903784$

Zeitpunkt 9 Tage: $F(3,32)=2,82$ and $p = 0,0546$

Zeitpunkt 11 Tage: $F(3,24)=1,31$ and $p = 0,2938$

Zeitpunkt 12 Tage: $F(3,30)=11,93$ and $p = 0,0000260238$

Vier der hier angegebenen Werte fallen unterhalb des Signifikanzniveaus von $p < 0,05\%$ und scheinen dadurch statistisch signifikant zu sein. Dabei handelt es sich um die Ergebnisse der Zeitpunkte 6 Stunden, 24 Stunden, 6 Tage und 12 Tage.

Unter Korrektur der *False Discovery Rate* (FDR) sowie der *Family Wise Error Rate* (FWE) mittels Bonferroni sind nur noch die Ergebnisse der Zeitpunkte 6 Stunden, 6 Tage und 12 Tage statistisch signifikant. An diesen wird eine *Posthoc*-Analyse mit Hilfe von T-Test-Analysen durchgeführt und die *Family Wise Error Rate* wiederum korrigiert.

Zum Zeitpunkt von 6 Stunden nach Verbrennung kann man einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der Kontrolle, der Behandlung mit $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der Kontrolle sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle feststellen. Zwischen der Behandlung mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 kann nur ohne Behebung des Alphafehlers mittels Bonferroni ein statistisch signifikantes Ergebnis gefunden werden. Das Ergebnis zeigt lediglich, dass es einen signifikanten Unterschied gibt. Um zu erkennen, in welche Richtung dieser besteht, ist ein Vergleich der Mittelwerte nötig. Dies wird erst im Abschnitt „Diskussion“ beschrieben.

Da im Folgenden zur Veranschaulichung der Ergebnisse der statistischen Auswertung Boxplot-Diagramme genutzt werden, wird in der Bildbeschreibung der Ergebnisse für die CD-31 Antikörperfärbung nach 6 Stunden näher auf die Interpretation des Boxplots eingegangen (Abb. 43). Diese kann äquivalent für die darauffolgenden Diagramme angewendet werden. In dieser Arbeit erscheinen nur die Boxplot-Diagramme, die nach Behebung des Alphafehlers statistisch signifikante Ergebnisse erbrachten. Alle weiteren Boxplot-Diagramme sind dem Anhang zu entnehmen.

CD-31 Fläche 6 Stunden

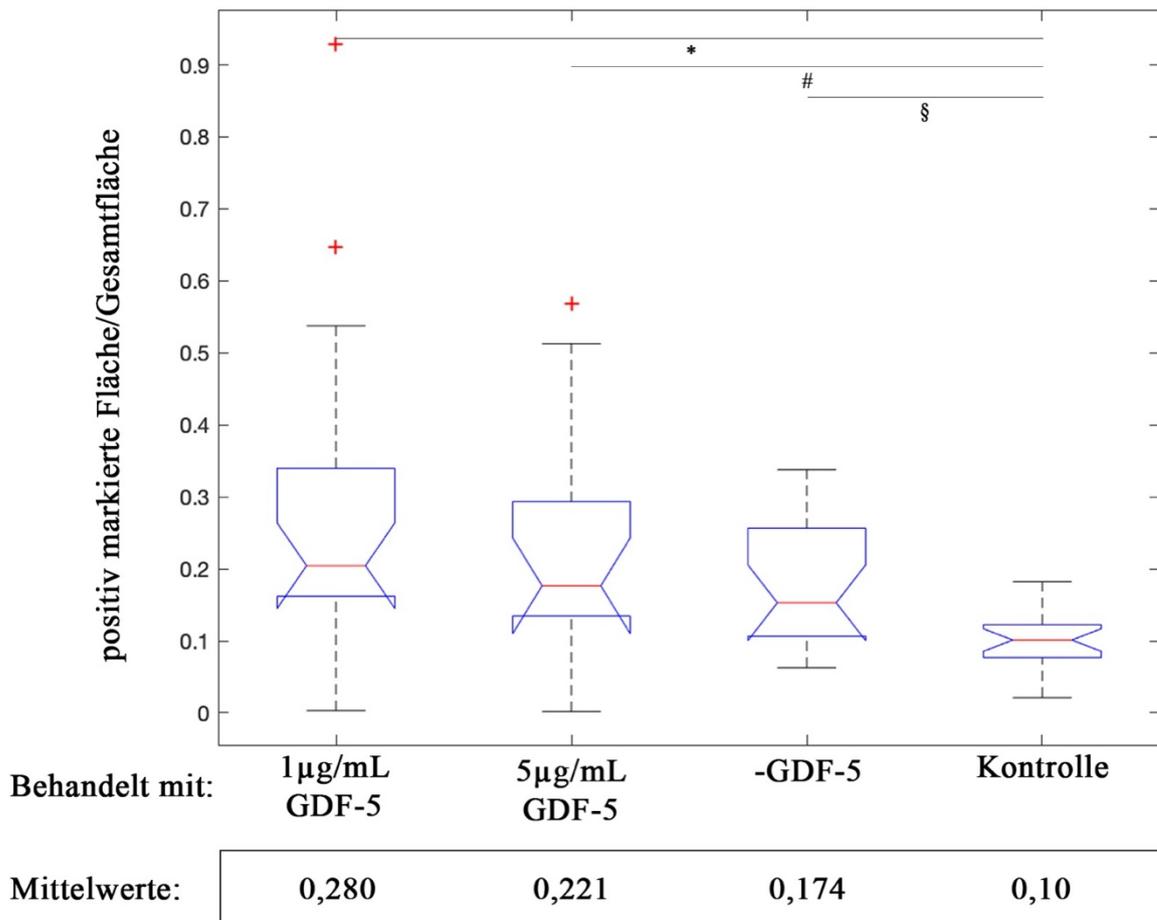


Abb. 43: Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit CD-31 gefärbten Fläche 6 Stunden nach Verbrennung

Abb. 43: Die Abbildung stellt die statistische Auswertung der Antikörperfärbung mit CD-31 nach 6 Stunden dar. Anhand der roten Linie kann der Median abgelesen werden [1]. 50% der Werte liegen unter, 50% der Werte über dem Median [3-5]. Die Enden der Box beschreiben jeweils das 1. Quartil sowie das 3. Quartil [7]. Die untere Grenze stellt dabei das 1. Quartil dar, somit liegen 25% aller Werte unter dieser Zahl, 75% aller Werte darüber [1, 7]. Das 3. Quartil bestimmt die obere Grenze der Box [1]. 75% der Werte liegen unter dieser Zahl, 25% darüber. Die Antennen (*Whiskers*) geben das Minimum bzw. das Maximum an, welche vom Algorithmus nicht als Ausreißer angesehen werden [1, 7, 9]. Die Kreuze beschreiben die Ausreißer [9]. Die Einkerbungen (*Notches*) geben das Konfidenzintervall des Medians an [4, 7]. Bei kleinem Stichprobenumfang und sehr weitem Abstand zwischen dem Median und dem 1. bzw. dem 3. Quartil ist eine sogenannte *Inside-Out* Form möglich [11]. Das heißt, dass die Einkerbung ober- oder unterhalb der Box liegt, so wie in diesem Beispiel das Diagramm der Behandlung mit 1 µg/mL GDF-5 sowie 5 µg/mL GDF-5. Überschneiden sich die Einkerbungen (*Notches*) zweier Boxplot-Diagramme nicht, so spricht dies für ein statistisch signifikantes Ergebnis [12].

In diesem Fall können anhand der beschriebenen Methodik statistisch signifikante Unterschiede (zum Signifikanzniveau von $p < 0.05$) zwischen den Behandlungen mit 1 µg/mL GDF-5 und der Kontrolle (mit „*“ markiert), der Behandlung mit 5 µg/mL GDF-5 und der Kontrolle (mit „#“ markiert) sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle (mit „§“ markiert) festgestellt werden. Die Y-Achse beschreibt dabei den Anteil der gefärbten Fläche pro Gesamtfläche. Unter den Diagrammen sind die jeweiligen mit Excel entsprechend dem Kapitel „Methodik“ ermittelten Mittelwerte der Übersichtlichkeit halber gerundet aufgeführt. Es wird ersichtlich, dass die Mittelwerte der verbrannten Stanzten mit 0,2796309 für die mit 1 µg/mL GDF-5 behandelte Haut, mit 0,2207586 für die mit 5 µg/mL behandelte Haut sowie mit 0,1737555 für die ohne GDF-5 behandelte Haut zu diesem Zeitpunkt stets höher sind als die der Kontrolle, der 0,0995238 beträgt. Dies wird durch die Diagramme veranschaulicht.

Zum Zeitpunkt von 6 Tagen kann man einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit 1µg/mL GDF-5 und der Kontrolle, der Behandlung mit 5µg/mL GDF-5 und der Kontrolle sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle feststellen (Abb. 44).

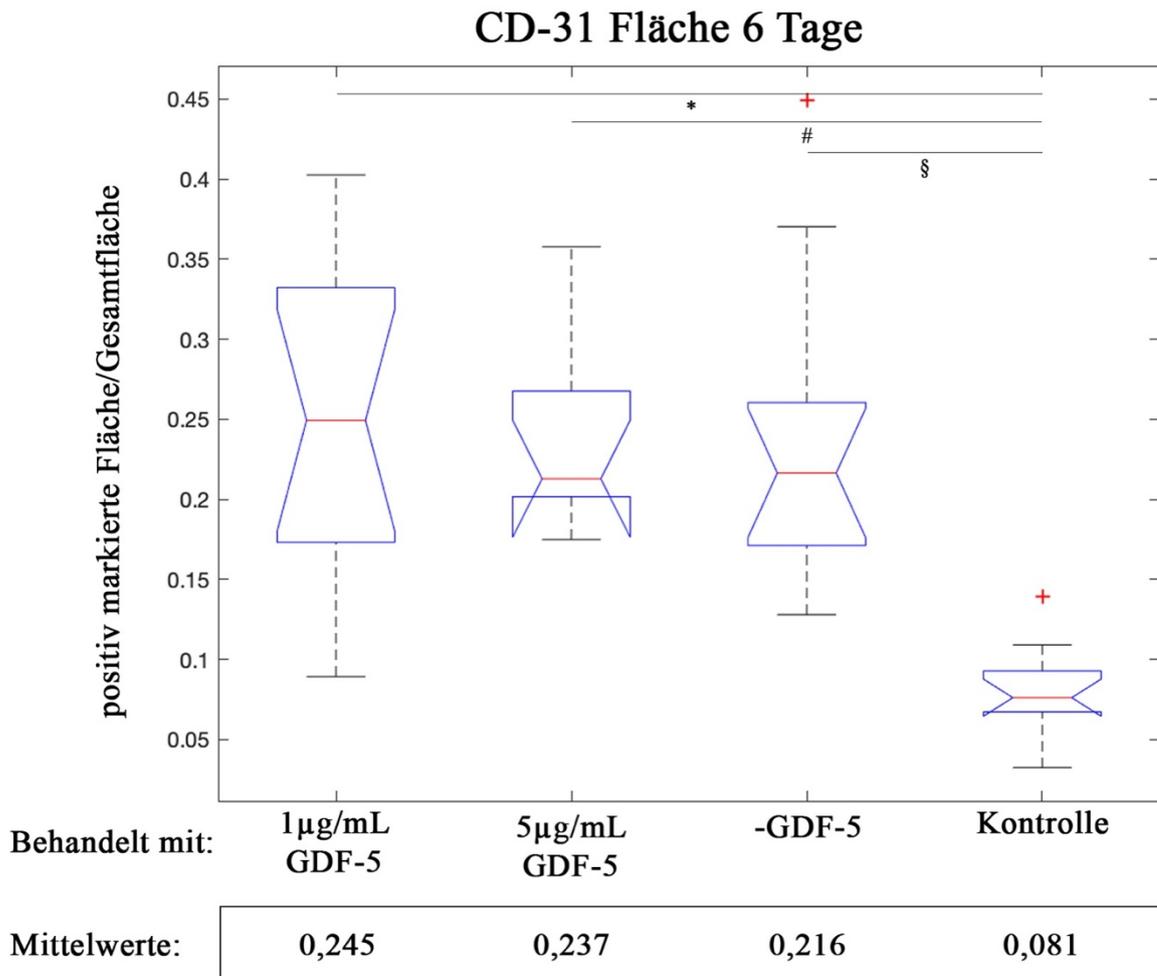


Abb. 44: Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit CD-31 gefärbten Fläche 6 Tage nach Verbrennung

Abb. 44: Die Abbildung stellt die statistische Auswertung der Antikörperfärbung mit CD-31 nach 6 Tagen dar. Die Y-Achse beschreibt die gefärbte Fläche pro Gesamtfläche.

Ein statistisch signifikanter Unterschied (zum Signifikanzniveau von $p < 0.05$) besteht entsprechend der Berechnungen zwischen der Behandlung mit 1µg/mL GDF-5 und der Kontrolle (mit „*“ markiert), der Behandlung mit 5µg/mL GDF-5 und der Kontrolle (mit „#“ markiert) sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle (mit „§“ markiert). Die in der Abbildung gerundeten Mittelwerte sind mit 0,245479 für die Behandlung mit 1µg/mL GDF-5, mit 0,237078 für die Behandlung mit 5µg/mL sowie für die verbrannte, aber unbehandelte Haut mit 0,216403 größer als der für die Kontrolle bestimmte Mittelwert von 0,080791.

Zum Zeitpunkt von 12 Tagen kann man einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit 1µg/mL GDF-5 und der Kontrolle, der Behandlung mit 5µg/mL GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 sowie der reinen Verbrennung und der Kontrolle feststellen (Abb. 45).

Zwischen der Behandlung mit 5µg/mL GDF-5 und 1µg/mL GDF-5 kann nur ohne Behebung des Alphafehlers mittels Bonferroni ein statistisch signifikantes Ergebnis gefunden werden.

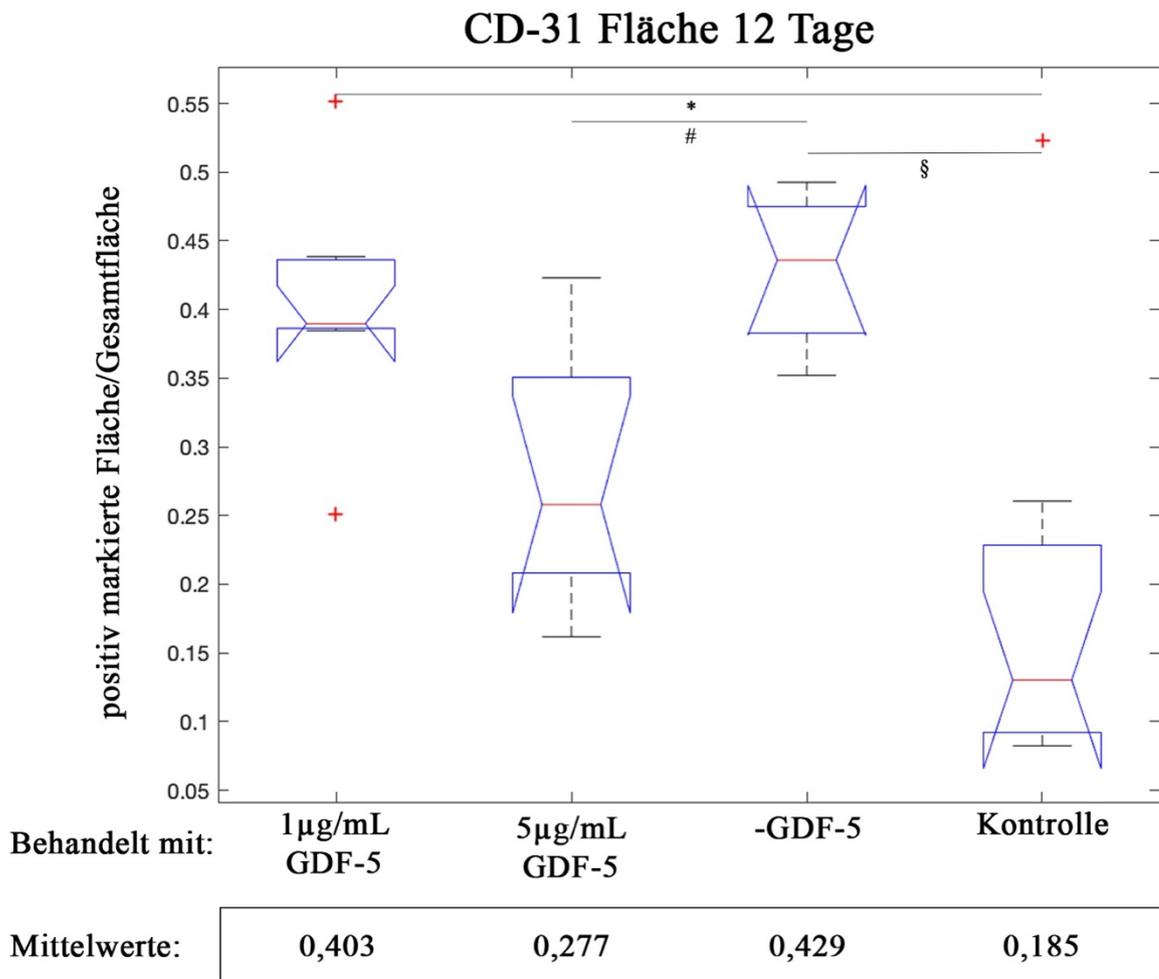


Abb. 45: Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit CD-31 gefärbten Fläche 12 Tage nach Verbrennung

Abb. 45: Die Abbildung stellt die statistische Auswertung der Antikörperfärbung mit CD-31 nach 12 Tagen dar. Die Y-Achse beschreibt die gefärbte Fläche pro Gesamtfläche.

Ein statistisch signifikanter Unterschied (zum Signifikanzniveau von $p < 0.05$) besteht entsprechend der Berechnungen zwischen der Behandlung mit 1µg/mL GDF-5 und der Kontrolle (mit „*“ markiert), der Behandlung mit 5 µg/mL GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 (mit „#“ markiert) sowie der reinen Verbrennung und der Kontrolle (mit „§“ markiert).

Die Mittelwerte sind mit 0,4034188 für 1µg/mL GDF-5 sowie mit 0,42894 von der reinen Verbrennung ohne GDF-5 höher als der Mittelwert der Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt, welcher bei 0,1853673 liegt. Der Mittelwert der Behandlung mit 5µg/mL GDF-5 ist darüber hinaus mit 0,2773375 kleiner als der für die reine Verbrennung.

4.2.2 CD-31-Antikörperfärbung Anzahl:

Die statistische Analyse der Anzahl der durch die Antikörperfärbungen mit CD-31 markierten Gefäße pro Zeitpunkt ergibt folgende Werte:

Zeitpunkt 0: $F(1,24)=0,4$ and $p = 0,5348$

Zeitpunkt 6 Stunden: $F(3,72)=13,56$ and $p = 0,00000041706$

Zeitpunkt 24 Stunden: $F(3,61)=5,32$ and $p = 0,0025$

Zeitpunkt 3 Tage: $F(3,40)=4,64$ and $p = 0,0071$

Zeitpunkt 6 Tage: $F(3,41)=13,39$ and $p = 0,00000311209$

Zeitpunkt 9 Tage: $F(3,33)=9,08$ and $p = 0,0002$

Zeitpunkt 11 Tage: $F(3,24)=4,15$ and $p = 0,0168$

Zeitpunkt 12 Tage: $F(3,32)=4,54$ and $p = 0,0092$

Sieben der hier angegebenen Werte fallen unterhalb des Signifikanzniveaus von $p < 0,05\%$ und scheinen dadurch statistisch signifikant zu sein. Dabei handelt es sich um die Ergebnisse der Zeitpunkte 6 Stunden, 24 Stunden, 3 Tage, 6 Tage, 9 Tage, 11 Tage und 12 Tage.

Unter Korrektur der *False Discovery Rate* sind alle und unter Korrektur der *Family Wise Error Rate* mittels Bonferroni nur noch die Ergebnisse der Zeitpunkte 6 Stunden, 6 Tage und 9 Tage statistisch signifikant. An diesen wird eine *Posthoc*-Analyse mit Hilfe von T-Test-Analysen durchgeführt und die *Family Wise Error Rate* wiederum korrigiert.

Zum Zeitpunkt von 6 Stunden nach Verbrennung kann man einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der Kontrolle, der Behandlung von $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle feststellen (Abb. 46). Zwischen der Behandlung mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 sowie der Behandlung mit $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der Kontrolle kann nur ohne Behebung des Alphafehlers mittels Bonferroni ein statistisch signifikantes Ergebnis gefunden werden.

CD-31 Anzahl 6 Stunden

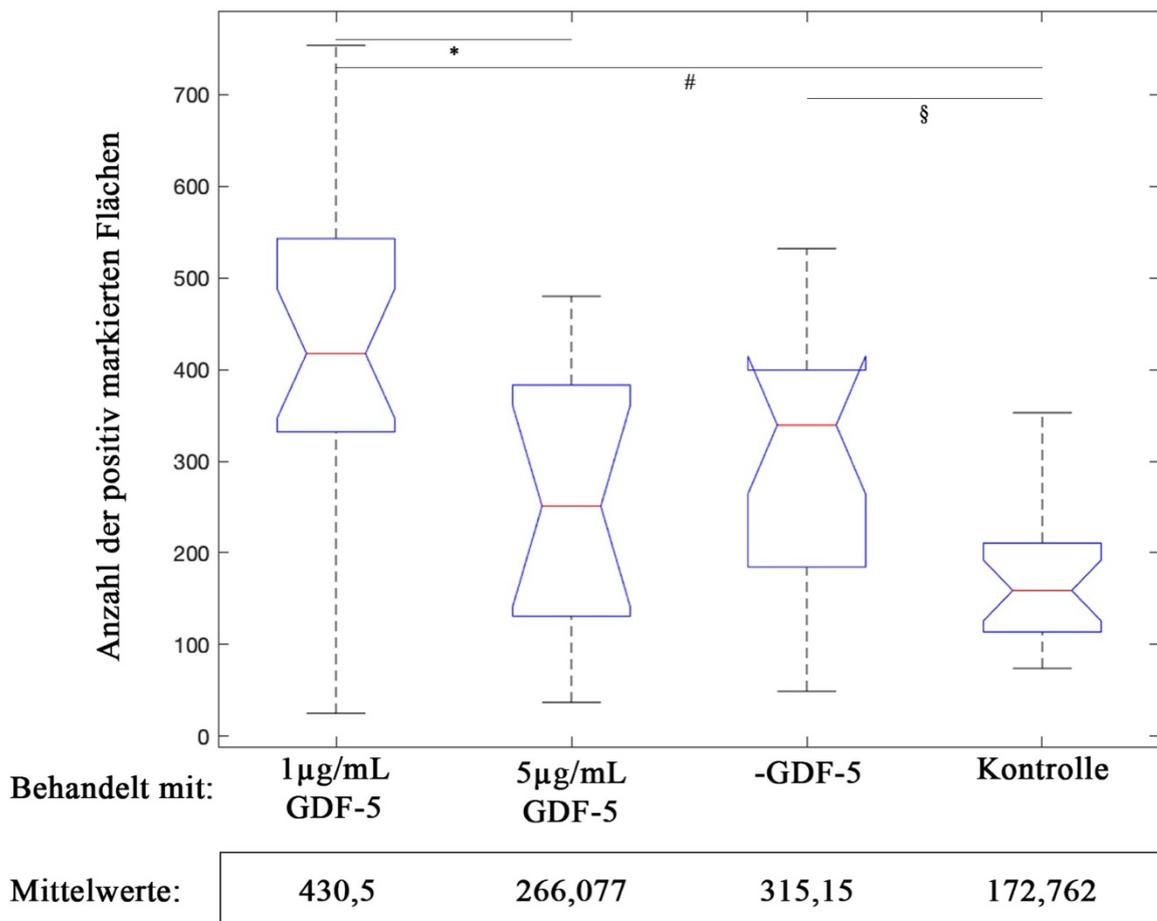


Abb. 46: Gekerbte Boxplot-Diagramme der Anzahl der mit CD-31 gefärbten Gefäße 6 Stunden nach Verbrennung

Abb. 46: Die Abbildung stellt die statistische Auswertung der Antikörperfärbung mit CD-31 nach 6 Stunden dar. Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der mit CD-31 markierten Gefäße.

Ein statistisch signifikanter Unterschied (zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$) besteht entsprechend der Berechnungen zwischen $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der Kontrolle (mit „#“ markiert), der Behandlung von $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 (mit „*“ markiert) sowie zwischen der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle (mit „§“ markiert).

Der in der Abbildung gerundete Mittelwert der Kontrolle ist mit 172,7619 kleiner als die Mittelwerte der verbrannten Haut, die für $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 430,5 und ohne GDF-5 315,15 beträgt. Der Mittelwert der mit $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 behandelten Haut ist mit 266,07692 kleiner als der Mittelwert der mit $1\mu\text{g/mL}$ behandelten Haut.

Zum Zeitpunkt von 6 Tagen kann man einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der Kontrolle, der Behandlung mit $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der Kontrolle sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle feststellen (Abb. 47). Zwischen der Behandlung mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 kann nur ohne Behebung des Alphafehlers mittels Bonferroni ein statistisch signifikantes Ergebnis gefunden werden.

CD-31 Anzahl 6 Tage

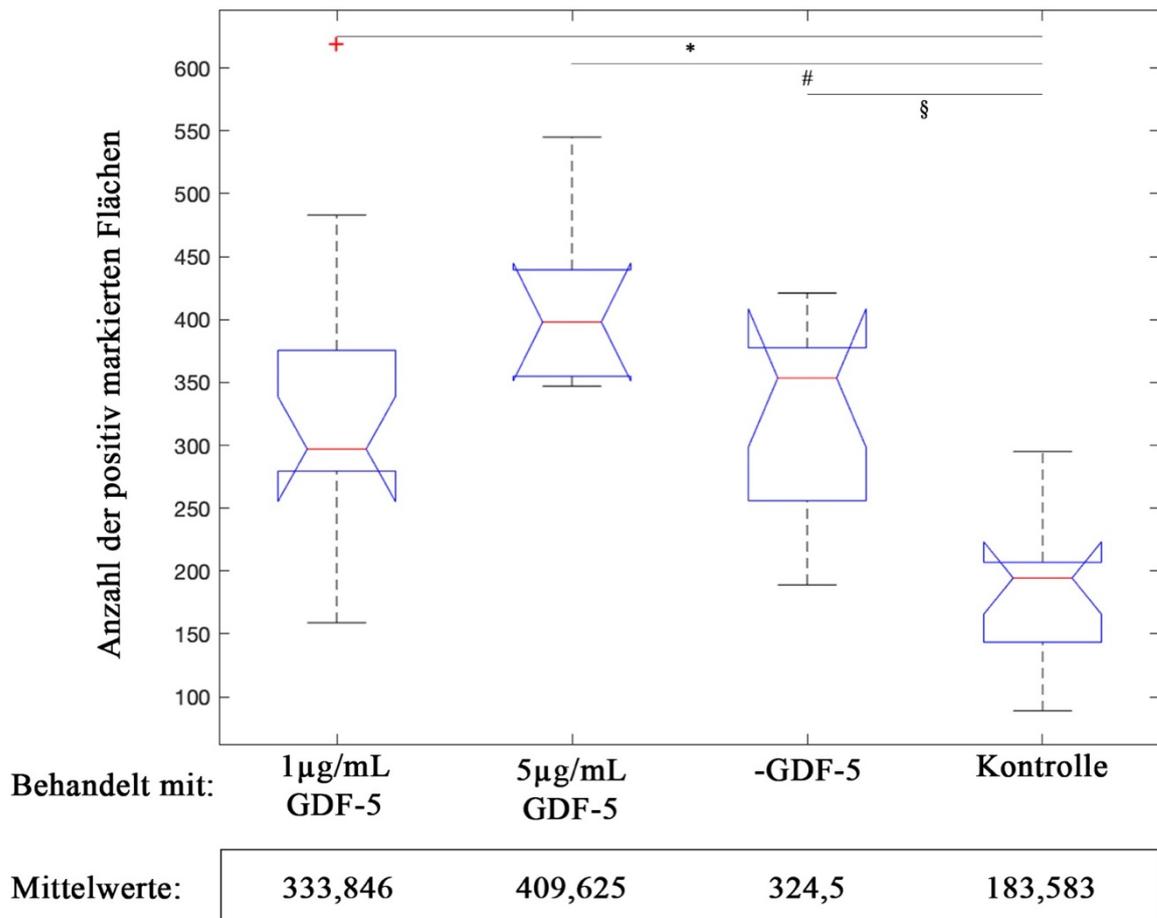


Abb. 47. Gekerbte Boxplot-Diagramme der Anzahl der mit CD-31 gefärbten Gefäße nach 6 Tage

Abb. 47: Die Abbildung stellt die statistische Auswertung der Antikörperfärbung mit CD-31 nach 6 Tagen dar. Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der mit CD-31 markierten Gefäße. Ein statistisch signifikanter Unterschied (zum Signifikanzniveau von $p < 0.05$) besteht entsprechend der Berechnungen zwischen der Behandlung mit $1 \mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der Kontrolle (mit „*“ markiert), der Behandlung mit $5 \mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der Kontrolle (mit „#“ markiert) sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle (mit „§“ markiert). Der in der Abbildung gerundete Mittelwert der Anzahl der Gefäße der Kontrolle ist mit 183,58333 kleiner als die Mittelwerte der Behandlung mit $1 \mu\text{g/mL}$ GDF-5, welcher 333,84615 beträgt, der Behandlung mit $5 \mu\text{g/mL}$ GDF-5, welcher 409,625 beträgt sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 Zugabe, bei der ein Mittelwert von 324,5 vorliegt.

Zum Zeitpunkt von 9 Tagen kann man einen statistisch signifikanten Unterschied lediglich zwischen der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle feststellen (Abb. 48). Zwischen der Behandlung mit $5 \mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 sowie der Behandlung mit $1 \mu\text{g/mL}$ und der Kontrolle kann nur ohne Behebung des Alphafehlers mittels Bonferroni ein statistisch signifikantes Ergebnis gefunden werden.

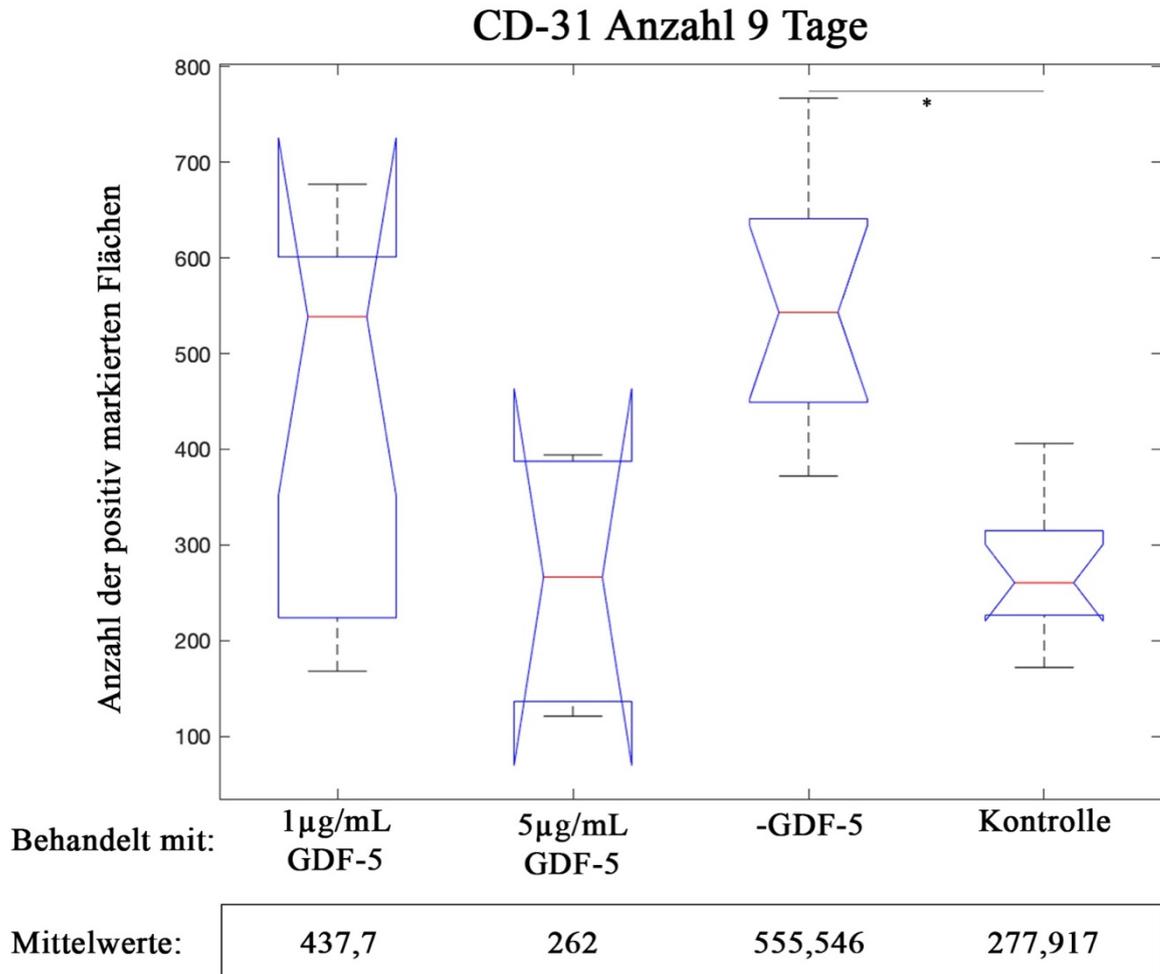


Abb. 48: Gekerbte Boxplot-Diagramme der Anzahl der mit CD-31 gefärbten Gefäße 9 Tage nach Verbrennung

Abb. 48: Die Abbildung stellt die statistische Auswertung der Antikörperfärbung mit CD-31 nach 9 Tagen dar. Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der mit CD-31 markierten Gefäße.

Ein statistisch signifikanter Unterschied (zum Signifikanzniveau von $p < 0.05$) besteht entsprechend der Berechnungen zwischen der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle (mit „*“ markiert).

Der in der Abbildung gerundete Mittelwert der Anzahl der Gefäße ist in der Kontrolle mit 277,916667 kleiner als der Mittelwert der verbrannten Haut, die nicht mit GDF-5 behandelt wurde, welcher 555,545455 beträgt.

4.2.3 Involucrin-Antikörperfärbung

Die statistische Analyse der Antikörperfärbungen mit Involucrin ergibt folgende Werte:

Zeitpunkt 0: $F(1,31)=3,55$ and $p = 0,0688$

Zeitpunkt 6 Stunden: $F(3,69)=2,76$ and $p = 0,0485$

Zeitpunkt 24 Stunden: $F(3,56)=0,92$ and $p = 0,4369$

Zeitpunkt 3 Tage: $F(3,46)=2,15$ and $p = 0,1063$

Zeitpunkt 6 Tage: $F(3,54)=0,26$ and $p = 0,8561$

Zeitpunkt 9 Tage: $F(3,52)=0,66$ and $p = 0,5782$

Zeitpunkt 11 Tage: $F(3,40)=1,45$ and $p = 0,2434$

Zeitpunkt 12 Tage: $F(3,37)=1,7$ and $p = 0,1845$

Lediglich der hier angegebene p-Wert zum Zeitpunkt 6 Stunden ist statistisch signifikant. Nach Adjustierung der *Family Wise Error Rate* und der *False Discovery Rate* ist allerdings keiner der Ergebnisse der Antikörperfärbung mit Involucrin statistisch signifikant, so dass wir hier keine *Posthoc*-Tests mehr durchführen.

4.2.4 KI-67-Antikörperfärbung

Die statistische Analyse der Antikörperfärbungen mit KI-67 ergibt folgende Werte:

Zeitpunkt 0: $F(1,26)=8,37$ and $p = 0,0076$

Zeitpunkt 6 Stunden: $F(3,76)=1,58$ and $p = 0,2006$

Zeitpunkt 24 Stunden: $F(3,44)=0,09$ and $p = 0,9677$

Zeitpunkt 3 Tage: $F(3,47)=0,62$ and $p = 0,6084$

Zeitpunkt 6 Tage: $F(3,42)=1,53$ and $p = 0,221$

Zeitpunkt 9 Tage: $F(3,37)=1,32$ and $p = 0,2817$

Zeitpunkt 11 Tage: $F(3,28)=4,81$ and $p = 0,008$

Zeitpunkt 12 Tage: $F(3,28)=14,16$ and $p = 0,00000839305$

Drei der hier angegebenen Werte fallen unterhalb des Signifikanzniveaus von $p < 0,05\%$ und scheinen dadurch statistisch signifikant zu sein. Dabei handelt es sich um die Ergebnisse der Zeitpunkte 0 Stunden, 11 Tage und 12 Tage.

Unter Korrektur der *False Discovery Rate* sind alle und unter Korrektur der *Family Wise Error Rate* mittels Bonferroni nur noch das Ergebnis zum Zeitpunkt 12 Tage statistisch signifikant. An diesem wird eine *Posthoc*-Analyse mit Hilfe von T-Test-Analysen durchgeführt und die *Family Wise Error Rate* wiederum korrigiert.

Ein statistisch signifikanter Unterschied kann zu diesem Zeitpunkt zwischen den Behandlungen mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5, der Behandlung von $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle festgestellt werden (Abb. 49).

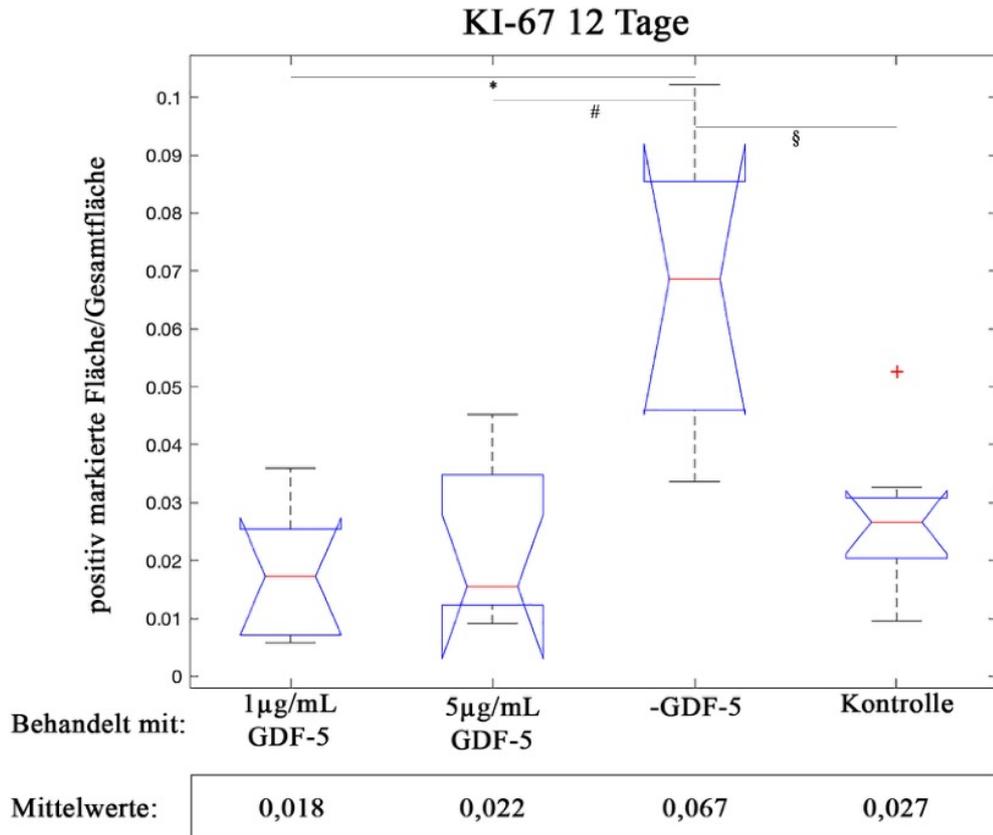


Abb. 49: Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit KI-67 gefärbten Fläche 12 Tage nach Verbrennung

Abb. 49: Die Abbildung stellt die statistische Auswertung der Antikörperfärbung mit KI-67 nach 12 Tagen dar. Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der gefärbten Fläche pro Gesamtfläche.

Ein statistisch signifikanter Unterschied (zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$) besteht entsprechend der Berechnungen zwischen den Behandlungen mit 1 µg/mL GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 (mit „*“ markiert), der Behandlung mit 5 µg/mL GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 (mit „#“ markiert) sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle (mit „§“ markiert). Der in der Abbildung gerundete Mittelwert der Fläche der Stenzen, die nicht mit GDF-5 behandelt sind (Mittelwert= 0,066715714) ist gegenüber der mit 5 µg/mL GDF-5 (Mittelwert= 0,0224625) und 1 µg/mL GDF-5 (Mittelwert= 0,01771375) behandelten Haut sowie der Kontrolle (Mittelwert= 0,026941111) größer.

4.2.5 α-SMA-Antikörperfärbung

Die statistische Analyse der Antikörperfärbungen mit α-SMA ergibt folgende Werte:

Zeitpunkt 0: $F(1,26)=0,05$ and $p = 0,8274$

Zeitpunkt 6 Stunden: $F(3,63)=7,17$ and $p = 0,0003$

Zeitpunkt 24 Stunden: $F(3,41)=2,52$ and $p = 0,0709$

Zeitpunkt 3 Tage: $F(3,53)=1,51$ and $p = 0,2234$

Zeitpunkt 6 Tage: $F(3,46)=4,34$ and $p = 0,0089$

Zeitpunkt 9 Tage: $F(3,46)=0,54$ and $p = 0,6563$

Zeitpunkt 11 Tage: $F(3,30)=3,18$ and $p = 0,0382$

Zeitpunkt 12 Tage: $F(3,29)=1,93$ and $p = 0,1475$

Drei der hier angegebenen Werte fallen unterhalb des Signifikanzniveaus von $p < 0,05\%$ und scheinen dadurch statistisch signifikant zu sein. Dabei handelt es sich um die Ergebnisse der Zeitpunkte 6 Stunden, 6 Tage und 11 Tage.

Unter Korrektur der *False Discovery Rate* sind alle Ergebnisse und unter Korrektur der *Family Wise Error Rate* mittels Bonferroni nur noch das Ergebnis zum Zeitpunkt 6 Stunden statistisch signifikant. An diesem wird eine *Posthoc*-Analyse mit Hilfe von T-Test-Analysen durchgeführt und die *Family Wise Error Rate* wiederum korrigiert.

Zum Zeitpunkt von 6 Stunden nach Verbrennung konnte man einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 feststellen (Abb. 50). Ohne Korrektur der *Family Wise Error Rate* sind zudem signifikante Ergebnisse zwischen den Behandlungen mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5, der Behandlung von $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5, zwischen $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der Kontrolle sowie zwischen der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle festzustellen.

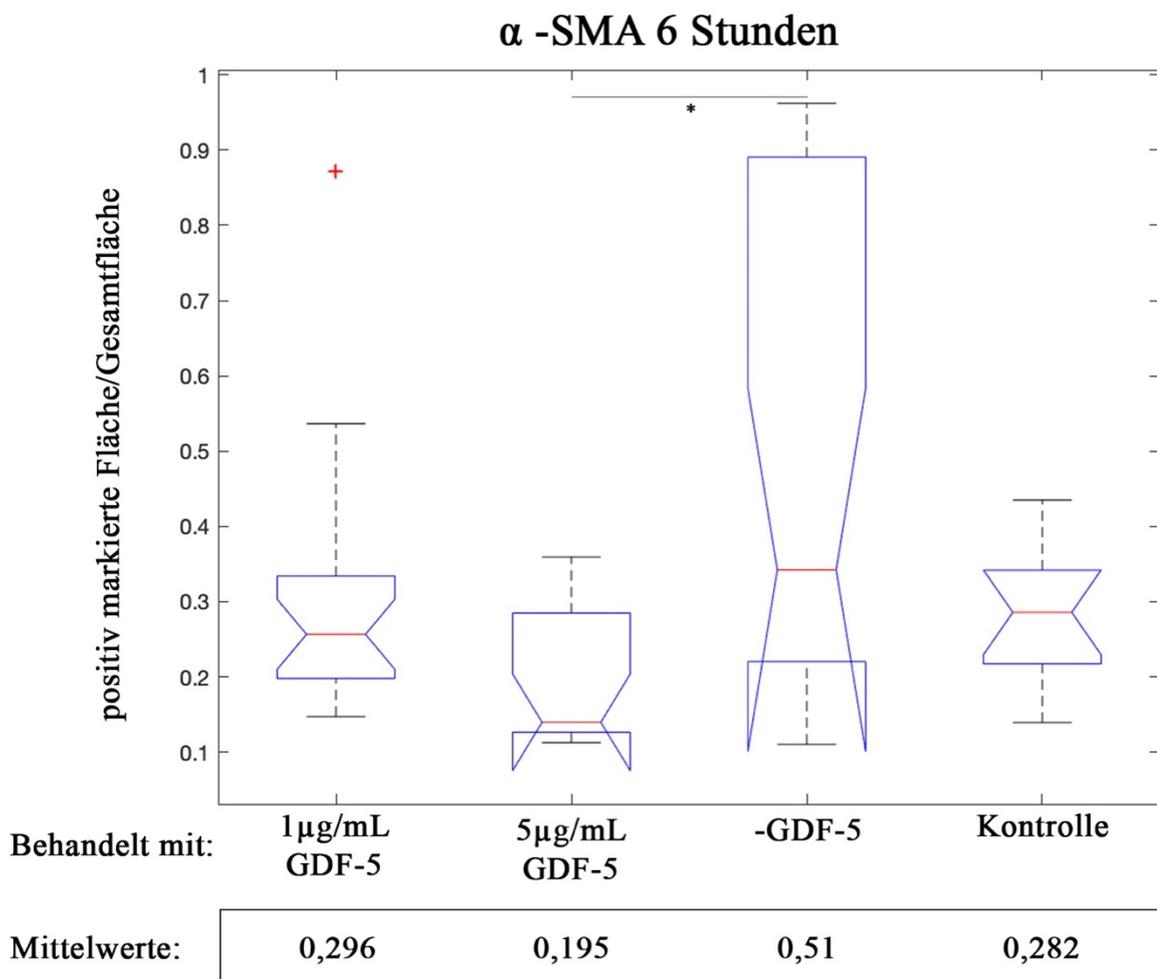


Abb. 50: **Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit α -SMA gefärbten Fläche 6 Stunden nach Verbrennung**

Abb. 50: Die Abbildung stellt die statistische Auswertung der Antikörperfärbung mit α -SMA nach 6 Stunden dar. Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der gefärbten Fläche pro Gesamtfläche.

Ein statistisch signifikanter Unterschied (zum Signifikanzniveau von $p < 0.05$) besteht entsprechend der Berechnungen zwischen der Behandlung mit $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 (mit „*“ markiert).

Der in der Abbildung gerundete Mittelwert der Fläche der nicht behandelten verbrannten Haut ist mit $0,5096203$ gegenüber dem Mittelwert der mit $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 behandelten Haut mit $0,1947903$ größer.

4.2.6 Ergebnisse im zeitlichen Verlauf

Über diese Ergebnisse hinaus untersuchen wir die Veränderungen der Ergebnisse der Antikörperfärbungen über die Zeit je nach Behandlung.

Die statistische Auswertung ergibt Folgendes:

Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied der Flächenfärbung, die durch den CD31-Antikörper identifiziert wird, in der Gruppe ohne GDF-5 Behandlung (korrigierter p-Wert (FWE)= $0,00000069$) sowie in der Kontrolle (korrigierter p-Wert (FWE)= $0,000000000019$) über die Zeit (Abb. 51).

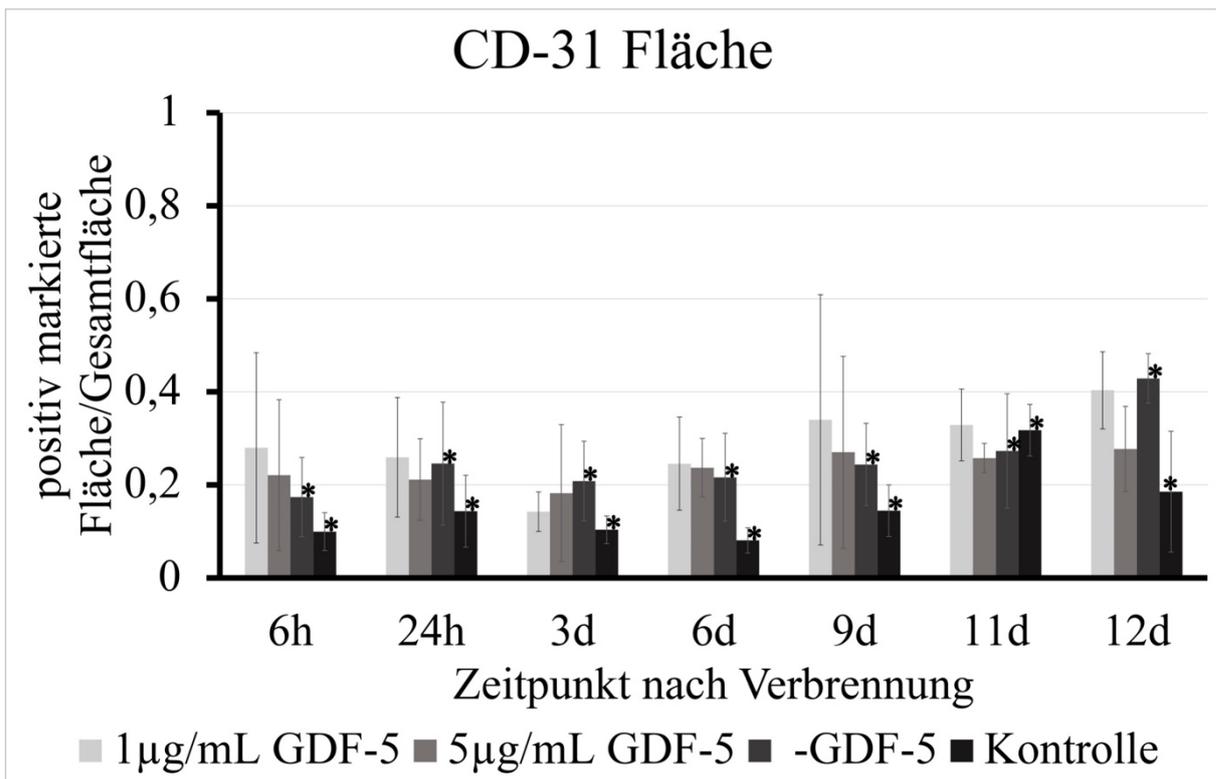


Abb. 51: **Zeitlicher Verlauf der mit CD-31 markierten Flächen**

Abb 51: Die Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der Färbegergebnisse für die mit CD-31 markierten Fläche pro Gesamtfläche der verschiedenen Behandlungen dar. Es zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede über die Zeit (zum Signifikanzniveau von $p < 0.05$) in der verbrannten und nicht behandelten Haut sowie in der Kontrolle. Dargestellt sind hier die in Excel bestimmten Mittelwerte sowie Standardabweichungen.

Für die Anzahl der mit CD-31 dargestellten Flächen können signifikante Unterschiede bei den mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 (korrigierter p-Wert (FWE)= $0,039$) behandelten sowie ohne GDF-5 (korrigierter p-

Wert (FWE)=0,00000027) behandelten Hautstanzen und den Kontrollstanzen (korrigierter p-Wert (FWE)=0,0000000013) im zeitlichen Verlauf festgestellt werden (Abb. 52).

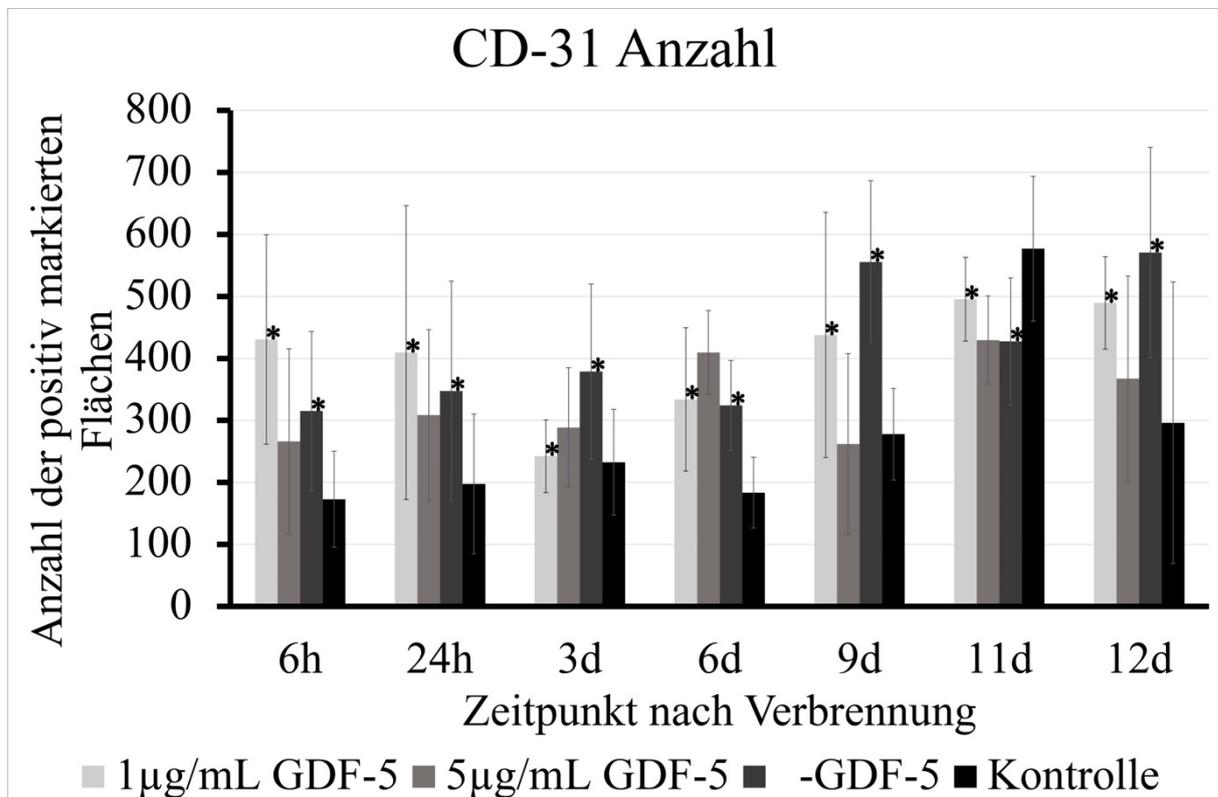


Abb. 52: **Zeitlicher Verlauf der mit CD-31 ermittelten Gefäßanzahl**

Abb 52: Die Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der Färbeergebnisse für die mit CD-31 markierte Gefäßanzahl der verschiedenen Behandlungen dar. Es zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede über die Zeit (zum Signifikanzniveau von $p < 0.05$) in der verbrannten und mit 1µg/mL GDF-5 behandelten sowie in der verbrannten und nicht behandelten Haut. Dargestellt sind hier die in Excel bestimmten Mittelwerte sowie Standardabweichungen.

Für die Involucrin-Antikörperfärbung ist bei keiner Behandlung ein statistisch signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf zu beobachten (Abb. 53).

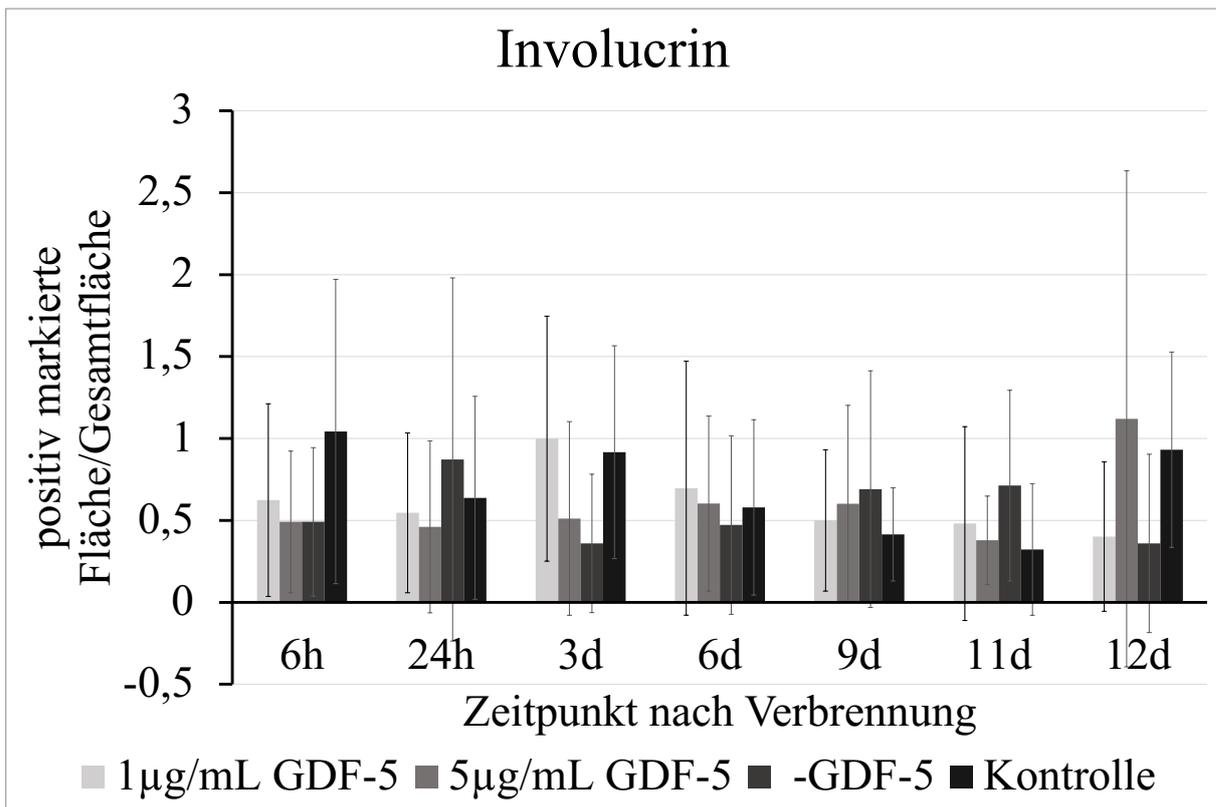


Abb. 53: Zeitlicher Verlauf der mit Involucrin dargestellten Flächen

Abb 53: Die Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der Färbeergebnisse für die mit Involucrin markierten Fläche pro Gesamtfläche der verschiedenen Behandlungen dar. Es zeigen sich (zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$) keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dargestellt sind hier die in Excel bestimmten Mittelwerte sowie Standardabweichungen.

Die mit der KI-67-Antikörperfärbung markierten Stanzen zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied im zeitlichen Verlauf für die Behandlung mit 1µg/mL GDF-5 (korrigierter p-Wert (FWE)=0,0005), 5µg/mL GDF-5 (korrigierter p-Wert (FWE)=0,000024) sowie ohne GDF-5-Behandlung (korrigierter p-Wert (FWE)=0,0001) (Abb. 54).

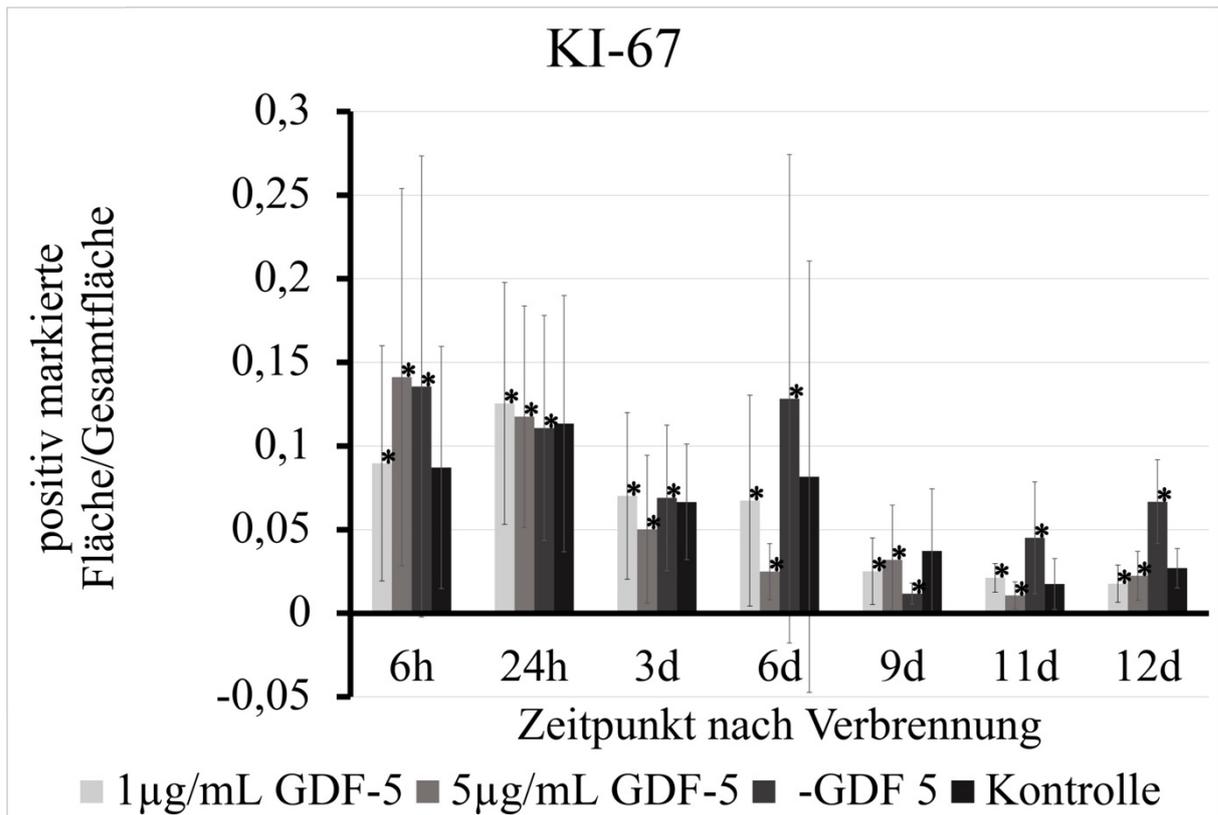


Abb. 54: **Zeitlicher Verlauf der mit KI-67 markierten Fläche**

Abb. 54: Die Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der mit KI-67 markierten Fläche pro Gesamtfläche dar. Es zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede (zum Signifikanzniveau von $p < 0.05$) im zeitlichen Verlauf der mit 1µg/mL GDF-5 und mit 5µg/mL GDF-5 behandelten sowie der verbrannten, aber nicht behandelten Haut. Dargestellt sind hier die in Excel bestimmten Mittelwerte sowie Standardabweichungen.

Ein statistisch signifikanter Unterschied kann auch bei den α -SMA-Antikörperfärbungen über die Zeit für die Behandlung mit 5µg/mL GDF-5 (korrigierter p-Wert (FWE)=0,0031) und 1µg/mL GDF-5 (korrigierter p-Wert (FWE)=0,0012) ermittelt werden (Abb. 55).

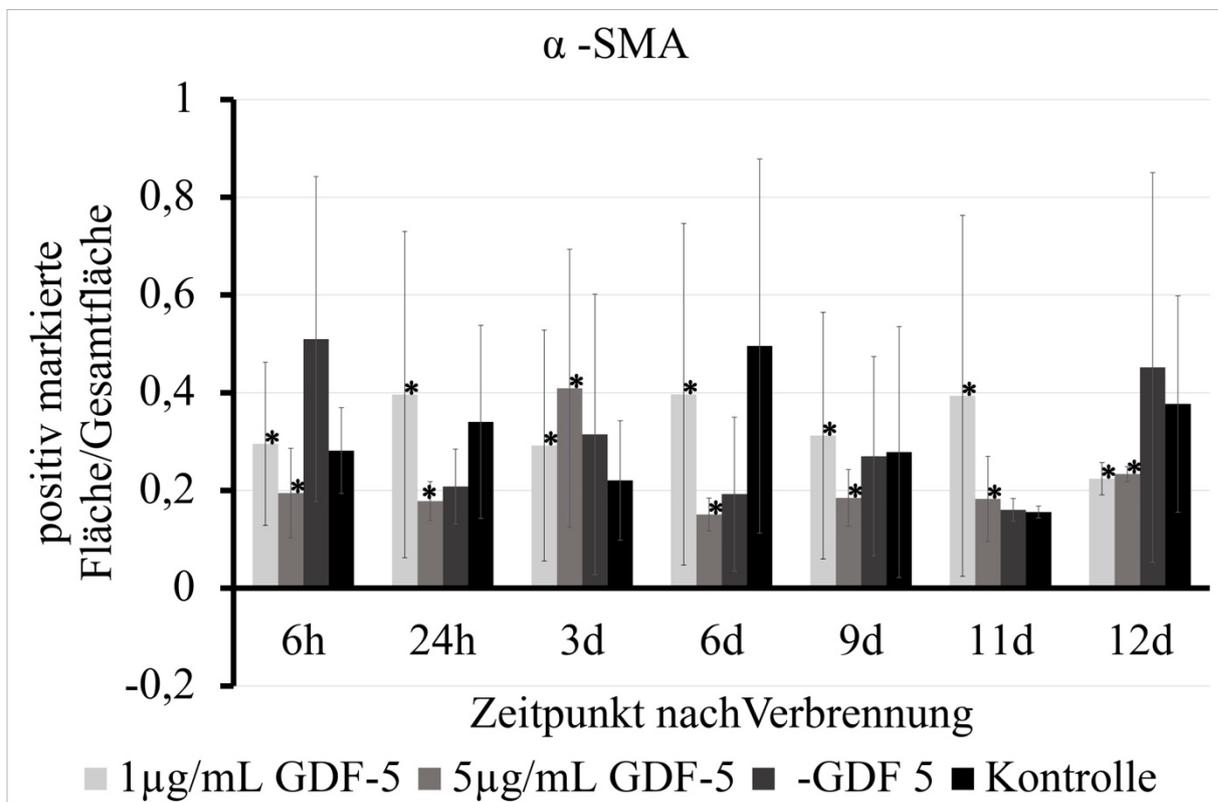


Abb. 55: Zeitlicher Verlauf der mit α -SMA markierten Fläche

Abb. 55: Die Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der mit α -SMA markierten Fläche pro Gesamtfläche dar. Es zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf (zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$) der mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und mit $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 behandelten Haut. Dargestellt sind hier die in Excel bestimmten Mittelwerte sowie Standardabweichungen.

4.3 Auswertung alternativer Verfahren

Wie oben beschrieben, sehen wir von einer Auswertung der PCR-Stanzen ab, da sich die Herstellung von 2mm großen Stanzen nicht als praktikabel erweist. Zudem zeigt sich in allen durchgeführten TUNEL-Färbungen eine konstante Überfärbung. Da wir davon ausgehen, dass es sich um einen Fehler im Färbeprotokoll handelt, werden diese Präparate ebenfalls verworfen.

5 Diskussion

Verbrennungen stellen Kliniker bis heute weltweit vor große Herausforderungen, da sie neben funktionellen Beeinträchtigungen auch in den Aspekten Ästhetik und Stigmatisierung Folgen tragen können [71]. Häufig sind soziale Randgruppen, Kinder und psychisch Erkrankte betroffen [6, 72]. Vor allem aufgrund eines drohenden Multiorganversagens sind Schwerstverletzte vital bedroht [5]. Daneben belastet diese Form der Verletzung das Gesundheitssystem unter anderem durch lange Krankenhausaufenthalte und aufwändige Rehabilitationsmaßnahmen [219, 220]. Bei tieferen Verbrennungen stellt die Exzision des nekrotischen Gewebes mit eventuell folgender Spalthauttransplantation immer noch die Therapie der Wahl dar [5, 71]. Bei großem Hautverlust ist dies allerdings nicht mehr möglich, weshalb dringend nach Alternativverfahren gesucht wird [78].

Wünschenswert wäre eine Therapiealternative, die die Wundheilung von Verbrennungswunden beschleunigt.

Wachstumsfaktoren stellen einen vielversprechenden Ansatz für die Verbesserung der Wundheilung dar [80]. In den verschiedenen Phasen der Wundheilung spielen sie in der Chemotaxis aber auch in der Aktivierung von für die Wundheilung essenzieller Zellen eine zentrale Rolle [84-91].

Wundheilung ist in Exsudations-/Entzündungsphase, Resorptionsphase, Granulationsphase, Reparationsphase sowie Remodellierungsphase gegliedert [14, 18, 19]. In der ersten Phase bildet sich ein Fibrinkoagulum [14, 18]. In der darauffolgenden Resorptionsphase spielen vor allem Entzündungszellen eine Rolle, die beschädigtes Gewebe und Bakterien phagozytieren [14, 18]. Die anschließende Resorptionsphase ist von einer Persistenz dieses Aufräumprozesses sowie der Proliferation von Fibroblasten geprägt [18, 19]. Es folgt die Proliferationsphase [18]. Hier bildet sich eine primäre extrazelluläre Matrix, die größtenteils aus Fibroblasten und Myofibroblasten besteht [18, 19, 21]. Letztere kontraktionsfähige Zellen tragen *Alpha-Smooth muscle actin* (α -SMA) und ermöglichen den Wundverschluss [18, 19, 22, 221]. In dieser Phase beginnt über die genannten Prozesse hinaus außerdem die Angiogenese, für die endotheliale Adhäsionsmoleküle wie der Angiogenesemarker *Platelet Endothelial Cell adhesion molecule-1* (CD-31/PECAM-1) essenziell sind [14, 24-27].

Die letzte Phase bildet die Reparationsphase [18]. Reepithelialisierung findet durch Keratinozyten vom Wundrand aus, aber auch durch Stammzellen der äußeren Haarwurzelscheide, statt [28]. Die Stammzellen präsentieren Proliferationsantigene wie KI-67 [8]. Die ausdifferenzierten verhornten Keratinozyten des Stratum corneum tragen Involucrin in ihrer verhornten Hülle [8].

Essentielle Schritte der Wundheilung sind demnach die Angiogenese [222], die Reepithelialisierung [223, 224] und die Myofibrogenese. In anderen Arbeiten wurden folgende Marker zur Darstellung der Wundheilung genutzt: CD-31 und VEGF zur Darstellung der Angiogenese [222], Involucrin zur Darstellung der Reepithelialisierung [225] und α -SMA zur Darstellung der Myofibrogenese [226].

Aufgrund der weitläufigen Nutzung dieser Faktoren, entscheiden wir uns ebenfalls für ihre Verwendung.

In dem hier beschriebenen Modell wird der Faktor GDF-5 untersucht. Er scheint die beschriebenen wichtigen Schritte der Wundheilung zu unterstützen.

Bereits lange ist bekannt, dass durch ihn die Angiogenese gefördert wird [179]. Er besitzt antiapoptotische Wirkung [180], was dem Wachstum zugutekommen könnte.

Die Bildung und das Wachstum wichtiger dermaler Bestandteile, wie beispielsweise der extrazellulären Matrix, werden durch diesen Faktor angeregt [176]. So hat er auf Fibroblasten, die wie oben beschrieben, eine zentrale Rolle in der Wundheilung spielen, eine stimulierende Wirkung [173, 184-187].

In der Literatur konnte der positive Effekt von GDF-5 auf die Wundheilung bereits beschrieben werden [193]. Darüber hinaus bestehen Ansätze, die den Effekt dieses Faktors auf Verbrennungswunden beschreiben [77].

Für die Evaluation der Wundheilung finden sich verschiedene Modelle.

Vor allem werden in der Literatur *in vivo* [99, 101-103, 227, 228] und *in vitro* [100] Modelle am Tier bzw. an tierischen Zellen aufgeführt. Die Nutzung tierischen Gewebes ist nicht nur aufgrund der Verfügbarkeit vom Vorteil, sie birgt auch weitaus geringere Risiken für den Untersucher beispielsweise eine Infektionskrankheit zu erleiden [229]. Verschiedene Spezies werden zur Evaluation der Wundheilung genutzt. Führend sind die Versuche am Kaninchen [99, 100], an der Maus [101, 102] sowie am Schwein [100, 103] [227, 228]. Vor allem die Verwendung von Letzterem hat sich etabliert. Schweinehaut weist ähnliche Charakteristika wie humane Haut auf, unter anderem in Bezug auf Anatomie, Dicke und Permeabilität [229, 230].

Je früher man in der Literatur zurückgeht, umso mehr Quellen finden sich über Versuche, bei denen Probanden Wunden zugefügt wurden, um die Wundheilung zu erforschen [231-233]. Darüber hinaus wurden auch randomisiert kontrollierte Studien an humaner Haut durchgeführt [104, 106, 107].

Die *in vivo* Arbeit an menschlicher Haut wirft ethische Probleme auf [230]. Eine große Schwachstelle ihrer Verwendung ist darüber hinaus die große Variabilität, so zum Beispiel Unterschiede in Alter, Entnahmestelle und nicht genau ermittelbare Einflussfaktoren wie der *Lifestyle* [229]. Systemische Einflussfaktoren können im *in vivo* Experiment nicht unterbunden werden, was zu einer schweren Vergleichbarkeit führt [230].

Bereits 1996 wurde ein Modell beschrieben, das die Wundheilung an menschlicher Haut erforscht und dabei die ethischen Konflikte umgeht [230]. Das überschüssige Gewebe von Mammareduktionsplastiken wurde dabei genutzt. Das subkutane Fettgewebe ist von der Dermis entfernt worden. Nun wurden mit Hilfe einer Stanze Wunden gesetzt und diese ausgestanzt. Die Haut wurde im Medium bestehend aus DMEM, Antibiotika und FCS vital erhalten. Ähnliche Zusammensetzungen des Mediums wurden auch in anderen Forschungsarbeiten beschrieben: DMEM, FCS 10%, Penicillin/Streptomycin für humane Fibroblasten [234].

Das beschriebene Modell ist einfach und reproduzierbar [230]. Die Verwendung der Haut eines Spenders sowie der gleichen Lokalisation ermöglichen eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse [230].

In der Literatur ist darüber hinaus ein *in vivo* Verbrennungsmodell am Schwein beschrieben, bei dem ein Metallstück auf je 50, 60 und 70°C im Wasserbad erhitzt und damit eine Verbrennungswunde zugefügt wurde [235]. Anschließend wurden an bestimmten Zeitpunkten nach Verbrennung Biopsien

entnommen und immunhistochemische Färbungen durchgeführt [235]. Ein ganz ähnliches Modell wurde darüber hinaus an humaner Haut beschrieben [194]. Hierbei wurde das entfernte Gewebe von Abdominoplastiken verwendet und mit einem LötKolben bei 95°C für 10 Sekunden eine Verbrennungswunde zugefügt [194]. Die Proben wurden ebenfalls im Medium vital gehalten und anschließend unter anderem mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen evaluiert.

Die beschriebenen Modelle gleichen dem hier durchgeführten Experiment in vieler Hinsicht. Wir verwenden ebenfalls das überschüssige Gewebe von Abdominoplastiken und trennen die Kutis von der Subkutis. Anschließend fügen wir der Haut Verbrennungen mit Hilfe eines im Wasserbad auf 90°C erhitzten Kupferstempels für 10 Sekunden zu. Die Läsionen werden ausgestanzt und im Medium, dem entweder zwei unterschiedliche Konzentrationen GDF-5 oder kein GDF-5 zugesetzt wird, vital erhalten. An definierten Zeitpunkten werden die Stenzen dem Medium entnommen und histologische Schnitte erzeugt. Anschließend erfolgen immunhistochemische Färbungen, bei denen die oben beschriebenen Marker zur Evaluation zentraler Schritte der Wundheilung verwendet werden. Mit der beschriebenen Methodik können wir die Wundheilung von Verbrennungswunden humaner Haut in reproduzierbarer, standardisierter Weise beschreiben und dabei ethische Konflikte größtenteils umgehen. Für dieses Modell muss weder Menschen noch Tieren Schaden zugefügt werden und es besteht die Möglichkeit, die Versuchsreihe, bei ausreichend viel Gewebe, beliebig lang für jeden Spender fortzuführen.

Ziel des Experiments ist es, den wundheilungsfördernden Effekt von GDF-5 im *ex vivo* Experiment anhand einer neu etablierten Methodik zu erforschen. Erreicht wird dies durch die Verbrennung und anschließende Vitalerhaltung von humanen Hautlappen. Überprüft werden die Effekte auf die Wundheilung mithilfe von Formalin fixiertem Paraffin eingebetteten Gewebes unter Evaluierung durch immunhistochemischen Antikörperfärbungen mit CD-31, α -SMA, KI-67 und Involucrin.

Im Folgenden werden die Antikörperfärbungen einzeln betrachtet:

5.1 Immunhistochemische Färbungen

5.1.1 CD-31

Ein essenzieller Bestandteil der Wundheilung stellt die Angiogenese dar, welche in der Proliferationsphase stattfindet [14]. Es entstehen hierbei neue Gefäße aus den Kapillaren des umliegenden Gewebes [14]. Wir nutzen die Angiogenese als einen Faktor, um die Wundheilung evaluieren zu können. Einer der wichtigsten in der Literatur beschriebenen Marker dieses Prozesses ist CD-31 [24-27], weshalb auch wir uns für diese Antikörperfärbung entscheiden.

Gemessen wird nicht nur die mit dem Antikörper gegen CD-31 markierte Fläche, sondern auch die Anzahl der Gefäße, die gefärbt werden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse können einige Beobachtungen getroffen werden.

Lediglich drei Ergebnisse der Analyse der Flächenberechnung sind bei der Antikörperfärbung mit CD-31 statistisch signifikant.

Zum Zeitpunkt von 6 Stunden zeigt sowohl die Behandlung mit 1 µg/mL GDF-5, 5 µg/mL GDF-5 sowie die Verbrennung, die nicht mit GDF-5 behandelt wird, einen zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$

statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die Mittelwerte der Flächenberechnung der verbrannten Stenzen, die mit 1µg/mL, mit 5µg/mL sowie ohne GDF-5 behandelt werden, liegen zu diesem Zeitpunkt stets höher als die der Kontrolle. Es scheinen sich also mehr Gefäße in ihnen gebildet zu haben als in der nicht verbrannten Haut.

Zum Zeitpunkt von 6 Tagen sind die Ergebnisse der verbrannten Haut unabhängig von der Behandlung statistisch signifikant größer als die der Kontrolle. Auch hier sind die Mittelwerte für die Behandlung mit 1µg/mL GDF-5, die Behandlung mit 5µg/mL sowie für die verbrannte, aber unbehandelte Haut größer als der für die Kontrolle bestimmte Mittelwert. Folglich scheinen sich hier ebenfalls mehr Gefäße in der verbrannten Haut gebildet zu haben als in der Kontrolle.

Zum Zeitpunkt von 12 Tagen kann zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit 1µg/mL und der Kontrolle sowie zwischen der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle gesehen werden. Betrachtet man die Mittelwerte, so ist ersichtlich, dass der Wert für 1µg/mL GDF-5 sowie der Mittelwert der reinen Verbrennung ohne GDF-5 höher ist, als der Mittelwert der Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt. Dies zeigt uns, dass eine größere Fläche im Präparat rotgefärbt und damit mehr Gefäße in der verbrannten und mit 1µg/mL GDF-5 behandelt sowie in der verbrannten und nicht mit GDF-5 behandelten gegenüber der nicht verbrannten Kontrolle vorhanden zu sein scheinen.

Darüber hinaus liegt ein signifikanter Unterschied zum gleichen Zeitpunkt zwischen der Behandlung mit 5µg/mL GDF-5 und der reinen Verbrennung ohne GDF-5 vor. Betrachtet man hier ebenfalls die mit Excel berechneten Mittelwerte, sieht man, dass anders als erwartet, ein höherer Wert ohne die Behandlung mit GDF-5 besteht. Dies zeigt, dass sich nach 12 Tagen mehr Gefäße in der Haut, die nur verbrannt, aber nicht mit GDF-5 behandelt wurde, gebildet haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich zumindest in den Stenzen zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 6 Tage und 12 Tage in der verbrannten Haut mehr Gefäße gebildet zu haben scheinen. Dies könnte darauf hinweisen, dass in der neu etablierten Methodik eine Form der Wundheilung stattfindet. Leider lässt sich auf die Fläche der Gefäße in den Präparaten in keiner Konzentration ein positiver Effekt von GDF-5 nachweisen, sogar ein negativer Effekt ist durch das Ergebnis nach 12 Tagen zu vermuten.

Betrachtet man den Mittelwert für jeden Zeitpunkt (siehe „**Ergebnisse**“), so ist bei keiner Behandlung ein kontinuierlicher Verlauf ersichtlich. Vielmehr scheinen die Werte zu undulieren. Anderen Versuchen zu Folge hätte man zunächst einen Anstieg und einen anschließenden Abfall der Blutgefäßdichte, die durch Anti-CD-31 dargestellt wird, erwartet [236].

Die Evaluation der Angiogenese anhand von Flächenbestimmung der mit CD-31 markierten Bereiche hat zwei wesentliche Schwachstellen. Zum einen variiert die Fläche je nach Anschnitt des Gefäßes. Ist ein Gefäß im Präparat längs angeschnitten, liegt also der Verlauf des Gefäßes parallel zur Schnittrichtung des Mikrotoms, so ist davon auszugehen, dass die markierte und somit von uns berechnete Fläche größer ist, als wenn das Gefäß quer angeschnitten wird (Abb. 56). So kann die durch den Längsschnitt größere Fläche des Gefäßes eine vermeintlich verstärkte Angiogenese vortäuschen.

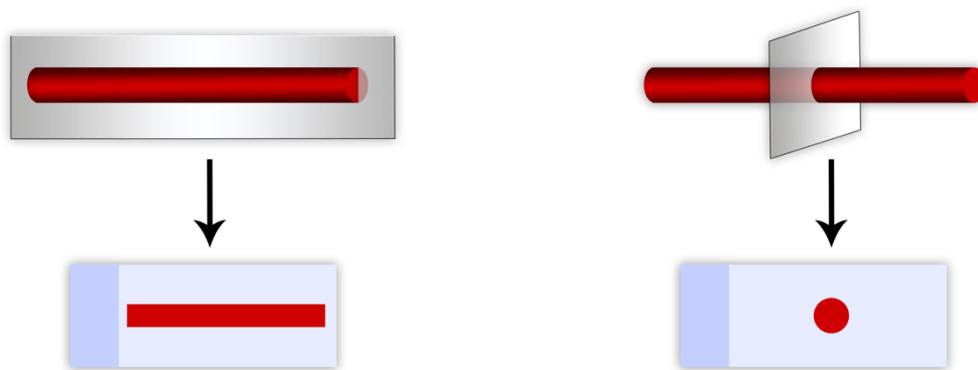


Abb. 56: Vergleich eines längsangeschnittenen Gefäßes und eines querangeschnittenen Gefäßes

Abb. 56: Zu sehen ist der Schnitt durch ein Gefäß parallel zu dessen Längsverlauf (links) sowie ein Gefäß, welches quer geschnitten wurde (rechts). Unten sind Objektträger dargestellt, auf denen sich die Schnitte befinden. Man sieht, dass sich beim Längsanschnitt mehr Fläche des Gefäßes auf dem Objektträger befindet als beim Querschnitt. Dies könnte zu verfälschten Ergebnissen führen.

Zur Behebung dieses Fehlers nutzen wir zwei Ansätze:

Zum einen ermöglicht das Erzeugen von mehreren Schnitten pro Stanze (wie in „**Methodik**“ vorgestellt, haben wir angestrebt jeweils 3 Schnitte pro Stanze zu produzieren) ein valideres Ergebnis. Ein längsangeschnittenes Gefäß kommt eher nur in einem der Schnitte vor, während ein querangeschnittenes Gefäß mehrfach angeschnitten vorliegen kann.

Zum anderen bestimmen wir zusätzlich die Anzahl der rot gefärbten Bereiche, um so Aussagen über die Anzahl der Gefäße im Schnitt treffen zu können.

Das zweite Problem, das sich im Zusammenhang mit der Evaluierung der Angiogenese ergibt, ist die Tiefe der Verbrennung.

Unser Ziel ist es, Verbrennungen des Grades IIa zu erzeugen. Somit ist die Läsion oberflächlich genug, dass eine Wundheilung durch die teilweise noch intakte Dermis überhaupt stattfinden kann, zugleich aber tief genug, sodass der Versuch klinische Relevanz hat.

Trotz des standardisierten Verfahrens der Erzeugung der Verbrennungswunden des Grades IIa ist fraglich, ob dies tatsächlich bei allen Präparaten erreicht wird. So könnte teilweise nur die Epidermis betroffen sein (Abb. 57). Folglich handelt es sich um Verbrennungen I. Grades, bei der die Gefäße, die ohnehin nicht in der betroffenen Schicht vorhanden sind, gar keinen Schaden tragen. Selbst beim Vergleich von Schnitten ein und derselben Stanze wirkt es teilweise so, als handle es sich um eine Verbrennung des Grades IIa, in anderen Schnitten wiederum um eine Verbrennung ersten Grades (Vergleiche Abb. 57 & 58). Hinzu kommt, dass teilweise schwer zu beurteilen ist, ob eine Läsion im Gewebe durch Zerreißen beim Färben oder durch die Verbrennung zustande kommt (Abb. 58 & 59).

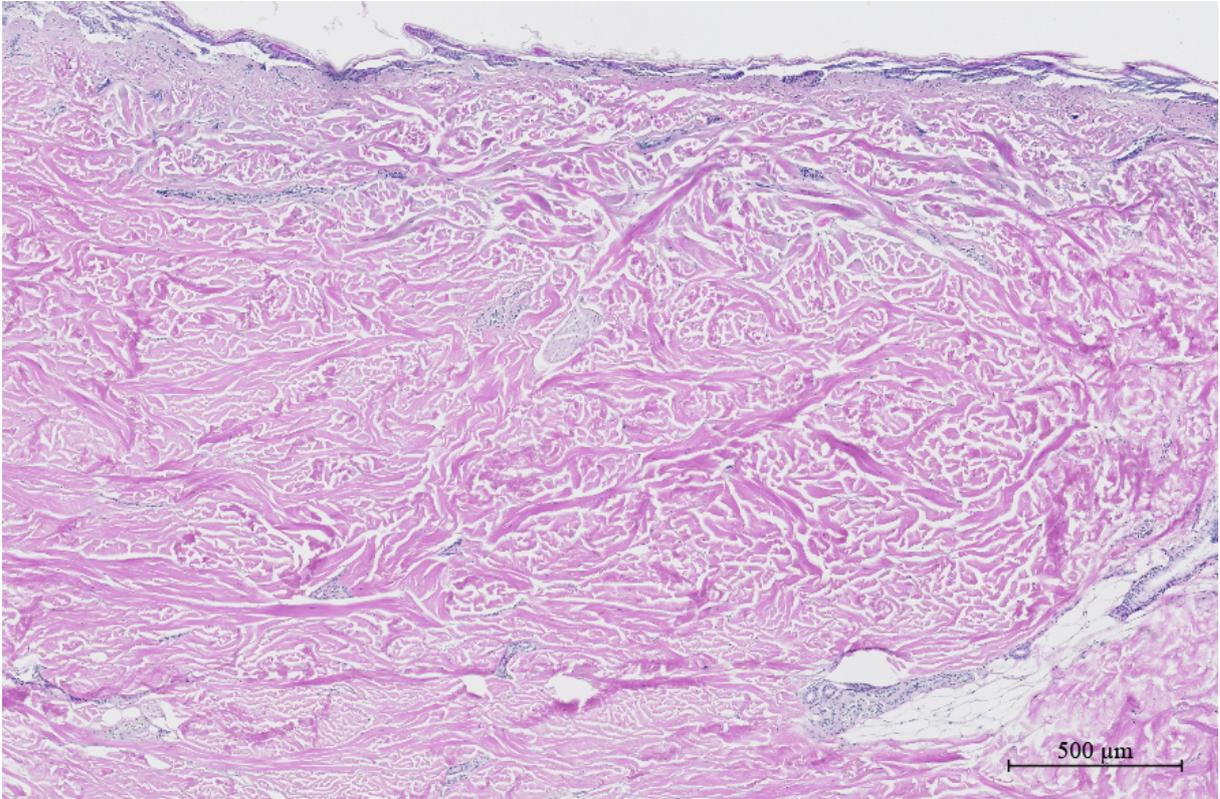


Abb. 57: Verbrennung, die augenscheinlich nur die Epidermis betrifft

Abb. 57: Zu sehen ist der Schnitt, bei dem die Läsion nur auf die Epidermis beschränkt zu sein scheint. Es handelt sich dabei um mit 1 μg/mL GDF-5 behandelte Haut des Spenders A nach 6 Stunden. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441 μm x 0,441 μm

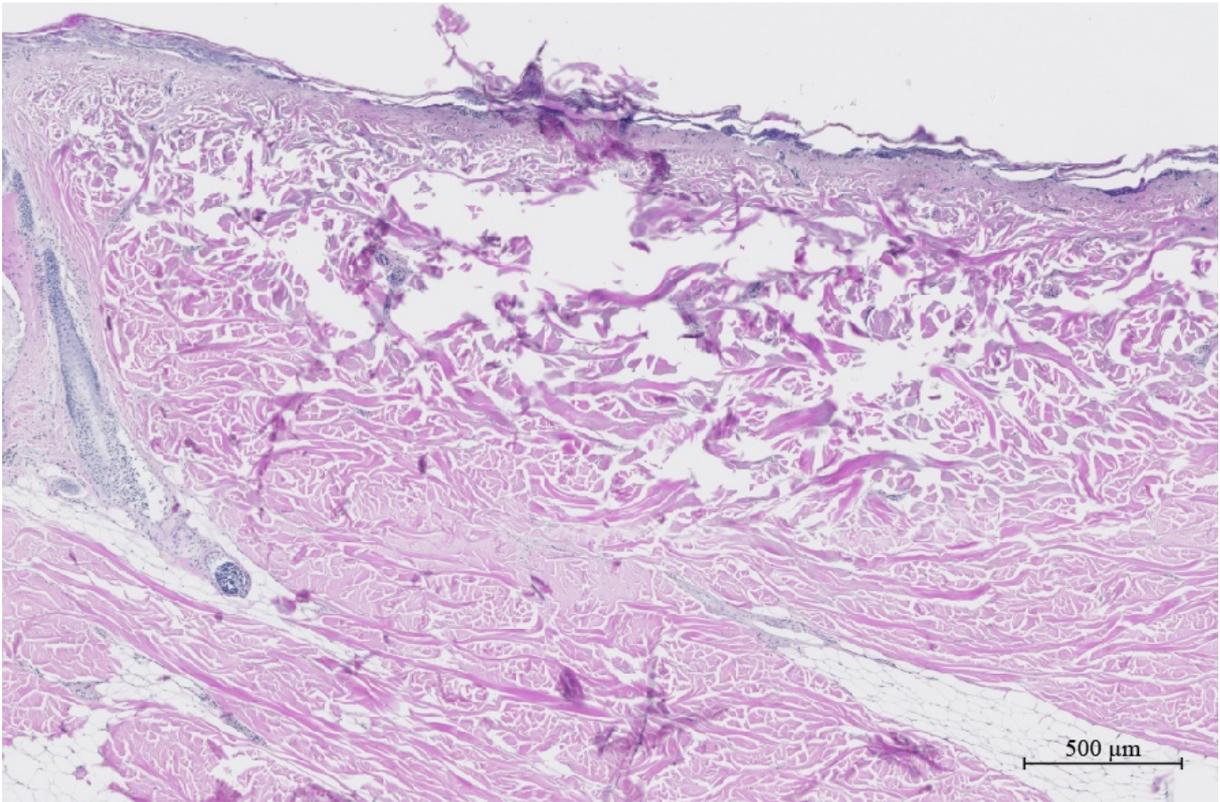


Abb. 58: Verbrennung, die augenscheinlich die Epidermis sowie die Dermis betrifft

Abb. 58: Zu sehen ist der Schnitt, bei dem die Läsion bis in die Dermis zu reichen scheint. Es handelt sich dabei um mit 1µg/mL GDF-5 behandelte Haut des Spenders A nach 6 Stunden. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

Die Analyse der Anzahl der Gefäße ergibt zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$ signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen für die Zeitpunkte 6 Stunden, 6 Tage und 9 Tage. Auch hier liegen die Unterschiede 6 Stunden nach Verbrennung zwischen der Behandlung mit 1µg/mL GDF-5, 5µg/mL GDF-5 sowie ohne GDF-5 und der Kontrolle vor. Die Anzahl der Gefäße der Kontrolle ist kleiner als die der verbrannten Haut, die mit 1µg/mL GDF-5, mit 5µg/mL GDF-5 und ohne GDF-5 behandelt wurden. Somit scheinen sich nach 6 Stunden mehr Gefäße in der Haut, die verbrannt wurde zu befinden als in der Kontrolle. Dies steht im Einklang zu den Ergebnissen der Flächenbestimmung der Gefäße. Zudem findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit 5µg/mL und 1µg/mL GDF-5, wobei 1µg/mL zu einer höheren Anzahl von Gefäßen zu führen scheint.

Nach 6 Tagen sind die Unterschiede in gleicher Weise statistisch signifikant. Auch hier zeigt ein Blick auf die Mittelwerte, dass die Anzahl der Gefäße der Kontrolle kleiner ist als die der Behandlung mit 1µg/mL GDF-5, der Behandlung mit 5µg/mL GDF-5 sowie der reinen Verbrennung ohne GDF-5 Zugabe.

Auch dies entspricht dem Ergebnis der Flächenauswertung von CD-31.

Zum Zeitpunkt von 9 Tagen ist nach Korrektur der *Family Wise Error Rate* lediglich ein statistisch signifikanter Unterschied zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zwischen der Kontrolle und der Verbrennung ohne Zugabe von GDF-5 zu erkennen. Der Mittelwert und somit die Anzahl der Gefäße ist also in der verbrannten Haut ohne GDF-5 höher als in der Kontrolle.

Betrachtet man den Mittelwert für jeden Zeitpunkt (siehe „**Ergebnisse**“), so ist bei keiner Behandlung ein kontinuierlicher Verlauf ersichtlich. Die Anzahl und Fläche der Gefäße scheinen im Verlauf der Zeit nicht immer übereinzustimmen. Betrachtet man beispielsweise die verbrannte Haut, die nicht mit GDF-5 behandelt wurde in Bezug auf Anzahl und Fläche, so findet man den niedrigsten Mittelwert der Anzahl der Gefäße in der mit 5µg/mL GDF-5 behandelten Haut nach 9 Tagen, bei der Flächenbestimmung allerdings nicht. Dies visualisiert das zuvor beschriebene Problem der Evaluation der Angiogenese mittels Flächenbestimmung.

Zusammenfassend sind unsere Ergebnisse hinweisend, dass in der verbrannten Haut gegenüber den nicht verbrannten Kontrollen Angiogenese stattgefunden zu haben scheint. Vorausgehende Forschungsergebnisse legen einen fördernden Effekt von GDF-5 auf die Angiogenese nahe [179]. Man hätte somit erwartet, dass sowohl die Anzahl als auch die Fläche der markierten Gefäße in den mit GDF-5 behandelten Stanzen höher sind als in den Verbrennungen, die nicht mit GDF-5 behandelt wurden.

Der Prozess der Angiogenese ist ein komplexes Unterfangen, welches vielen Einflussfaktoren unterliegt. Es scheint, als spiele das Immunsystem eine wesentliche Rolle, da durch die Einwanderung von Leukozyten unmittelbar nach Trauma Mediatoren ausgeschüttet werden, die diese induzieren [30]. Ebenso scheinen auch neutrophile Granulozyten eine Quelle proangiogener Faktoren zu sein [30, 237, 238].

Neben metabolischen Triggern der Angiogenese, wird diese auch durch mechanische Faktoren stimuliert. Demnach scheint sie durch den Blutfluss selbst angeregt zu werden [36, 55, 239].

Blutfluss und Blutdruck tragen zur Entstehung von Scherkräften bei [36], die sowohl zur Lumenvergrößerung als auch zur Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen führen [29]. Die Scherkräfte werden dabei von der extrazellulären Matrix, Zelladhäsionskomplexen, Membranbestandteilen und den zytoskeletalen Filamenten registriert [240]. Auch epitheliale Natriumkanäle scheinen als Mechano-sensoren zu fungieren und die Angiogenese zu stimulieren [239, 241].

In unserem Versuchsaufbau ist das Gefäßsystem unserer Stanzen nicht durchflossen und somit wirken keine der genannten mechanischen Faktoren. Leukozyten können zudem aus diesem Grund nicht aus dem Blut einwandern. Es ist also möglich, dass die Angiogenese gar nicht initiiert wird und unsere Ergebnisse in diesem Zusammenhang eher zufällig entstanden sind. Dies würde erklären, warum die Verwendung von GDF-5 keinen eindeutigen Vorteil bringt.

5.1.2 Involucrin

Ein weiterer wichtiger Schritt der Wundheilung stellt neben der Angiogenese die Reepithelialisierung dar, wodurch der Hautmantel wieder verschlossen werden kann. Der Prozess beginnt bereits einige Stunden nach Wundentstehung [14]. Zur Darstellung der Reepithelialisierung verwenden wir ein Protein, das in der verhornten Hülle differenzierter Keratinozyten zu finden ist und daher als deren Differenzierungsmarker dient: Involucrin [198, 199, 212].

Bei den Ergebnissen der Antikörperfärbungen mit Involucrin ist in der *Posthoc*-Analyse kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen zu erkennen. Auch bei Betrachtung des

zeitlichen Verlaufs ist hier keine klare Tendenz zu sehen. Wie bei der CD-31-Antikörperfärbung undulieren die Werte im zeitlichen Verlauf (siehe „**Ergebnisse**“) auch hier.

In anderen Experimenten konnten Hinweise gefunden werden, dass die Verwendung von GDF-5 zur Proliferation der Epidermis beiträgt [77, 193]. Da die Zellen der Epidermis zu 90-95% Keratinozyten sind [8], hätte man erwartet, dass der Anteil an gefärbten Flächen im Präparat bei der mit GDF-5 behandelten Haut deutlich höher ausfällt als ohne Behandlung. Dies kann nicht bestätigt werden. Stattdessen zeigen sich keine Unterschiede zwischen behandelter, nicht behandelter und nicht verbrannter Haut.

Wie bei der qualitativen Auswertung dieses Antikörpers bereits erwähnt, kann man bei dieser Antikörperfärbung im Mikroskop beobachten, dass viele Präparate keine oder nur eine sehr blasse Färbung enthalten (Abb. 42). Es lässt sich vermuten, dass eine fehlerhafte Färbung Ursache hierfür ist. Dies könnte die nicht zufriedenstellenden Ergebnisse der statistischen Auswertung der Färbung erklären.

Zudem ist die Epidermis in einigen Präparaten komplett abgerissen (Abb. 61 und 62).

5.1.3 KI-67

Als Marker für die Proliferation nutzen wir KI-67. Aufgrund der Darstellung der Zelldynamik kann dieser Marker gut für die Evaluation der Wundheilung verwendet werden [15, 16]. Er wird von Stammzellen und Zellen, die den Zellzyklus durchlaufen haben, im Stratum basale präsentiert [8, 13, 14]. Des Weiteren befinden sich proliferierende Keratinozyten-Stammzellen in der äußeren epithelialen Wurzelscheide der Haare [13].

Bei den KI-67-Antikörperfärbungen zeigen sich lediglich signifikante Unterschiede nach 12 Tagen zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zwischen der Behandlung mit $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und ohne GDF-5-Behandlung, zwischen $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und ohne GDF-5-Behandlung sowie zwischen der reinen Verbrennung ohne GDF-5 und der Kontrolle. Bei Betrachtung der Mittelwerte stellt man fest, dass dieser für die Stenzen, die nicht mit GDF-5 behandelt werden, gegenüber der mit $5\mu\text{g/mL}$ GDF-5 und $1\mu\text{g/mL}$ GDF-5 sowie der Kontrolle höher ist. Es scheint also, als fände mehr Proliferation in der Epidermis der nicht mit GDF-5 behandelten aber verbrannten Haut statt. Die Wundheilung scheint somit auch in diesem Aspekt keineswegs von einer Behandlung mit GDF-5 zu profitieren, im Gegenteil, er scheint eher schädlich auf sie zu wirken. Wie bereits bei den anderen Antikörperfärbungen festgestellt, kann im zeitlichen Verlauf (siehe „**Ergebnisse**“) keine Kontinuität erkannt werden. In anderen Versuchen wurde allerdings auch beschrieben, dass ein Anstieg der Proliferation in den ersten Tagen nicht festzustellen ist, sondern erst danach einsetzt und am 20. Tag seinen Höhepunkt erreicht [242]. Daher ist es denkbar, dass die Beobachtungsdauer unseres Versuches zu kurz gewählt ist.

Der Nutzen des Proliferationsmarker KI-67 in thermischen Verletzungen wurde in der Literatur mehrfach beschrieben [201, 242-244].

Ein alternatives Auswertungsverfahren der KI-67 Antikörperfärbung ist die Ermittlung der gefärbten Zellkerne pro Gesamtzahl der Zellen [245]. In histologischen Schnitten verbrannter Haut ist dies allerdings kaum realisierbar, da die Darstellung einzelner Zellen nicht mehr möglich und daher die Gesamtzahl der Zellkerne nicht zu zählen ist [201].

Wie bereits beschrieben, kam es darüber hinaus regelhaft zu falsch positiv gefärbten Bereichen im Zentrum der Verbrennung (Abb. 37 **Methodik**). Entsprechend des in „**Methodik**“ beschriebenen Verfahrens, exkludieren wir diese Bereiche, in dem wir sie mit Fiji einzeichnen und so von der Analyse ausschließen (Abb. 13 in **Methodik**). Diese Markierung der Bereiche verläuft nach Augenmaß und birgt somit auch hier eine mögliche Fehlerquelle.

5.1.4 α -SMA

Die in der Proliferationsphase gebildete primäre extrazelluläre Matrix wird vor allem aus Myofibroblasten und Fibroblasten gebildet [18, 21, 246]. Myofibroblasten sind gekennzeichnet durch die Präsentation von *Alpha-Smooth muscle actin* (α -SMA) [22, 23]. Durch sie wird der Wundverschluss ermöglicht, weshalb sie einen essentiellen Bestandteil der Wundheilung darstellen [22, 23, 66]. Wir nutzen den Faktor α -SMA als Differenzierungsmarker kontraktiler Myofibroblasten [64].

Nach Korrektur des FWE ist in der *Posthoc*-Analyse der α -SMA-Antikörperfärbungen lediglich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der mit 5 μ g/mL GDF-5 behandelten Haut und der ohne GDF-5 behandelten Haut nach 6 Stunden feststellbar. Auch hier ist der Mittelwert der ohne GDF-5 behandelten Haut gegenüber dem Mittelwert der mit 5 μ g/mL GDF-5 behandelten Haut größer. Somit scheint GDF-5 auch auf den Myofibroblastengehalt eher einen negativen Effekt zu haben.

Die Literatur lässt einen stimulierenden Effekt von GDF-5 auf Fibroblasten vermuten [173, 186], der in unserem Experiment somit nicht nachgewiesen werden kann.

Wie bereits erwähnt, ist die isolierte Betrachtung der Myofibroblasten mit diesem Marker allerdings nicht möglich. Es spielen auch immer der Gehalt der Gefäße und Myoepithelzellen mit ein [14, 22, 23, 247]. Zudem exprimieren auch die *Mm. arrectores pilorum* α -SMA [197].

Ob der negative Zusammenhang der gefärbten Bereiche mit der GDF-5-Behandlung also wirklich einem niedrigeren Gehalt an Myofibroblasten gegenüber der ohne GDF-5 behandelten Präparate bedeutet, lässt sich daher sehr schwer einschätzen.

Auch erkennt man im zeitlichen Verlauf (siehe „**Ergebnisse**“) keine klare Tendenz. Der Literatur zufolge hätte man ein Maximum des Gehalts an Myofibroblasten und somit einen maximalen Wert der mit α -SMA gefärbten Flächen nach etwa zwei Wochen bzw. in unserem Experiment 12 Tagen, erwartet [248].

Mechanischer Stress fördert zudem die Vermehrung und den Fortbestand von Myofibroblasten die α -SMA präsentieren [61, 65, 68-70]. Wie bereits im Zusammenhang mit Angiogenese beschrieben, könnte der statische Aufbau unseres Experimentes und somit das Fehlen mechanischer Reize eine mögliche Ursache für die fehlenden signifikanten Ergebnisse sein.

5.1.5 Zusammenfassung

Zusammengefasst scheint der Faktor GDF-5 in den von uns getesteten Konzentrationen weder auf die Fläche noch auf die Anzahl der Gefäße, die Proliferation und die Keratinozyten- sowie Fibroblastendifferenzierung einen positiven Effekt zu haben. Eher noch scheint er diese Parameter und dadurch die Wundheilung negativ zu beeinflussen.

Dennoch ist die hier etablierte Methodik zur Evaluation der Wundheilung und Beobachtung der Verbrennungswunden im Verlauf möglicherweise geglückt. So können in vielen Fällen unabhängig von der Behandlung ein signifikanter Unterschied zwischen der verbrannten Haut und der Kontrolle nachgewiesen werden. Auch beim Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Zeitpunkte (siehe „**Ergebnisse**“) einer Behandlung zeigen sich signifikante Unterschiede. So lässt sich davon ausgehen, dass die Vitalerhaltung des Gewebes geglückt ist.

5.2 Das Phänomen des Nachbrennens

Aussagen über den von uns erhofften Effekt des Faktors auf das Phänomen des Nachbrennens können mittels der von uns gewählten Auswertungsmethode nicht getroffen werden. Es kann bei Betrachtung der Mittelwerte im zeitlichen Verlauf keine klare Verminderung der Parameter und folglich keine Vertiefung der Verbrennungswunde beobachtet werden.

In der Literatur schwanken Angaben über die Zeitspanne dieses Effekts zwischen wenigen Minuten [249], 48 Stunden [250], 72 Stunden [251] bis hin zu mehreren Tagen [2, 252, 253]. Ein pharmakologisches Mittel zur Verhinderung der Progression des Verbrennungsgrades sollte dabei möglichst frühzeitig nach Verbrennung angewendet werden [196], was in unserem Projekt ermöglicht wird.

Der Effekt des Nachbrennens scheint außerdem erst ab einer bestimmten Verbrennungstiefe stattzufinden [250, 251, 254]. Ist sie nur gering, scheint die Tiefe zu stagnieren, reicht sie hingegen bis tief in die Dermis, so scheint das Phänomen stattzufinden [250, 251, 254]. Wie zuvor geschildert, sind unsere Verbrennungswunden vermutlich vom Grad IIa, jedoch zeigt sich dies nicht kontinuierlich. Somit ist es also möglich, dass sie zu oberflächlich sind und somit kein Nachbrennen stattfindet. Zudem wird auch beschrieben, dass selbst im standardisierten Verbrennungsmodell Vermischungen im Grad der Verbrennung nicht vermeidbar sind [197, 255].

Darüber hinaus ist die von uns verwendete Methode eher zur Evaluation der Wundheilung als zur Beobachtung des Effekts des Nachbrennens geeignet, da die Parameter in der gewählten Auswertungsweise keine direkte Auskunft über die Tiefe der Verbrennung geben [236].

In der Literatur wurde von anderen Autoren vorgeschlagen, man könne diese mithilfe immunhistochemischer Färbungen unter Verwendung des Markers Antivimentin [253] oder mithilfe der Visualisierung von Kollagen IV in Haarfollikeln [256] ermitteln. Darüber hinaus kann durch geschultes Auge auch aus simplen histologischen Färbungen die Tiefe bestimmt werden [242, 254, 257, 258]. Dies ist aber sowohl extrem zeitintensiv als auch sehr subjektiv je nach Betrachter [257]. Auch mit den von uns gewählten Antikörperfärbungen ist theoretisch eine Überprüfung der Verbrennungstiefe möglich. Hier wurde in der Literatur allerdings eine andere Herangehensweise beschrieben. So wurden KI-67 positive Zellkerne

in den Haarfollikeln gezählt, um deren Vitalität zu ermitteln [201]. Anhand dessen kann die Tiefe der Verbrennung gemessen werden. Zwar ist in der Literatur ebenfalls ein Zusammenhang mit dem α - SMA-Gehalt und der Tiefe der Verbrennung beschrieben, dennoch scheint diese nach unserem Recherche- und Wissensstand daran nicht direkt ablesbar zu sein [197].

5.3 Beurteilung der Einbettungs- und Auswertungsmethodik

In unserem Versuchsaufbau entscheiden wir uns für die Verwendung von Paraffin- anstatt Kryoschnitten. Für die Einbettung in Paraffin muss man vorher in Formalin fixieren und das Gewebe wird im Prozess erhitzt. Aus der Literatur geht hervor, dass diese Behandlung zu einem Verlust der Antigenität und somit der Qualität der Färbung führen kann [259].

Zudem scheint die von uns verwendete Methode der Antigendemaskierung mittels Erhitzen im Citratpuffer gegenüber anderen Verfahren unterlegen zu sein [259].

Aufgrund der hohen Anzahl an Präparaten entscheiden wir uns für eine computergestützte quantitative Auswertung. Bei der Analyse immunhistochemischer Färbungen gibt es keinen allgemein akzeptierten Standard [260].

Die im Folgenden beschriebenen Methoden umfassen die manuelle quantitative Analyse ausgewählter Bereiche oder des gesamten Präparates, die qualitative und die semiquantitative Analyse mithilfe eines erstellten Scores.

In anderen Zusammenhängen wurde beschrieben, dass die quantitative Analyse einzelner mikroskopischer Felder repräsentativ für das gesamte Präparat sei [261].

Weit verbreitet ist die qualitative Auswertung immunhistochemischer Färbungen [260]. Hier wird eine Art nicht numerischer Score erstellt und die Präparate mit „-“ für negativ und „+“ für positiv bewertet [260]. Alternativ ist auch eine Abstufung von „-“ bis „+++“ möglich [260, 262-265]. Eine Umwandlung dieses Scores in Zahlen bedeutet eine semiquantitative Auswertung, wodurch die statistische Analyse ermöglicht wird [266].

Ein Score könnte beispielsweise von 0 bis 4 erstellt werden, wobei 4 die größte Dichte markierter Bereiche aufweist [267-269]. In der Literatur sind verschiedene Varianten dieses Score-Systems beschrieben [270]. Die semiquantitative Analyse birgt das Problem, dass bisher nur für 3 Marker ein Goldstandard definiert wurde [260, 271]. Zwar besteht die Möglichkeit einen individuellen Score zu erstellen, jedoch werden die Ergebnisse dann nicht mit anderen Publikationen vergleichbar sein [260, 272]. Zudem kann es zu Inter-Observer Fehlern kommen [272, 273].

Aufgrund des hohen Zeitaufwands der Auszählung positiv gefärbter Bereiche kam die Idee der computergestützten Auswertung immunhistochemischer Färbungen auf. So kann eine hohe Objektivität bei vergleichbar geringem Zeitaufwand erreicht werden [274, 275]. Es kann im Gegenteil zu manuellem Scoring auch für eine große Datenmenge verwendet werden kann [275, 276].

Die von uns gewählte Methode der computergestützten, quantitativen Auswertung bietet neben dem Vorteil der Reproduzierbarkeit eine höhere Sensitivität und genauere Messung der gefärbten Bereiche [277].

Ein Nachteil der computer-gestützten Auswertung ist, dass optimalerweise sehr dünne Schnitte verwendet werden sollten, um möglichst wenig positiv gefärbte Überlappungen zu erhalten [274].

Ein weiteres Problem kann eine unsachgemäße Fixierung oder Antikörperverdünnung darstellen [273]. Es kann zu unspezifischen Signalen kommen [273].

Zudem kann die unsaubere Verarbeitung der Präparate zum Beispiel durch Bildung von Luftblasen zu falsch negativen Ergebnissen führen [273]. Zwar werden unsere Präparate mit größter Sorgfalt gefärbt, jedoch ist bei der immunhistochemischen händischen Färbung sowie zusätzlicher HE- und Masson-Goldner-Färbungen von insgesamt 1590 Schnitten nicht zu vermeiden, dass dennoch einige Schnitte zerrissen, überlappend oder von Luftblasen bedeckt sind (Abb. 59 und 60).

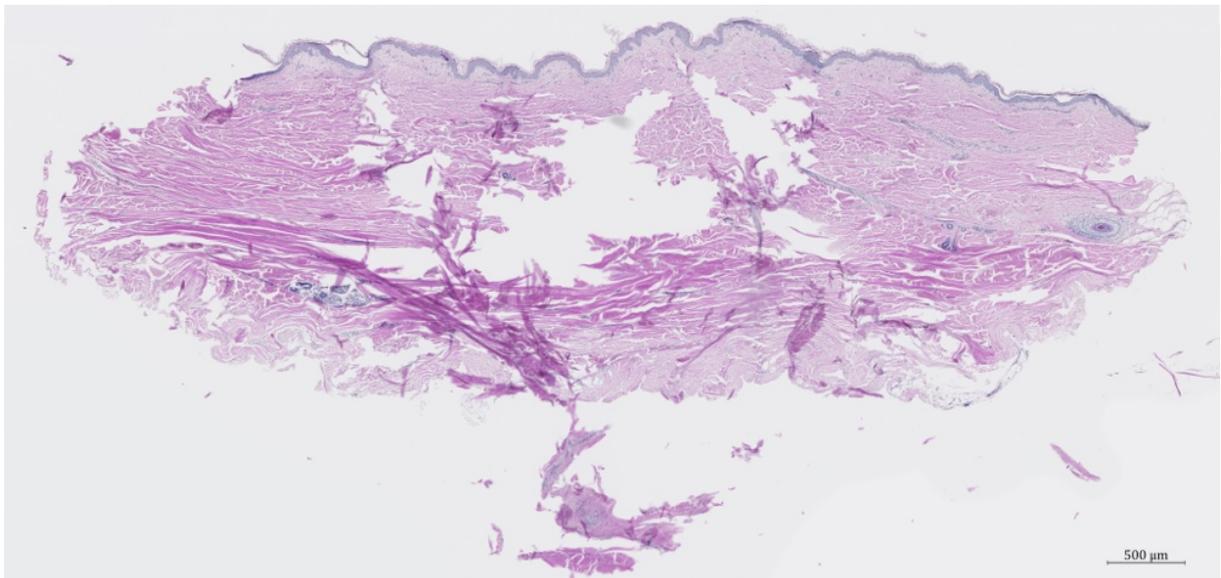


Abb. 59: **Eingerissenes Präparat**

Abb 59: Zu sehen ist das zerrissene Präparat der mit 5 μg/mL GDF-5 behandelten Haut 24 Stunden nach Verbrennung in der HE-Färbung. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441 μm x 0,441 μm

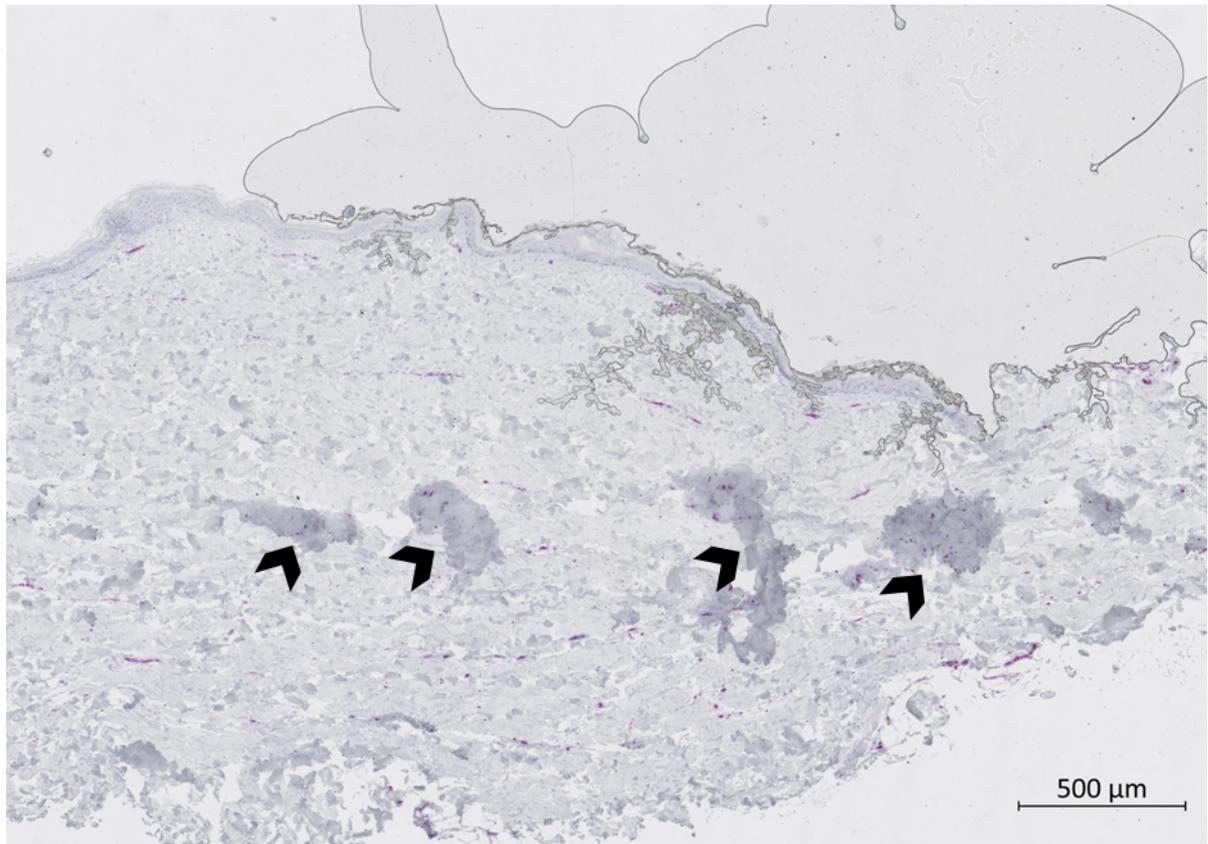


Abb. 60: Beispiel eines Präparates mit Luftblasen und Überlappungen

Abb. 60: In diesem Schnitt ist eine Luftblase sowie die durch Pfeile dargestellten Überlappungen verschiedener Strukturen zu sehen. Es handelt sich hierbei um die Kontrolle des Spenders B nach 11 Tagen der CD-31-Antikörperfärbung. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441μm x 0,441μm

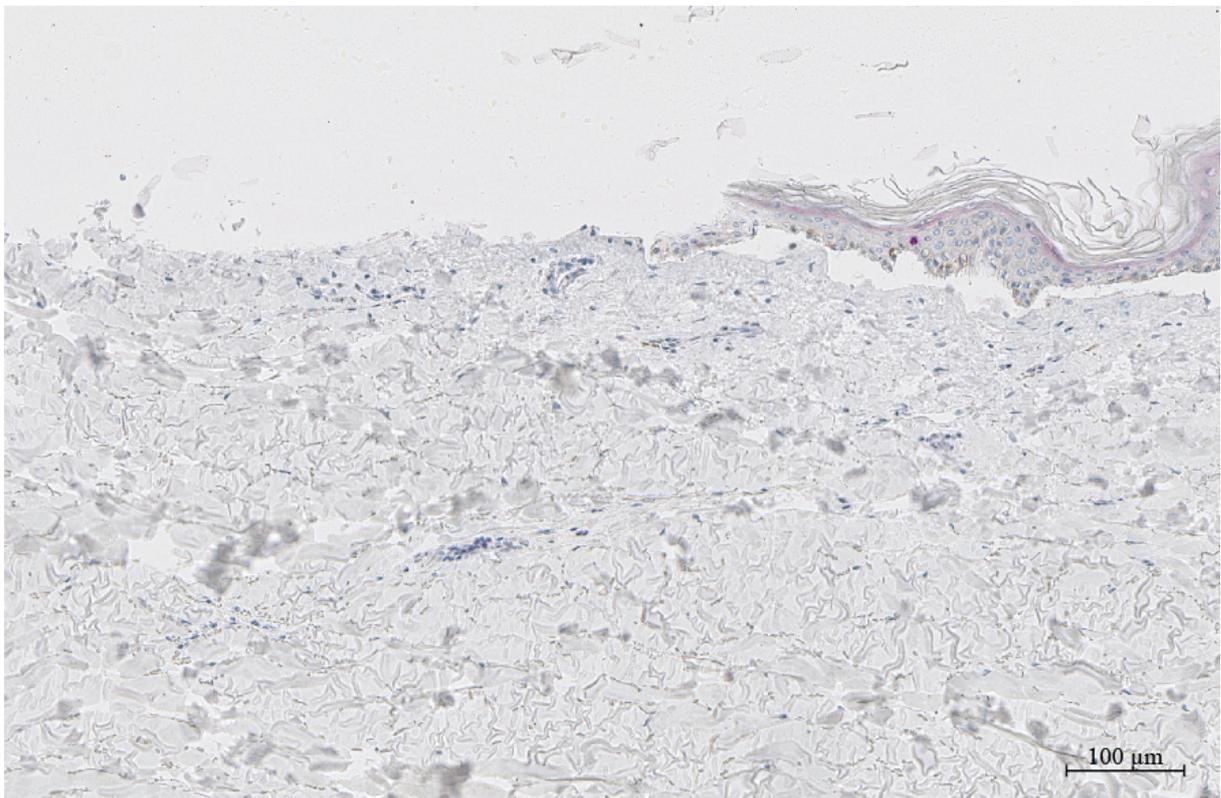


Abb. 61: Beispiel eines Präparates mit eingerissener Epidermis

Abb. 61: Zu sehen ist ein Schnitt, in dem die Epidermis im linken Bildrand abgerissen ist. Es handelt sich hierbei um die Kontrolle des Spenders C nach 6 Tagen in der KI-67-Antikörperfärbung. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

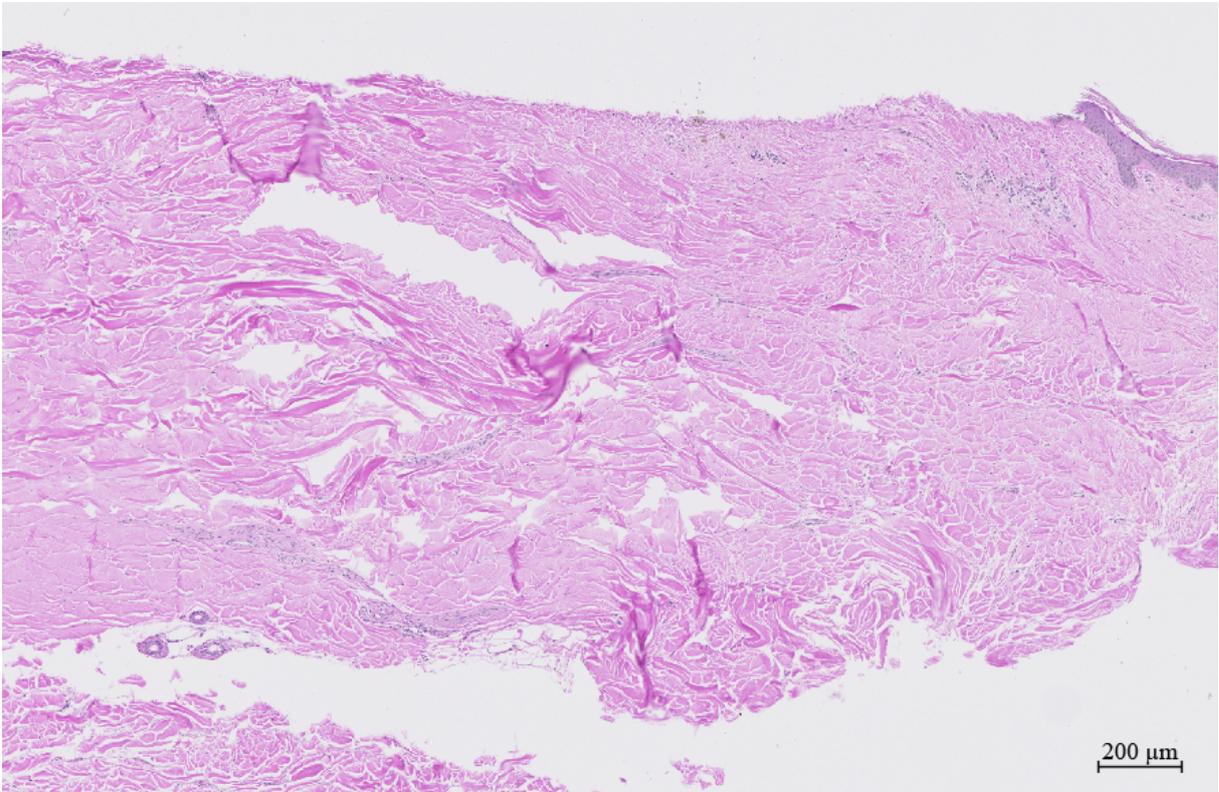


Abb. 62: **Beispiel eines Präparates, bei dem die Epidermis fast komplett fehlt**

Abb. 62: Zu sehen ist der Schnitt, in dem die Epidermis nur noch im rechten Bildrand vorhanden ist. Es handelt sich hierbei um die Kontrolle des Spenders C nach 6 Stunden der unbehandelten, aber verbrannten Haut in der HE-Färbung. Objektiv: Plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Pixelauflösung: 0,441µm x 0,441µm

5.4 Limitationen

Auf Rat des Instituts für Pathologie des Uniklinikums Düsseldorf erzeugen wir für jede Färbereinheit Positivkontrollen unter Verwendung von Tonsillengewebe.

Dadurch können wir sicherstellen, dass der Färbeprozess korrekt abläuft, auch wenn nur wenige Bereiche in unseren Präparaten gefärbt erscheinen.

Beim Gebrauch immunohistochemischer Färbungen ist es darüber hinaus üblich, eine Negativkontrolle in Form einer Probe, die nur mit dem Sekundär-, nicht aber mit dem Primärantikörper behandelt wurde, zu erstellen [278, 279]. Somit lässt sich sicher gehen, dass der Sekundärantikörper keine unspezifischen Bindungen unabhängig vom Primärantikörper verursacht, was die Ergebnisse verfälschen könnte.

In unseren Färbungen haben wir keine Negativkontrolle mit dem Sekundärantikörper erzeugt. Es lässt sich somit also nicht gänzlich ausschließen, dass unsere Färbungen unspezifisch sind.

Bei Betrachtung der Präparate sieht man allerdings, dass größtenteils nur die Strukturen markiert sind, an die der Primärantikörper bindet. Somit könnten die Färbungen dennoch spezifisch sein.

Ein weiteres Problem kann die variierende Größe der zu ermittelnden Strukturen darstellen. Dies wurde für nukleäre Färbungen beschrieben [273]. Zwei oder mehrere Zellkerne könnten so nicht separat sondern als ein Zellkern gezählt werden [273]. Dieses Problem könnte auch bei der Berechnung der Anzahl der mit CD-31 gefärbten Gefäße passiert sein und somit zu einer geringeren Zahl geführt haben.

Auf der anderen Seite ist es bei dem Computer-basierten Auswertungsverfahren auch möglich, dass ein großes Gefäß für mehrere kleine gehalten wird [280].

Zwar werden die Fixierung und die durchgeführten Färbungen der Präparate in unserem Versuch standardisiert durchgeführt, es mangelt aber an einem Kontrollstandard, der als Proben Referenz zur Normalisierung genutzt wird [276].

Zudem besteht bei Versuchen wie hier auch immer das Risiko von Färbefehlern, Färbung von Hintergrundstrukturen und andere Färbefehlern, die fälschlicherweise als die gesuchte Struktur erkannt werden [280]. Somit können bei der Zählung gefärbter Bereiche Fehler auftreten durch eine nicht homogene Färbung oder durch die Gegenfärbung des Hintergrundes [260, 281].

Auch bei der von uns gewählten Methode der Auswertung mit dem Programm Fiji ist es möglich, dass überlappende Bereiche oder starke Hintergrundfärbung mit Hämalaun von der Auswertung ausgeschlossen wurden und der ermittelte Bereich somit kleiner ist als in Wirklichkeit.

In diesem Zusammenhang könnten eine unterschiedliche Dicke der Präparate und damit Unterschiede in der Intensität der Färbungen auch eine Rolle spielen [282, 283]. Zwar wurden immer die gleichen Einstellungen am Mikrotom vorgenommen, wir konnten aber beobachten, dass das Gewebe dazu neigt, sich je nach Temperatur zusammenzuziehen oder auszudehnen und somit könnte die Dicke der Schnitte variieren.

Es wird versucht, den Bias der quantitativen Auswertung möglichst gering zu halten, durch Verwendung identischer Einstellung, sowohl beim Scannen der Präparate als auch beim Auswerten mit Fiji. Somit haben alle analysierten Bilder die gleiche Helligkeit, Auflösung und Kontrast.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Epidermis in den Präparaten teilweise fehlt. Dies ist unter anderem dadurch zu erklären, dass wir beobachten können, dass sich die Stenzen auf der Seite der Epidermis bei Fixierung wölben und die Fläche der Epidermis somit verkleinert wird.

Die Präparate und dabei insbesondere die Epidermis, denen ein thermischer Schaden zugefügt wird, sind zudem häufiger zerrissen. Da weniger Epidermis pro Gesamtfläche existiert, können als logische Schlussfolgerung auch weniger Proliferation in den KI-67 Färbungen bzw. weniger angefärbte Keratinozyten in den Involucrin-Färbungen pro Gesamtfläche ausgerechnet werden. Die Ergebnisse dieser Färbungen könnten dadurch verfälscht sein. Im Fall der KI-67-Antikörperfärbung wäre das Problem zu umgehen, indem man, wie oben bereits beschrieben, die gefärbten Zellkerne der Epidermis pro Gesamtzahl der Zellkerne in der Epidermis misst [245].

Die Subkutis wird unter makroskopischer Beurteilung gelöst, es ist also denkbar, dass teilweise auch Teile der Dermis abgetragen werden, was die errechnete gefärbte Fläche pro Gesamtfläche verfälschen könnte.

Des Weiteren kann man beim Schneiden mit dem Mikrotom nicht genau sagen, an welcher Stelle des Präparates man sich befindet. Es wird zwar immer nur der mittlere Teil der Stanzen verwendet, der die Verbrennung enthält, aber ob man sich genau im Zentrum der Verbrennung oder eher am Rand befindet, ist makroskopisch nicht sicher zu bestimmen. Dies verändert offensichtlich auch den Anteil der visualisierten Strukturen. Wir versuchen dieses Problem zu umgehen, indem wir anstreben, immer mindestens drei Schnitte pro Stanze zu verwenden, allerdings kann dieser Fehler vermutlich dennoch nicht gänzlich behoben werden.

In unserem Versuch wird insgesamt Haut von drei Spendern verwendet. In der Auswertung werden nur für wenige Zeitpunkte und Färbungen signifikante Unterschiede gefunden. Im Allgemeinen kann dies darauf zurück zu führen sein, dass tatsächlich keine signifikanten Unterschiede vorliegen oder aber die Fallzahl zu gering ist, um diese zu erkennen [284]. Ein Hinweis auf einen zu kleinen Stichprobenumfang liefern auch die mit Matlab erstellten *Boxplot*-Diagramme. Es findet sich häufig die „*Inside-Out*“-Konfiguration (Abb. 43 in „**Ergebnisse**“), welche bei kleinem Stichprobenumfang entsteht [11].

Unsere Methodik arbeitet mit vital erhaltener, ausgestanzter Haut. Die darin befindlichen Gefäße sind nicht durchflossen und haben keinerlei Anschluss an einen Blutkreislauf. Dieser Umstand kann zu mehreren Problemen führen. Faktoren aus der Blutzirkulation und inflammatorische Antworten fehlen gänzlich [230].

Bereits die Initialisierung der Wundheilung beginnt mit dem Austritt von Blutbestandteilen und Plasma [19]. Zum physiologischen Ablauf benötigt es aus dem Blut stammende Zellen, wie Entzündungszellen und Thrombozyten [14, 18, 20]. Diese Zellen sind zudem die Quelle der für die Wundheilung erforderlichen Wachstumsfaktoren [84, 87, 89-91, 285].

In unserem Versuchsaufbau kann die Wundheilung allenfalls durch lokale Zellen realisiert werden.

Darüber hinaus akkumulieren negative Faktoren aufgrund des fehlenden Abflusses [77].

Hayashi et al. beschrieben ähnliche Probleme bei ihrem *ex vivo* Versuch mit GDF-5 [286]. Hier wurde der Effekt von GDF-5 in Bezug auf die Wundheilung von Sehnen in einer Zellkultur erforscht [286]. Die Autoren mutmaßten, dass die fehlende Blutversorgung erst die isolierte Beurteilung des Effekts von GDF-5 erlaubt. In diesem Experiment fand die Wundheilung nicht in den physiologischen Phasen statt. Es ist also auch bei uns denkbar, dass zwar eine Wundheilung stattfindet, diese aber von dem normalen Ablauf einer Wundheilung *in vivo* abweicht.

Selbst unter der Annahme eines positiven Effektes von GDF-5 auf die Wundheilung, stellt sich die Frage einer adäquaten Narbenbildung auch unter ästhetischen Gesichtspunkten.

Da Myofibroblasten in der physiologischen Wundheilung nach Erfüllung ihrer Aufgabe der Wundkontraktion zugrunde gehen und es Hinweise gibt, dass Dysregulation dieses Prozesses Fibrose und hypertrophe Narben bedingt [62-64, 66], besteht die Frage, ob GDF-5 zu einer nicht zufriedenstellenden Narbenbildung führt.

Ein weiterer Kritikpunkt unseres Modells ist, dass wir eine inadäquate Dosierung von GDF-5 verwendet haben könnten.

In vergleichbaren Experimenten, die den Effekt von Wachstumsfaktoren auf die Heilung von Verbrennungswunden untersuchten, zeigte sich ein besseres Resultat bei niedrigen anstatt höher gewählten Konzentrationen des Wachstumsfaktors [105]. So scheinen hohe Konzentrationen einen wachstumshemmenden, niedrigere Konzentrationen allerdings einen wachstumsfördernden Effekt zu haben [134].

Ähnliches ist beispielsweise auch für den Faktor BMP-6 beschrieben. Demnach hemmen hohe Konzentrationen die epidermale Proliferation, während niedrige Konzentrationen diese fördern [151, 163]. Auch mit GDF-5 wurde ein ähnlicher Effekt beschrieben [193].

Die von uns gewählten Dosierungen beruhen auf vorausgegangenen Modellen unserer Forschungsgruppe. Es ist nicht auszuschließen, dass die Wahl einer niedrigeren Konzentration, zu einem besseren Ergebnis führen kann.

In unserem Versuchsaufbau bleibt die Frage der Applikationsform von GDF-5 gänzlich ungeklärt.

Als mögliche Applikationswege bzw. Trägersysteme findet man in der Literatur diverse Ansätze. Beschriebene Methoden reichen von lokaler Injektion, über bioresorbierbare Wundauflagen, in GDF-5 getränkte Fäden und Kollagenmatrizen bis hin zum Gentransfer [77, 193, 287-291]. Für andere, mehr erforschte Mitglieder der BMP-Familie wurden darüber hinaus unter anderem Gelatine [292], Chitosan [293], Alginat [294] und Fibrin [295] als Trägersysteme beschrieben. Andere Autoren mutmaßten zudem bereits, dass nur eine lokale Applikation der BMP Familie denkbar ist, da es sonst zur Bildung ektopen Knochengewebes kommen könnte [296]. Im Falle von GDF-5 sind ähnliche Bedenken aufgrund des chondroinduktiven Effekts beschrieben worden [297]. So bildete sich Knorpelgewebe in Sehnen aus, die mit GDF-5 behandelt wurden [289, 297].

Ein Problem mit der Verwendung von BMPs scheint zu sein, dass im Menschen eine sehr hohe Dosis des BMPs benötigt wird, um ähnliche Wirkungen zu entfalten wie in Tierexperimenten [170]. Eine schnelle Ausscheidung, zu kurze Verweildauer im Gewebe und eine zu geringe Zahl ansprechender Zellen könnten mögliche Ursachen sein [170].

Das ideale Trägersystem sollte die kontrollierte und kontinuierliche Gabe bei gleichzeitigem Schutz vor proteolytischem Abbau ermöglichen sowie das Verbleiben des Faktors an der Applikationsstelle ohne systemische Diffusion garantieren [164, 298]. Zumindest in Bezug auf Knochenheilung ist eine gewisse Verweildauer der BMPs förderlicher als ein schnelles Anfluten [164, 294, 298-303]. Daneben sollte das Trägersystem natürlich biokompatibel, abbaubar, nicht toxisch, allergen oder karzinogen sein [298].

Bei anderen Mitgliedern der BMP-Familie konnte beschrieben werden, dass bei direkter Applikation eine sehr hohe Dosis erforderlich ist [164]. Zugrunde liegt die oben bereits beschriebene sehr kurze systemische Halbwertszeit von wenigen Minuten bei schnellem proteolytischem Abbau [298-300, 304], weshalb man sehr hohe Dosen nutzt, um diesen Abbau zu kompensieren [298, 300]. Dies steigert das Risiko möglicher Nebenwirkungen [294, 305]. Deshalb versucht man Trägersysteme zu nutzen, die die lokale Konzentration aufrechterhalten [164, 306].

Keine der derzeit existierenden Trägersysteme wird all diesen Voraussetzungen gerecht [298]. Lediglich Kollagen ist als Träger für BMPs weitläufig akzeptiert [164, 298]. Problematisch ist hier, dass ein Großteil der Wachstumsfaktoren eine zu geringe Affinität an Kollagen besitzt [164, 298].

Da der von uns verwendete Wachstumsfaktor GDF-5 Proliferation bestimmter Zellen und die Angiogenese fördert [173, 179, 186, 187], ist die Vermutung naheliegend, dass dies zur Tumorentstehung beitragen könnte.

In der Literatur ist ein paradoxer Effekt der TGF- β Superfamilie und ihrem Signalweg im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs beschrieben worden [307]. Demnach ist sowohl eine Funktion als Suppressor als auch als Promotor nachgewiesen [308-310]. Wir konnten keine Forschungsarbeit finden, die einen Zusammenhang zwischen der lokalen Applikation von GDF-5 und der Krebsentstehung beschreibt.

Selbst bei den klinisch bereits eingesetzten Faktoren der BMP-Familie sind die Langzeitfolgen noch ungewiss [164]. Dennoch wurde ein Zusammenhang zwischen BMPs und Krebs in der Literatur beschrieben. Insbesondere der klinisch bereits verwendete Faktor BMP-2 wurde hier intensiv erforscht.

So konnte das Auftreten von Mitgliedern der BMP-Familie, deren Überexpression oder deren Rezeptoren in einer Vielzahl an Tumoren nachgewiesen werden, darunter Weichteil- [311] und Knochentumoren [311] sowie Pankreas- [312], Magen- [313] und Prostatakarzinomen [314, 315]. Es konnte einigen Autoren zufolge sogar eine signifikant höhere Inzidenz an Karzinomen bei der Verwendung von BMP-2 nachgewiesen werden [316]. Eine Dosisabhängigkeit ist nicht auszuschließen [317].

Auf der anderen Seite gibt es keine eindeutige Bestätigung für den möglichen kanzerogenen Effekt der Mitglieder dieser Familie [304, 318]. In mehreren Studien konnte man diesen nicht reproduzieren [318-320]. Vielmehr handelt es sich derzeit um Spekulationen [321]. Die beschriebene hohe Konzentration dieser Faktoren in Tumoren könnte darüber hinaus eher einer resultierenden Hochregulierung als dem Beweis für die Induktion von Neoplasien entsprechen [304].

Zudem gibt es Hinweise, dass die Faktoren der BMP-Familie unter bestimmten Bedingungen sogar einen antiproliferativen Effekt aufweisen könnten [322, 323].

Eine andere Sorge ist die mögliche systemische Toxizität, die die lokale Applikation eines BMPs bewirken könnte. Eine Hypothese ist, dass es zu keinen systemischen Nebenwirkungen kommen kann, aufgrund der oben beschriebenen kurzen Halbwertszeit der BMPs [304].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Frage nach Kanzerogenität noch nicht abschließend geklärt ist und weiterer Untersuchung bedarf. Zur endgültigen Beurteilung fehlen darüber hinaus Langzeitstudien [318, 324]. Fraglich ist auch, ob die zeitlich begrenzte lokale Applikation für genau diesen von uns verwendeten Faktor ein mögliches Risiko darstellt. Um adäquate Aussagen über die sorg- und komplikationslose Verwendung des Faktors zur Behandlung von Verbrennungswunden treffen zu können, bedarf es also weiterer Untersuchungen.

5.5 Zusammenfassung und Aussicht

In dieser Arbeit wurde der Effekt des Wachstumsfaktors GDF-5 anhand der wichtigsten Schritte der Wundheilung – Angiogenese, Fibroblastenproliferation und Reepithelialisierung – in Verbrennungswunden untersucht. Dass dieses Mitglied der BMP-Familie die beschriebenen zentralen Vorgänge der Wundheilung positiv beeinflusst, konnte bereits nachgewiesen werden [77, 179, 186, 193]. In dieser

Arbeit wird ein *ex vivo* Modell an humaner Haut etabliert. Hierbei wird die Wundheilung der mit 1µg/mL, 5µg/mL und ohne GDF-5 behandelten Haut sowie nicht verbrannter Haut 6 Stunden, 24 Stunden, 3 Tage, 6 Tage, 9 Tage, 11 Tage und 12 Tage nach thermischem Schaden anhand immunhistochemischer Färbungen analysiert. Einige statistisch signifikante Ergebnisse können bei der Analyse beschrieben werden. So zeigen sich für die Flächenberechnung der CD-31 Antikörperfärbung statistisch signifikante Unterschiede zum Signifikanzniveau von $p < 0,05\%$ nach 6 Stunden und 6 Tagen zwischen der Kontrolle und den Behandlungen mit 1µg/mL und 5µg/mL GDF-5 sowie der reinen Verbrennung. Der Mittelwert und somit die positiv markierte Gefäßfläche der verbrannten Haut ist unabhängig von der Behandlung größer als in der nicht verbrannten Haut, somit scheint Angiogenese als Folge des thermischen Schadens stattgefunden zu haben. Nach 12 Tagen besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Verbrennung ohne GDF-5-Behandlung sowie der Verbrennung, die mit 5µg/mL GDF-5 behandelt wird. Es zeigt sich in der nicht behandelten Haut eine größere Gefäßfläche, demnach scheint GDF-5 keinen positiven Einfluss auf die Angiogenese zu haben. Darüber hinaus zeigt sich in der verbrannten nicht mit GDF-5 sowie der mit 1µg/mL GDF-5 behandelten Haut erneut eine größere Gefäßfläche als in der Kontrolle, sodass auch hier Angiogenese erfolgt ist. Bei der Anzahl der Gefäße zeigen sich nach 6 Stunden mehr Gefäße in der mit 1µg/mL als in der mit 5µg/mL GDF-5 behandelten Haut. Zudem ist ein statistisch signifikanter Unterschied nach 6 Tagen zwischen den Verbrennungen und der Kontrolle zu verzeichnen. Mehr Gefäße existieren unabhängig von der jeweiligen Behandlung in der verbrannten Haut als in der Kontrolle, was die oben genannten Ergebnisse unterstützt. Nach 9 Tagen sind außerdem statistisch signifikant mehr Gefäße in der verbrannten unbehandelten Haut als in der Kontrolle zu finden, was die bisher genannten Ergebnisse ebenfalls bestärkt. Beim Proliferationsmarker KI-67 zeigen sich nach 12 Tagen statistisch signifikant mehr proliferierende Zellen in der verbrannten nicht behandelten Haut gegenüber der mit 1µg/mL und 5µg/mL GDF-5 behandelten sowie der nicht verbrannten Haut. Es zeigt sich eine größere Fläche proliferierender Zellen in der unbehandelten verbrannten Haut als in der verbrannten Haut, die mit 1µg/mL und 5µg/mL GDF-5 behandelt wurde, was einen negativen Einfluss von GDF-5 auf die Proliferation vermuten lässt. Beim Differenzierungsmarker der kontraktilen Myofibroblasten zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede nach 6 Stunden zwischen der mit 5µg/mL GDF-5 behandelten Haut und der nicht behandelten verbrannten Haut, wobei der Myofibroblastengehalt in der nicht behandelten Haut größer erscheint, sodass auch hier ein negativer Einfluss von GDF-5 zu vermuten ist. Bei der Involucrin-Antikörperfärbung zeigen sich nach Behebung der *False Discovery Rate* keine statistisch signifikanten Unterschiede. Das hier beschriebene Experiment ermöglicht die Testung des Wachstumsfaktors GDF-5 auf humaner Haut und umgeht dabei ethische Probleme, da kein Mensch oder Tier zu Schaden kommt. Die Untersuchung der Haut gleicher Körperstellen und ohne Einfluss von systemischen Faktoren ermöglicht eine hohe Reproduzierbarkeit [229, 230]. Auch die Verwendung einer computergestützten Auswertung trägt zur hohen Reproduzierbarkeit und Objektivität bei [272, 273, 275]. Ob die Etablierung des *ex vivo* Modells geglückt ist, lässt sich allerdings anhand unserer Daten nicht sicher beurteilen. Dass in mehreren Proben eine größere Gefäßfläche der verbrannten Haut als in der Kontrolle zu finden ist, lässt vermuten, dass eine

Angiogenese nach thermischer Läsion in diesem Modell stattgefunden hat. Auch die statistisch signifikanten Unterschiede für jede Antikörperfärbung und Behandlung im zeitlichen Verlauf sind ein Indiz, dass eine Wundheilung und Vitalerhaltung ermöglicht wurde. Die stattgehabte Wundheilung weicht allerdings mutmaßlich deutlich von der physiologischen Wundheilung im Lebewesen ab [286]. So fehlt unter anderem ein durchflossenes Gefäßlumen, welches nicht nur als mechanischer Reiz der Angiogenese dient, sondern auch die Diapedese wichtiger Zellen und Austritt von für die Wundheilung relevanter Faktoren ermöglicht [19, 29, 30, 36, 55, 239]. Der Effekt des Faktors GDF-5 ist, unseren Ergebnissen zufolge, nicht förderlich für die Wundheilung. Im Gegenteil scheint er, wenn überhaupt, einen negativen Einfluss zu haben. Die ernüchternden Ergebnisse könnten also auf die Limitationen des Modells zurückzuführen sein. Das Phänomen des Nachbrennens konnte in unserem Modell nicht adäquat beschrieben werden. Ob und wie der Faktor sicher und bedenkenlos appliziert werden kann, geht aus unserem Versuch nicht hervor. Insgesamt scheint unsere Methodik die Fragestellung nicht gänzlich beantworten zu können. Zukünftige Projekte sollten andere Marker wie beispielsweise Antivimentin verwenden, um den Effekt des Nachbrennens adäquat untersuchen zu können [253]. Antikörperfärbungen könnten, anstatt manuell, mit Färbeautomaten durchgeführt werden, um konstantere Färbungen zu erzeugen. Dies könnte helfen, die von uns beobachteten zerrissenen, vertrockneten oder inkorrekt gefärbten Präparate, wie bei der Involucrin-Färbung beobachtet werden kann, in Zukunft zu vermeiden. Aufgrund der fehlenden Negativkontrolle verlieren unsere Ergebnisse an Aussagekraft. Zudem sollte die optimale Applikationsform und Dosierung weiter erforscht werden. Insgesamt lässt unsere Arbeit somit noch viele Fragen offen. Dennoch scheint die Vitalerhaltung des Gewebes geglückt zu sein und zudem Angiogenese als wichtiger Bestandteil der Wundheilung stattgefunden zu haben.

6 Literatur

1. Steland, A., *Basiswissen Statistik*. 2007: Springer. p. 37-39.
2. Wappler, F., *Verbrennungsmedizin: vom Unfallort bis zur Rehabilitation*. 2009: Thieme. p.3-15.
3. Fahrmeir, L., et al., *Statistik: Der Weg zur Datenanalyse*. 2016: Springer Berlin Heidelberg. p. 59-64.
4. Hedderich, J. and L. Sachs, *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R*. 2018: Springer Berlin Heidelberg. p. 78,373.
5. Ottomann, C. and B. Hartmann, *Die Pathophysiologie des Verbrennungstraumas*. Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2004. **41**(6): p. 380-387.
6. Pallua, N. and S. Von Bülow, *Behandlungskonzepte bei Verbrennungen*. Der Chirurg, 2006. **77**(1): p. 81-94.
7. Kessler, R.W., *Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis*. 2012: Wiley. p. 86-87.
8. Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. Eur J Dermatol, 2002. **12**(4): p. 390-9; quiz 400-1.
9. Benner, L., et al., *Auswertung klinischer Studien mit SPSS: Ein Leitfaden zur strukturierten Herangehensweise*. 2018: Springer Fachmedien Wiesbaden. p. 36-40.
10. Eich, C., M. Sinnig, and H. Guericke, *Akutversorgung des brandverletzten Kindes*. Notfall + Rettungsmedizin, 2014. **17**(2): p. 113-122.
11. Krzywinski, M. and N. Altman, *Visualizing samples with box plots*. Nat Methods, 2014. **11**(2): p. 119-20.
12. Groß, J., *Grundlegende Statistik mit R: Eine anwendungsorientierte Einführung in die Verwendung der Statistik Software R*. 2010: Vieweg+Teubner Verlag. p. 121.
13. Welsch, U., T. Deller, and S. Elsberger, *Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller*. 2011: Elsevier Health Sciences Germany. p.465-483.
14. Fritsch, P. and T. Schwarz, *Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas*. 2018: Springer-Verlag. p. 6-67.
15. Onuma, H., C. Mastui, and M. Morohashi, *Quantitative analysis of the proliferation of epidermal cells using a human skin organ culture system and the effect of DbcAMP using markers of proliferation (BrdU, Ki-67, PCNA)*. Archives of Dermatological Research, 2001. **293**(3): p. 133-138.
16. Ando, M., et al., *Immunohistological detection of proliferating cells in normal and psoriatic epidermis using Ki-67 monoclonal antibody*. J Dermatol Sci, 1990. **1**(6): p. 441-6.
17. Aumüller, G., et al., *Duale Reihe Anatomie*. 2014, Thieme.
18. Allgöwer, M., J.R. Siewert, and H.J. Stein, *Chirurgie: mit integriertem Fallquiz-40 Fälle nach neuer AO*. 2009: Springer-Verlag. p. 57-75.
19. Lippert, H., et al., *Wundatlas: Kompendium der komplexen Wundbehandlung*. 2006: Thieme. p.21-46.
20. Mast, B.A. and G.S. Schultz, *Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds*. Wound Repair Regen, 1996. **4**(4): p. 411-20.
21. Mutschler, W. and M. Arand, *Praxis der Unfallchirurgie: 236 Tabellen*. 2004: Thieme.
22. Cherg, S., J. Young, and H. Ma, *Alpha-smooth muscle actin (α -SMA)*. J Am Sci, 2008. **4**(4): p. 7-9.
23. Kawasaki, Y., et al., *Renal expression of alpha-smooth muscle actin and c-Met in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis*. Pediatr Nephrol, 2008. **23**(6): p. 913-9.

24. DeLisser, H.M., et al., *Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis*. Am J Pathol, 1997. **151**(3): p. 671-7.
25. Basilio-de-Oliveira, R.P. and V.L. Pannain, *Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(22): p. 6924-30.
26. Giatromanolaki, A., et al., *Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(12 Pt 1): p. 2485-92.
27. Sharma, B., et al., *Diagnostic modalities of precancerous and cancerous cervical lesions with special emphasis on CD31 angiogenesis factor as a marker*. Pathology research international, 2013. **2013**.
28. Hafner, C., S. Meyer, and T. Vogt, *Mechanismen der epithelialen Regeneration*. Der Hautarzt, 2002. **53**(8): p. 561-575.
29. Lammert, E. and J. Axnick, *Vascular lumen formation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a006619.
30. Eming, S.A., et al., *Regulation of angiogenesis: wound healing as a model*. Prog Histochem Cytochem, 2007. **42**(3): p. 115-70.
31. Jousen, A., B. Kirchhof, and C. Gottstein, *Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese*. Der Ophthalmologe, 2003. **100**(4): p. 284-291.
32. Schmidt, A., K. Brixius, and W. Bloch, *Endothelial Precursor Cell Migration During Vasculogenesis*. Circulation Research, 2007. **101**(2): p. 125-136.
33. Coffin, J.D. and T.J. Poole, *Endothelial cell origin and migration in embryonic heart and cranial blood vessel development*. Anat Rec, 1991. **231**(3): p. 383-95.
34. Polverini, P.J., *Cellular adhesion molecules. Newly identified mediators of angiogenesis*. Am J Pathol, 1996. **148**(4): p. 1023-9.
35. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nature Medicine, 2000. **6**(4): p. 389-395.
36. Adair, T.H. and J.P. Montani, *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease*, in *Angiogenesis*. 2010, Morgan & Claypool Life Sciences Copyright © 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences.: San Rafael (CA).
37. Cramer, T., et al., *HIF-1 α Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation*. Cell, 2003. **112**(5): p. 645-657.
38. Daniel, T.O., *Overview: Integrating Renal Hypoxic Signals in Development and Disease*. Journal of the American Society of Nephrology, 2003. **14**(11): p. 2693-2694.
39. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
40. Kuo, N.T., et al., *Prolonged hypoxia increases vascular endothelial growth factor mRNA and protein in adult mouse brain*. J Appl Physiol (1985), 1999. **86**(1): p. 260-4.
41. Kimura, H., et al., *Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide*. Blood, 2000. **95**(1): p. 189-97.
42. Maloney, J.P. and L. Gao, *Proinflammatory Cytokines Increase Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Alveolar Epithelial Cells*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 387842.
43. Ben-Av, P., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis*. FEBS Letters, 1995. **372**(1): p. 83-87.

44. Kobayashi, T., et al., *Smad3 mediates TGF- β 1 induction of VEGF production in lung fibroblasts*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **327**(2): p. 393-398.
45. Detmar, M., et al., *Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(1): p. 44-50.
46. Frank, S., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12607-13.
47. Adair, T.H., *Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(2): p. R283-r296.
48. Burri, P.H. and M.R. Tarek, *A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation*. The Anatomical Record, 1990. **228**(1): p. 35-45.
49. Caduff, J.H., L.C. Fischer, and P.H. Burri, *Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung*. The Anatomical Record, 1986. **216**(2): p. 154-164.
50. Kurz, H., P.H. Burri, and V.G. Djonov, *Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function*. News Physiol Sci, 2003. **18**: p. 65-70.
51. Djonov, V.G., H. Kurz, and P.H. Burri, *Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism*. Dev Dyn, 2002. **224**(4): p. 391-402.
52. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-674.
53. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1163-77.
54. Roy, R., B. Zhang, and M.A. Moses, *Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis*. Exp Cell Res, 2006. **312**(5): p. 608-22.
55. Egginton, S., *Invited review: activity-induced angiogenesis*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2008. **457**(5): p. 963.
56. Hiddemann, W., C.R. Bartram, and H. Huber, *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie-Pathogenese-Grundprinzipien der Therapie; Teil 2: Solide Tumoren-Lymphome-Leukämien*. 2013: Springer-Verlag. p. 296-301.
57. Shweiki, D., et al., *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 843-845.
58. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. Nature Medicine, 2003. **9**(6): p. 677-684.
59. Gabbiani, G., G.B. Ryan, and G. Majno, *Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction*. Experientia, 1971. **27**(5): p. 549-550.
60. Desmoulière, A., et al., *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 56-66.
61. Kural, M.H. and K.L. Billiar, *Myofibroblast persistence with real-time changes in boundary stiffness*. Acta Biomater, 2016. **32**: p. 223-230.
62. Nedelec, B., et al., *Myofibroblasts and apoptosis in human hypertrophic scars: the effect of interferon-alpha2b*. Surgery, 2001. **130**(5): p. 798-808.
63. Armour, A., P.G. Scott, and E.E. Tredget, *Cellular and molecular pathology of HTS: basis for treatment*. Wound Repair and Regeneration, 2007. **15**(s1): p. S6-S17.
64. Hinz, B., *The role of myofibroblasts in wound healing*. Curr Res Transl Med, 2016. **64**(4): p. 171-177.

65. Van De Water, L., S. Varney, and J.J. Tomasek, *Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013. **2**(4): p. 122-141.
66. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(5): p. 349-363.
67. Talele, Nilesh P., et al., *Expression of α -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells*. Stem Cell Reports, 2015. **4**(6): p. 1016-1030.
68. Hinz, B., *Matrix mechanics and regulation of the fibroblast phenotype*. Periodontol 2000, 2013. **63**(1): p. 14-28.
69. Duscher, D., et al., *Mechanotransduction and fibrosis*. J Biomech, 2014. **47**(9): p. 1997-2005.
70. Meng, Y., et al., *Orthodontic mechanical tension effects on the myofibroblast expression of alpha-smooth muscle actin*. Angle Orthod, 2010. **80**(5): p. 912-8.
71. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)- Ständige Kommission Leitlinien. AWMF-Regelwerk „Leitlinien“ *Behandlung thermischer Verletzungen des Erwachsenen Klasse: S2k AWMF-Register-Nr.: 044-001; Versionsnummer 7.0, Überarbeitung von Februar 2021; erste Auflage 1999* Zugriff: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/044-001l_S2k_Behandlung-thermischer-Verletzungen-des-Erwachsenen_2021-07.pdf. (Zugriff am 12.01.2022)
72. Adams, H., et al., *Die notfall-und intensivmedizinische Grundversorgung des Schwerbrandverletzten*. Intensiv-und Notfallbehandlung, 2016. **41**(2): p. 58.
73. Kamolz, L.-P., D.N. Herndon, and M.G. Jeschke, *Verbrennungen: Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. 2010: Springer-Verlag. p. 1-30.
74. Gille, J., H. Fischer, and J.-C. Willms-Jones, *Versorgung von Brandverletzten*. Notfallmedizin up2date, 2012. **7**(01): p. 29-44.
75. Téot, L., P.E. Banwell, and U.E. Ziegler, *Surgery in wounds*. 2004: Springer Science & Business Media. p. 3-40.
76. Jackson, D.M., *The diagnosis of the depth of burning*. British journal of surgery, 1953. **40**(164): p. 588-596.
77. Plettig, J., et al., *Feasibility study of an active wound dressing based on hollow fiber membranes in a porcine wound model*. Burns, 2015. **41**(4): p. 778-788.
78. Kremer, M. and A. Berger, *Perspektiven des künstlichen Hautersatzes: Vom biologischen Verband zur künstlichen Haut*. Dtsch Arztebl International, 2000. **97**(18): p. A-1222.
79. Vogt, P.M., *Praxis der Plastischen Chirurgie: Plastisch-rekonstruktive Operationen - Plastisch-ästhetische Operationen - Handchirurgie - Verbrennungschirurgie*. 2012: Springer Berlin Heidelberg. p. 663.
80. Shpichka, A., et al., *Skin tissue regeneration for burn injury*. Stem Cell Research & Therapy, 2019. **10**(1): p. 94.
81. Park, J.W., S.R. Hwang, and I.S. Yoon, *Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration*. Molecules, 2017. **22**(8).
82. Griffith, L.G. and G. Naughton, *Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1009-14.
83. BAIRD, A. and M. KLAGSBRUN, *The Fibroblast Growth Factor Family An Overview*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1991. **638**(1): p. xi-xii.
84. Braund, R., S. Hook, and N.J. Medicott, *The role of topical growth factors in chronic wounds*. Curr Drug Deliv, 2007. **4**(3): p. 195-204.
85. Martin, P., *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 75-81.

86. Haug, R.H., *Physiology of the acute wound: Lawrence WT. Clin Plast Surg* 25:321, 1998. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1999. **57**(4): p. 484.
87. Wahl, S.M., H. Wong, and N. McCartney-Francis, *Role of growth factors in inflammation and repair. J Cell Biochem*, 1989. **40**(2): p. 193-9.
88. Riches, D.W.H., *Macrophage Involvement in Wound Repair, Remodeling, and Fibrosis*, in *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, R.A.F. Clark, Editor. 1988, Springer US: Boston, MA. p. 95-141.
89. Heldin, C.H. and B. Westermark, *Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiol Rev*, 1999. **79**(4): p. 1283-316.
90. Kehrl, J.H., et al., *Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J Exp Med*, 1986. **163**(5): p. 1037-50.
91. Assoian, R.K., et al., *Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(17): p. 6020-4.
92. Roberts, A.B., et al., *Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1986. **83**(12): p. 4167-4171.
93. Narayanan, A.S. and R.C. Page, *Biosynthesis and regulation of type V collagen in diploid human fibroblasts. Journal of Biological Chemistry*, 1983. **258**(19): p. 11694-11699.
94. Bauer, E.A., et al., *Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(12): p. 4132-6.
95. Baird, A. and N. Ling, *Fibroblast growth factors are present in the extracellular matrix produced by endothelial cells in vitro: implications for a role of heparinase-like enzymes in the neovascular response. Biochem Biophys Res Commun*, 1987. **142**(2): p. 428-35.
96. Schweigerer, L., et al., *Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. Nature*, 1987. **325**(6101): p. 257-9.
97. Baird, A., P. Mormede, and P. Bohlen, *Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. Biochem Biophys Res Commun*, 1985. **126**(1): p. 358-64.
98. Ferguson, M.W. and S. O'Kane, *Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004. **359**(1445): p. 839-50.
99. Franklin, J.D. and J.B. Lynch, *Effects of topical applications of epidermal growth factor on wound healing. Experimental study on rabbit ears. Plast Reconstr Surg*, 1979. **64**(6): p. 766-70.
100. Nanney, L.B., *Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair. J Invest Dermatol*, 1990. **94**(5): p. 624-9.
101. Cribbs, R.K., M.H. Luquette, and G.E. Besner, *Acceleration of partial-thickness burn wound healing with topical application of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). J Burn Care Rehabil*, 1998. **19**(2): p. 95-101.
102. Kiyohara, Y., et al., *Improvement in wound healing by epidermal growth factor (EGF) ointment. II. Effect of protease inhibitor, nafamostat, on stabilization and efficacy of EGF in burn. J Pharmacobiodyn*, 1991. **14**(1): p. 47-52.
103. Danilenko, D.M., et al., *Growth factors in porcine full and partial thickness burn repair. Differing targets and effects of keratinocyte growth factor, platelet-derived*

- growth factor-BB, epidermal growth factor, and neu differentiation factor.* Am J Pathol, 1995. **147**(5): p. 1261-77.
104. Gilpin, D.A., et al., *Recombinant human growth hormone accelerates wound healing in children with large cutaneous burns.* Ann Surg, 1994. **220**(1): p. 19-24.
 105. Mittermayr, R., et al., *Fibrin biomatrix-conjugated platelet-derived growth factor AB accelerates wound healing in severe thermal injury.* J Tissue Eng Regen Med, 2016. **10**(5): p. E275-85.
 106. Fu, X., et al., *Randomised placebo-controlled trial of use of topical recombinant bovine basic fibroblast growth factor for second-degree burns.* Lancet, 1998. **352**(9141): p. 1661-4.
 107. Akita, S., et al., *Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing.* Wound Repair Regen, 2008. **16**(5): p. 635-41.
 108. Zhang, Y., et al., *Growth factor therapy in patients with partial-thickness burns: a systematic review and meta-analysis.* Int Wound J, 2016. **13**(3): p. 354-66.
 109. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)- Ständige Kommission Leitlinien. AWMF-Regelwerk „Leitlinien“. *Lokaltherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz.* Stand: 16.01.2014 Version: Entwurfsfassung 2; Verfügbar: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/091-001k_S3_Lokaltherapie_chronischer_Wunden_2015-ungueltig.pdf. (Zugriff am 14.01.2022).
 110. Wang, E.A., et al., *Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9484-8.
 111. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.* Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-34.
 112. Hari Reddi, A., *Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins.* Current Opinion in Cell Biology, 1992. **4**(5): p. 850-855.
 113. Zhang, Y., P.B. Alexander, and X.F. Wang, *TGF-beta Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(4).
 114. Dunker, N., et al., *The role of transforming growth factor beta-2, beta-3 in mediating apoptosis in the murine intestinal mucosa.* Gastroenterology, 2002. **122**(5): p. 1364-75.
 115. Joyce, M.E., et al., *Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur.* J Cell Biol, 1990. **110**(6): p. 2195-207.
 116. Hogan, B.L., *Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development.* Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1580-94.
 117. Assoian, R.K., et al., *Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization.* J Biol Chem, 1983. **258**(11): p. 7155-60.
 118. Roberts, A.B., et al., *Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues.* Fed Proc, 1983. **42**(9): p. 2621-6.
 119. Mikic, B., K. Rossmeier, and L. Bierwert, *Sexual dimorphism in the effect of GDF-6 deficiency on murine tendon.* J Orthop Res, 2009. **27**(12): p. 1603-11.
 120. Poniatowski Ł, A., et al., *Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications.* Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 137823.

121. Massagué, J., *The transforming growth factor-beta family*. Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 597-641.
122. Yamashita, H., et al., *Bone morphogenetic protein receptors*. Bone, 1996. **19**(6): p. 569-74.
123. Urist, M.R. and B.S. Strates, *Bone morphogenetic protein*. J Dent Res, 1971. **50**(6): p. 1392-406.
124. Wrana, J.L., et al., *Mechanism of activation of the TGF-beta receptor*. Nature, 1994. **370**(6488): p. 341-7.
125. Sanchez-Duffhues, G., et al., *Bone morphogenetic protein receptors: Structure, function and targeting by selective small molecule kinase inhibitors*. Bone, 2020. **138**: p. 115472.
126. Kingsley, D.M., *The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms*. Genes & Development, 1994. **8**(2): p. 133-146.
127. Fessing, M.Y., et al., *BMP signaling induces cell-type-specific changes in gene expression programs of human keratinocytes and fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 398-404.
128. Attisano, L., et al., *Novel activin receptors: Distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors*. Cell, 1992. **68**(1): p. 97-108.
129. Miyazawa, K. and K. Miyazono, *Regulation of TGF-β Family Signaling by Inhibitory Smads*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(3).
130. Nickel, J. and T.D. Mueller, *Specification of BMP Signaling*. Cells, 2019. **8**(12).
131. Itoh, S., et al., *Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins*. Eur J Biochem, 2000. **267**(24): p. 6954-67.
132. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-β family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-584.
133. Attisano, L. and J.L. Wrana, *Signal transduction by the TGF-β superfamily*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1646-1647.
134. Battegay, E.J., et al., *TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop*. Cell, 1990. **63**(3): p. 515-24.
135. Vivien, D., et al., *Differential effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on the cell cycle of cultured rabbit articular chondrocytes*. J Cell Physiol, 1990. **143**(3): p. 534-45.
136. Centrella, M., T.L. McCarthy, and E. Canalis, *Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone*. J Biol Chem, 1987. **262**(6): p. 2869-74.
137. Majack, R.A., *Beta-type transforming growth factor specifies organizational behavior in vascular smooth muscle cell cultures*. J Cell Biol, 1987. **105**(1): p. 465-71.
138. Hill, D.J., et al., *Bi-functional action of transforming growth factor-β on DNA synthesis in early passage human fetal fibroblasts*. Journal of Cellular Physiology, 1986. **128**(2): p. 322-328.
139. Sporn, M., et al., *Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo*. Science, 1983. **219**(4590): p. 1329-1331.
140. Penn, J.W., A.O. Grobbelaar, and K.J. Rolfe, *The role of the TGF-β family in wound healing, burns and scarring: a review*. Int J Burns Trauma, 2012. **2**(1): p. 18-28.
141. Wang, R., et al., *Hypertrophic scar tissues and fibroblasts produce more transforming growth factor-beta1 mRNA and protein than normal skin and cells*. Wound Repair Regen, 2000. **8**(2): p. 128-37.

142. Xie, J.L., et al., *Expression of Smad protein by normal skin fibroblasts and hypertrophic scar fibroblasts in response to transforming growth factor beta1*. *Dermatol Surg*, 2008. **34**(9): p. 1216-24; discussion 1224-5.
143. Kopp, J., et al., *Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(22): p. 21570-6.
144. Shah, M., D.M. Foreman, and M.W. Ferguson, *Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta*. *Lancet*, 1992. **339**(8787): p. 213-4.
145. Daniels, J.T., et al., *Mediation of transforming growth factor-beta(1)-stimulated matrix contraction by fibroblasts: a role for connective tissue growth factor in contractile scarring*. *The American journal of pathology*, 2003. **163**(5): p. 2043-2052.
146. Kim, B.C., et al., *Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF-beta-signaling and decreased TGF-beta Type II receptor expression*. *J Cell Physiol*, 2003. **195**(3): p. 331-6.
147. Pastar, I., et al., *Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers*. *Mol Med*, 2010. **16**(3-4): p. 92-101.
148. Rorison, P., et al., *Longitudinal changes in plasma Transforming growth factor beta-1 and post-burn scarring in children*. *Burns*, 2010. **36**(1): p. 89-96.
149. Kleinschmidt, K., et al., *Superior angiogenic potential of GDF-5 and GDF-5(V453/V456) compared with BMP-2 in a rabbit long-bone defect model*. *J Bone Joint Surg Am*, 2014. **96**(20): p. 1699-707.
150. Takahashi, H. and T. Ikeda, *Transcripts for two members of the transforming growth factor-beta superfamily BMP-3 and BMP-7 are expressed in developing rat embryos*. *Dev Dyn*, 1996. **207**(4): p. 439-49.
151. Botchkarev, V.A., *Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2003. **120**(1): p. 36-47.
152. Sharov, A.A., et al., *Noggin overexpression inhibits eyelid opening by altering epidermal apoptosis and differentiation*. *Embo j*, 2003. **22**(12): p. 2992-3003.
153. Andl, T., et al., *Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development*. *Development*, 2004. **131**(10): p. 2257-68.
154. D'Souza, S.J., et al., *Ca²⁺ and BMP-6 signaling regulate E2F during epidermal keratinocyte differentiation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(26): p. 23531-8.
155. Kobiela, K., et al., *Defining BMP functions in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor IA*. *J Cell Biol*, 2003. **163**(3): p. 609-23.
156. Park, G.T. and M.I. Morasso, *Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) transactivates Dlx3 through Smad1 and Smad4: alternative mode for Dlx3 induction in mouse keratinocytes*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(2): p. 515-22.
157. Plikus, M., et al., *Morpho-regulation of ectodermal organs: integument pathology and phenotypic variations in K14-Noggin engineered mice through modulation of bone morphogenetic protein pathway*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(3): p. 1099-114.
158. Sharov, A.A., et al., *Bone morphogenetic protein (BMP) signaling controls hair pigmentation by means of cross-talk with the melanocortin receptor-1 pathway*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(1): p. 93-98.
159. Zhang, J., et al., *Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion*. *Stem Cells*, 2006. **24**(12): p. 2826-39.

160. McDonnell, M.A., et al., *Antagonistic effects of TGFbeta1 and BMP-6 on skin keratinocyte differentiation*. *Exp Cell Res*, 2001. **263**(2): p. 265-73.
161. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(3): p. 835-70.
162. Kaiser, S., et al., *Induction of bone morphogenetic protein-6 in skin wounds. Delayed reepithelialization and scar formation in BMP-6 overexpressing transgenic mice*. *J Invest Dermatol*, 1998. **111**(6): p. 1145-52.
163. Blessing, M., P. Schirmacher, and S. Kaiser, *Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions*. *J Cell Biol*, 1996. **135**(1): p. 227-39.
164. Arrabal, P.M., et al., *Osteogenic molecules for clinical applications: improving the BMP-collagen system*. *Biol Res*, 2013. **46**(4): p. 421-9.
165. Govender, S., et al., *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients*. *J Bone Joint Surg Am*, 2002. **84**(12): p. 2123-34.
166. Friedlaender, G.E., et al., *Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions*. *J Bone Joint Surg Am*, 2001. **83-A Suppl 1**(Pt 2): p. S151-8.
167. Einhorn, T.A., et al., *A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair*. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 2003. **85**(8): p. 1425-1435.
168. Burkus, J.K., et al., *Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002. **27**(21): p. 2396-408.
169. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), B.f.A.u.M. *InductOs (Dibotermis alfa): Mängel bei den Herstellungsanforderungen*. 2015 10.06.2020]; Verfügbar: https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RV_S TP/g-l/inductos.html. (Zugriff am 10.06.2020).
170. Bishop, G.B. and T.A. Einhorn, *Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery*. *International orthopaedics*, 2007. **31**(6): p. 721-727.
171. Khouri, R.K., B. Koudsi, and H. Reddi, *Tissue transformation into bone in vivo. A potential practical application*. *Jama*, 1991. **266**(14): p. 1953-5.
172. Warnke, P.H., et al., *Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man*. *Lancet*, 2004. **364**(9436): p. 766-70.
173. James, R., et al., *Tendon tissue engineering: adipose-derived stem cell and GDF-5 mediated regeneration using electrospun matrix systems*. *Biomed Mater*, 2011. **6**(2): p. 025011.
174. Morotome, Y., et al., *Gene expression of growth and differentiation factors-5, -6, and -7 in developing bovine tooth at the root forming stage*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **244**(1): p. 85-90.
175. Sullivan, A.M. and G.W. O'Keeffe, *The role of growth/differentiation factor 5 (GDF5) in the induction and survival of midbrain dopaminergic neurones: relevance to Parkinson's disease treatment*. *J Anat*, 2005. **207**(3): p. 219-26.
176. Zhang, B., et al., *Human mesenchymal stem cells induced by growth differentiation factor 5: an improved self-assembly tissue engineering method for cartilage repair*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011. **17**(12): p. 1189-99.

177. Pohl, J., *Use of gdf-5 for the improvement or maintenance of dermal appearance*. 2010, Google Patents. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Patent Summary for EP-2121142-B1; [cited 2022 Apr. 24]. Verfügbar: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/EP-2121142-B1>. (Zugriff am 24.04.2022).
178. Erlacher, L., et al., *Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1998. **13**(3): p. 383-392.
179. Yamashita, H., et al., *Growth/differentiation factor-5 induces angiogenesis in vivo*. *Exp Cell Res*, 1997. **235**(1): p. 218-26.
180. Liu, Z., et al., *GDF5 and BMP2 inhibit apoptosis via activation of BMPR2 and subsequent stabilization of XIAP*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(12): p. 1819-27.
181. Kawamura, C., et al., *Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3*. *Blood*, 2000. **96**(6): p. 2005-11.
182. O'Sullivan, D.B., P.T. Harrison, and A.M. Sullivan, *Effects of GDF5 overexpression on embryonic rat dopaminergic neurones in vitro and in vivo*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2010. **117**(5): p. 559-72.
183. Zhao, Y., et al., *Signaling by growth/differentiation factor 5 through the bone morphogenetic protein receptor type IB protects neurons against kainic acid-induced neurodegeneration*. *Neurosci Lett*, 2017. **651**: p. 36-42.
184. Zhao, G., et al., *In vitro engineering of fibrocartilage using CDMP1 induced dermal fibroblasts and polyglycolide*. *Biomaterials*, 2009. **30**(19): p. 3241-50.
185. Yin, S., et al., *Chondrogenic transdifferentiation of human dermal fibroblasts stimulated with cartilage-derived morphogenetic protein 1*. *Tissue Eng Part A*, 2010. **16**(5): p. 1633-43.
186. Dines, J.S., et al., *In vitro analysis of an rhGDF-5 suture coating process and the effects of rhGDF-5 on rat tendon fibroblasts*. *Growth Factors*, 2011. **29**(1): p. 1-7.
187. Saiga, K., et al., *Combined use of bFGF and GDF-5 enhances the healing of medial collateral ligament injury*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **402**(2): p. 329-34.
188. Chhabra, A., et al., *GDF-5 deficiency in mice delays Achilles tendon healing*. *J Orthop Res*, 2003. **21**(5): p. 826-35.
189. Mikic, B., et al., *GDF-5 deficiency in mice alters the ultrastructure, mechanical properties and composition of the Achilles tendon*. *J Orthop Res*, 2001. **19**(3): p. 365-71.
190. Clark, R.T., et al., *GDF-5 deficiency in mice leads to disruption of tail tendon form and function*. *Connect Tissue Res*, 2001. **42**(3): p. 175-86.
191. Yamada, S., et al., *Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 302932.
192. Lin, Y.C., et al., *Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications*. *Acta Biomater*, 2009. **5**(7): p. 2591-600.
193. Schiefer, J.L., et al., *Growth Differentiation Factor 5 Accelerates Wound Closure and Improves Skin Quality During Repair of Full-Thickness Skin Defects*. *Adv Skin Wound Care*, 2017. **30**(5): p. 223-229.
194. Coolen, N.A., et al., *Development of an in vitro burn wound model*. *Wound Repair and Regeneration*, 2008. **16**(4): p. 559-567.
195. Cuttle, L., et al., *A porcine deep dermal partial thickness burn model with hypertrophic scarring*. *Burns*, 2006. **32**(7): p. 806-820.

196. Singer, A.J., et al., *Validation of a vertical progression porcine burn model*. Journal of burn care & research, 2011. **32**(6): p. 638-646.
197. Wang, X.-Q., et al., *The correlation of in vivo burn scar contraction with the level of α -smooth muscle actin expression*. Burns, 2011. **37**(8): p. 1367-1377.
198. Lotan, R., *Squamous cell differentiation markers in normal, premalignant, and malignant epithelium: Effects of retinoids*. Journal of Cellular Biochemistry, 1993. **53**(S17F): p. 167-174.
199. Eckert, R.L., *Structure, function, and differentiation of the keratinocyte*. Physiol Rev, 1989. **69**(4): p. 1316-46.
200. Gerdes, J., et al., *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol, 1984. **133**(4): p. 1710-5.
201. Farhangkhoei, H., et al., *Evaluation of Ki-67 as a histological index of burn damage in a swine model*. Journal of Burn Care & Research, 2012. **33**(2): p. e55-e62.
202. Strompen, O., *Statistik für Medizinerinnen und Mediziner*. 2020: Lehmanns Media. p. 49-55.
203. Armstrong, R.A., *When to use the Bonferroni correction*. Ophthalmic and Physiological Optics, 2014. **34**(5): p. 502-508.
204. Holm, S., *A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure*. Scandinavian Journal of Statistics, 1979. **6**(2): p. 65-70.
205. Lehmann, E.L. and J.P. Romano, *Generalizations of the familywise error rate*. The Annals of Statistics, 2005. **33**(3): p. 1138-1154, 17.
206. Lindquist, M.A. and A. Mejia, *Zen and the art of multiple comparisons*. Psychosom Med, 2015. **77**(2): p. 114-25.
207. Zehetmayer, S., P. Bauer, and M. Posch, *Optimized multi-stage designs controlling the false discovery or the family-wise error rate*. Stat Med, 2008. **27**(21): p. 4145-60.
208. McHugh, M.L., *Multiple comparison analysis testing in ANOVA*. Biochem Med (Zagreb), 2011. **21**(3): p. 203-9.
209. Mishra, P., et al., *Application of student's t-test, analysis of variance, and covariance*. Ann Card Anaesth, 2019. **22**(4): p. 407-411.
210. Ayalon, O., et al., *Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells*. J Cell Biol, 1994. **126**(1): p. 247-58.
211. Schlüter, A., et al., *CD31 and VEGF are prognostic biomarkers in early-stage, but not in late-stage, laryngeal squamous cell carcinoma*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 272.
212. LaPres, J.J. and L.G. Hudson, *Identification of a Functional Determinant of Differentiation-dependent Expression in the Involucrin Gene **. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(38): p. 23154-23160.
213. Pusztaszeri, M.P., W. Seelentag, and F.T. Bosman, *Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2006. **54**(4): p. 385-395.
214. McKenney, J.K., S.W. Weiss, and A.L. Folpe, *CD31 expression in intratumoral macrophages: a potential diagnostic pitfall*. Am J Surg Pathol, 2001. **25**(9): p. 1167-73.
215. Hungermann, D., et al., *Myoepitheliale Tumoren der Kopfspeicheldrüsen*. Der Pathologe, 2005. **26**(5): p. 339-344.
216. Wilk, M., et al., *Chondroid syringoma. Immunohistological evidence for myoepithelial differentiation*. Der Hautarzt, 1994. **45**(5): p. 324-329.
217. Popescu, F.C., et al., *Pericytes and myofibroblasts reaction in experimental thermal third degree skin burns*. Rom J Morphol Embryol, 2011. **52**(3 Suppl): p. 1011-1017.

218. Darby, I., O. Skalli, and G. Gabbiani, *Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing*. *Lab Invest*, 1990. **63**(1): p. 21-9.
219. Silver, A.G., et al., *Acute pavement burns: a unique subset of burn injuries: a five-year review of resource use and cost impact*. *J Burn Care Res*, 2015. **36**(1): p. e7-e11.
220. Stampolidis, N., et al., *Quality of life in burn patients in Greece*. *Ann Burns Fire Disasters*, 2012. **25**(4): p. 192-5.
221. Kawasaki, Y., et al., *Renal expression of alpha-smooth muscle actin and c-Met in children with Henoch–Schönlein purpura nephritis*. *Pediatric Nephrology*, 2008. **23**(6): p. 913-919.
222. Shou, K., et al., *Enhancement of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Angiogenic Capacity by NPWT for a Combinatorial Therapy to Promote Wound Healing with Large Defect*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 7920265.
223. Pastar, I., et al., *Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review*. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2014. **3**(7): p. 445-464.
224. LAPLANTE, A.F., et al., *Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions*. *The FASEB Journal*, 2001. **15**(13): p. 2377-2389.
225. Safferling, K., et al., *Wound healing revised: a novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models*. *J Cell Biol*, 2013. **203**(4): p. 691-709.
226. Wang, X., et al., *Induction of Fibroblast Senescence During Mouse Corneal Wound Healing*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2019. **60**(10): p. 3669-3679.
227. Stanley, J.R., et al., *Detection of basement membrane zone antigens during epidermal wound healing in pigs*. *J Invest Dermatol*, 1981. **77**(2): p. 240-3.
228. Clark, R.A., et al., *Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization*. *J Invest Dermatol*, 1982. **79**(5): p. 264-9.
229. Qvist, M.H., et al., *Evaluation of Göttingen minipig skin for transdermal in vitro permeation studies*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000. **11**(1): p. 59-68.
230. Jansson, K., G. Kratz, and A. Haegerstrand, *Characterization of a new in vitro model for studies of reepithelialization in human partial thickness wounds*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1996. **32**(9): p. 534-40.
231. Ortonne, J.-P., et al., *Immunomorphological and ultrastructural aspects of keratinocyte migration in epidermal wound healing*. *Virchows Archiv A*, 1981. **392**(2): p. 217-230.
232. Olerud, J.E., et al., *An Assessment of Human Epidermal Repair in Elderly Normal Subjects Using Immunohistochemical Methods*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1988. **90**(6): p. 845-850.
233. Mansbridge, J.N. and A.M. Knapp, *Changes in keratinocyte maturation during wound healing*. *J Invest Dermatol*, 1987. **89**(3): p. 253-63.
234. Bosca, A.R., et al., *Epithelial differentiation of human skin equivalents after grafting onto nude mice*. *J Invest Dermatol*, 1988. **91**(2): p. 136-41.
235. Rigal, C., et al., *Optimization of a model of full-thickness epidermal burns in the pig and immunohistochemical study of epidermodermal junction regeneration during burn healing*. *Dermatology*, 1992. **184**(2): p. 103-10.
236. Ud-Din, S., et al., *Noninvasive device readouts validated by immunohistochemical analysis enable objective quantitative assessment of acute wound healing in human skin*. *Wound Repair and Regeneration*, 2015. **23**(6): p. 901-914.

237. Ohki, Y., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils*. The FASEB Journal, 2005. **19**(14): p. 2005-2007.
238. Schrufer, R., et al., *The proangiogenic capacity of polymorphonuclear neutrophils delineated by microarray technique and by measurement of neovascularization in wounded skin of CD18-deficient mice*. J Vasc Res, 2006. **43**(1): p. 1-11.
239. Wang, S., et al., *Functional ENaC channels expressed in endothelial cells: a new candidate for mediating shear force*. Microcirculation, 2009. **16**(3): p. 276-87.
240. Balligand, J.-L., O. Feron, and C. Dessy, *eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues*. Physiological Reviews, 2009. **89**(2): p. 481-534.
241. Fronius, M., et al., *Epithelial Na⁺ channels derived from human lung are activated by shear force*. Respir Physiol Neurobiol, 2010. **170**(1): p. 113-9.
242. DeCherney, A.H., et al., *Expression of cyclin protein after thermal skin injury in a guinea pig model*. J Burn Care Rehabil, 1997. **18**(4): p. 292-8.
243. Singer, A.J., et al., *The effects of rapid enzymatic debridement of deep partial-thickness burns with Debrase on wound reepithelialization in swine*. J Burn Care Res, 2010. **31**(5): p. 795-802.
244. Rodgers, K.E., et al., *Histologic alterations in dermal repair after thermal injury effects of topical angiotensin II*. J Burn Care Rehabil, 1997. **18**(5): p. 381-8.
245. Koopman, T., et al., *Digital image analysis of Ki67 proliferation index in breast cancer using virtual dual staining on whole tissue sections: clinical validation and inter-platform agreement*. Breast Cancer Res Treat, 2018. **169**(1): p. 33-42.
246. Lippert, H. and S. Altmann, *Wundatlas: Kompendium der komplexen Wundbehandlung*. 2012: Thieme.
247. Beutel, J., et al., *Pharmacological prevention of radiation-induced dry eye-an experimental study in a rabbit model*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2007. **245**(9): p. 1347-1355.
248. Fraser, J.F., et al., *Deep dermal burn injury results in scarless wound healing in the ovine fetus*. Wound Repair Regen, 2005. **13**(2): p. 189-97.
249. Köhnlein, H. and G. Lemperle, *Experimentelle Untersuchungen und klinische Beobachtungen zur Kaltwasserbehandlung bei frischen Verbrennungen*. Chirurgia plastica, 1972. **1**(3): p. 216-221.
250. Papp, A., et al., *The progression of burn depth in experimental burns: a histological and methodological study*. Burns, 2004. **30**(7): p. 684-690.
251. Atiyeh, B.S., S.W. Gunn, and S.N. Hayek, *State of the Art in Burn Treatment*. World Journal of Surgery, 2005. **29**(2): p. 131-148.
252. Mücke, K. and T. Beushausen, *Verbrühung und Verbrennung im Kindesalter*. Notfall & Rettungsmedizin, 2001. **4**(3): p. 184-188.
253. Nanney, L.B., B.A. Wenczak, and J.B. Lynch, *Progressive burn injury documented with vimentin immunostaining*. The Journal of burn care & rehabilitation, 1996. **17**(3): p. 191-198.
254. Watts, A., et al., *Burn depth and its histological measurement*. Burns, 2001. **27**(2): p. 154-160.
255. Wang, X.-Q., O. Kravchuk, and R.M. Kimble, *A retrospective review of burn dressings on a porcine burn model*. Burns, 2010. **36**(5): p. 680-687.
256. Ho-Asjoe, M., et al., *Immunohistochemical analysis of burn depth*. The Journal of burn care & rehabilitation, 1999. **20**(3): p. 207-211.

257. Hinshaw, J.R. and H. Pearse, *Histological techniques for the differential staining of burned and normal tissues*. Vol. 449. 1956: Office of Technical Services, Department of Commerce.
258. Monstrey, S., et al., *Assessment of burn depth and burn wound healing potential*. burns, 2008. **34**(6): p. 761-769.
259. Hira, V.V.V., et al., *Comparison of different methodologies and cryostat versus paraffin sections for chromogenic immunohistochemistry*. Acta Histochemica, 2019. **121**(2): p. 125-134.
260. Fedchenko, N. and J. Reifenrath, *Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue—a review*. Diagnostic pathology, 2014. **9**(1): p. 1-12.
261. Bresnihan, B., et al., *Microscopic measurement of synovial membrane inflammation in rheumatoid arthritis: proposals for the evaluation of tissue samples by quantitative analysis*. Br J Rheumatol, 1998. **37**(6): p. 636-42.
262. Ida, C.M., et al., *Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for detection of BRAF V600E mutation in pleomorphic xanthoastrocytoma*. Acta neuropathologica communications, 2013. **1**: p. 20-20.
263. Sand, J.P., et al., *BMP-2 expression correlates with local failure in head and neck squamous cell carcinoma*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2014. **150**(2): p. 245-50.
264. Yang, R., et al., *Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections*. Eur Cell Mater, 2003. **6**: p. 57-71; discussion 71.
265. Kapoor, P. and R. Deshmukh, *VEGF: A critical driver for angiogenesis and subsequent tumor growth: An IHC study*. J Oral Maxillofac Pathol, 2012. **16**(3): p. 330-7.
266. Jin, Y., et al., *Overexpression of BMP-2/4, -5 and BMPRI-IA associated with malignancy of oral epithelium*. Oral Oncology, 2001. **37**(3): p. 225-233.
267. Tak, P.P., et al., *Reduction of synovial inflammation after anti-cd4 monoclonal antibody treatment in early rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism, 1995. **38**(10): p. 1457-1465.
268. Tak, P.P., et al., *Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity*. Arthritis & Rheumatism, 1997. **40**(2): p. 217-225.
269. Tak, P.P., et al., *Expression of Adhesion Molecules in Early Rheumatoid Synovial Tissue*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1995. **77**(3): p. 236-242.
270. Lindblad, S. and E. Hedfors, *Intraarticular variation in synovitis. Local macroscopic and microscopic signs of inflammatory activity are significantly correlated*. Arthritis & Rheumatism, 1985. **28**(9): p. 977-986.
271. Fitzgibbons, P.L., et al., *Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast*. Arch Pathol Lab Med, 2014. **138**(5): p. 595-601.
272. Adams, E.J., et al., *Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining*. J Clin Pathol, 1999. **52**(1): p. 75-7.
273. Alvarenga, A.W., et al., *A comparison between manual and automated evaluations of tissue microarray patterns of protein expression*. J Histochem Cytochem, 2013. **61**(4): p. 272-82.
274. Kraan, M.C., et al., *Quantification of the cell infiltrate in synovial tissue by digital image analysis*. Rheumatology (Oxford), 2000. **39**(1): p. 43-9.

275. Varghese, F., et al., *IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96801.
276. Schlederer, M., et al., *Reliable quantification of protein expression and cellular localization in histological sections*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100822.
277. Youssef, P., et al., *Microscopic measurement of cellular infiltration in the rheumatoid arthritis synovial membrane: a comparison of semiquantitative and quantitative analysis*. British journal of rheumatology, 1998. **37**(9): p. 1003-1007.
278. Rudlowski, C., et al., *Immunohistochemischer Nachweis des Glukose-Transportproteins GLUT-1 in primären Ovarialkarzinomen-Ein Charakteristikum des malignen Phänotyps*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 1999. **59**(06): p. 258-260.
279. Burry, R.W., *Controls for immunocytochemistry: an update*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2011. **59**(1): p. 6-12.
280. Mohammed, Z.M., et al., *Comparison of visual and automated assessment of microvessel density and their impact on outcome in primary operable invasive ductal breast cancer*. Hum Pathol, 2013. **44**(8): p. 1688-95.
281. van Diest, P.J., et al., *A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Cooperative Group*. J Clin Pathol, 1997. **50**(10): p. 801-4.
282. Taylor, C.R. and R.M. Levenson, *Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II*. Histopathology, 2006. **49**(4): p. 411-424.
283. Grube, D., *Constants and variables in immunohistochemistry*. Arch Histol Cytol, 2004. **67**(2): p. 115-34.
284. Röhrich, A., *Immunohistochemische Untersuchung des Neoangiogenesemarkers CD105 in ausgewählten Stadien der Mammakarzinogenese unter besonderer Berücksichtigung des Ductalen Carcinoma In Situ der Mamma*. 2010. p. 71.
285. Kiritsy, C.P., A.B. Lynch, and S.E. Lynch, *Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review*. Crit Rev Oral Biol Med, 1993. **4**(5): p. 729-60.
286. Hayashi, M., et al., *The effects of growth and differentiation factor 5 on bone marrow stromal cell transplants in an in vitro tendon healing model*. J Hand Surg Eur Vol, 2011. **36**(4): p. 271-9.
287. Aspenberg, P. and C. Forslund, *Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6*. Acta Orthop Scand, 1999. **70**(1): p. 51-4.
288. Forslund, C. and P. Aspenberg, *Improved healing of transected rabbit Achilles tendon after a single injection of cartilage-derived morphogenetic protein-2*. Am J Sports Med, 2003. **31**(4): p. 555-9.
289. Forslund, C., D. Rueger, and P. Aspenberg, *A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1, -2 and -3 for tendon healing in rats*. J Orthop Res, 2003. **21**(4): p. 617-21.
290. Rickert, M., et al., *A Growth and Differentiation Factor-5 (GDF-5)-coated Suture Stimulates Tendon Healing in an Achilles Tendon Model in Rats*. Growth Factors, 2001. **19**(2): p. 115-126.
291. Dines, J.S., et al., *The effect of growth differentiation factor-5-coated sutures on tendon repair in a rat model*. J Shoulder Elbow Surg, 2007. **16**(5 Suppl): p. S215-21.
292. Seo, J.-p., et al., *Osteoinductivity of gelatin/ β -tricalcium phosphate sponges loaded with different concentrations of mesenchymal stem cells and bone morphogenetic*

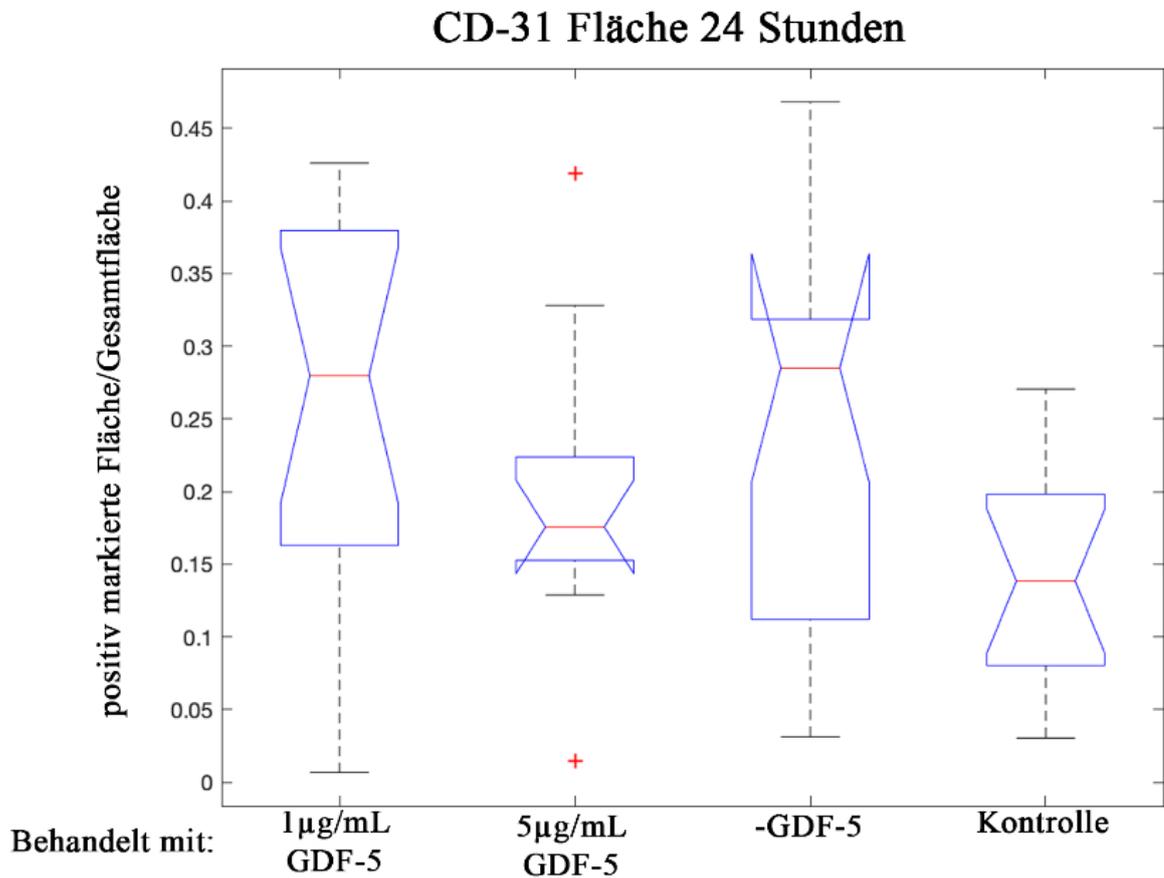
- protein-2 in an equine bone defect model*. Veterinary Research Communications, 2014. **38**(1): p. 73-80.
293. Kim, S., et al., *Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin microspheres enhances early osteoblastic differentiation*. Acta biomaterialia, 2012. **8**(5): p. 1768-1777.
 294. Mumcuoglu, D., et al., *Injectable BMP-2 delivery system based on collagen-derived microspheres and alginate induced bone formation in a time- and dose-dependent manner*. Eur Cell Mater, 2018. **35**: p. 242-254.
 295. Schützenberger, S., et al., *The optimal carrier for BMP-2: a comparison of collagen versus fibrin matrix*. Arch Orthop Trauma Surg, 2012. **132**(9): p. 1363-70.
 296. Linkhart, T.A., S. Mohan, and D.J. Baylink, *Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGFβ and BMP*. Bone, 1996. **19**(1, Supplement 1): p. S1-S12.
 297. Dines, J.S., et al., *The effect of growth differentiation factor-5–coated sutures on tendon repair in a rat model*. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 2007. **16**(5, Supplement): p. S215-S221.
 298. Oryan, A., et al., *Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations*. Biofactors, 2014. **40**(5): p. 459-81.
 299. Zhang, Q., et al., *Improvement in the delivery system of bone morphogenetic protein-2: a new approach to promote bone formation*. Biomed Mater, 2012. **7**(4): p. 045002.
 300. Poldervaart, M.T., et al., *Sustained release of BMP-2 in bioprinted alginate for osteogenicity in mice and rats*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72610.
 301. Lee, S.S., et al., *Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds*. Biomaterials, 2013. **34**(2): p. 452-9.
 302. Jongpaiboonkit, L., T. Franklin-Ford, and W.L. Murphy, *Mineral-Coated Polymer Microspheres for Controlled Protein Binding and Release*. Advanced Materials, 2009. **21**(19): p. 1960-1963.
 303. Guzmán, R., et al., *Chitosan Scaffolds Containing Calcium Phosphate Salts and rhBMP-2: In Vitro and In Vivo Testing for Bone Tissue Regeneration*. PLOS ONE, 2014. **9**(2): p. e87149.
 304. Poynton, A.R. and J.M. Lane, *Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine*. Spine (Phila Pa 1976), 2002. **27**(16 Suppl 1): p. S40-8.
 305. James, A.W., et al., *A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2*. Tissue engineering. Part B, Reviews, 2016. **22**(4): p. 284-297.
 306. Woo, B.H., et al., *Enhancement of Bone Growth by Sustained Delivery of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in a Polymeric Matrix*. Pharmaceutical Research, 2001. **18**(12): p. 1747-1753.
 307. Weiss, A. and L. Attisano, *The TGFβ Superfamily Signaling Pathway*. WIREs Developmental Biology, 2013. **2**(1): p. 47-63.
 308. Ikushima, H. and K. Miyazono, *TGFβ signalling: a complex web in cancer progression*. Nature Reviews Cancer, 2010. **10**(6): p. 415-424.
 309. Massagué, J., *TGFβ in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-230.
 310. Bierie, B. and H.L. Moses, *TGFβ: the molecular Jekyll and Hyde of cancer*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(7): p. 506-520.
 311. Yoshikawa, H., et al., *Immunohistochemical detection of bone morphogenetic proteins in bone and soft-tissue sarcomas*. Cancer, 1994. **74**(3): p. 842-847.
 312. Kleeff, J., et al., *Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo*. Gastroenterology, 1999. **116**(5): p. 1202-16.

313. Katoh, M. and M. Terada, *Overexpression of bone morphogenetic protein (BMP)-4 mRNA in gastric cancer cell lines of poorly differentiated type*. Journal of Gastroenterology, 1996. **31**(1): p. 137-139.
314. Harris, S.E., et al., *Expression of bone morphogenetic protein messenger RNAs by normal rat and human prostate and prostate cancer cells*. The Prostate, 1994. **24**(4): p. 204-211.
315. Barnes, J., et al., *Bone morphogenetic protein-6 expression in normal and malignant prostate*. World J Urol, 1995. **13**(6): p. 337-43.
316. Carragee, E.J., et al., *Cancer Risk After Use of Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2 for Spinal Arthrodesis*. JBJS, 2013. **95**(17): p. 1537-1545.
317. Devine, J.G., et al., *The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk?* Evid Based Spine Care J, 2012. **3**(2): p. 35-41.
318. Cooper, G.S. and T.D. Kou, *Risk of cancer after lumbar fusion surgery with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rh-BMP-2)*. Spine (Phila Pa 1976), 2013. **38**(21): p. 1862-8.
319. Lad, S.P., et al., *Cancer after spinal fusion: the role of bone morphogenetic protein*. Neurosurgery, 2013. **73**(3): p. 440-9.
320. Kelly, M.P., et al., *Cancer risk from bone morphogenetic protein exposure in spinal arthrodesis*. J Bone Joint Surg Am, 2014. **96**(17): p. 1417-22.
321. Thawani, J.P., et al., *Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature*. Neurosurgery, 2010. **66**(2): p. 233-46; discussion 246.
322. Ide, H., et al., *Growth Regulation of Human Prostate Cancer Cells by Bone Morphogenetic Protein-2*. Cancer Research, 1997. **57**(22): p. 5022-5027.
323. Soda, H., et al., *Antiproliferative effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human tumor colony-forming units*. Anticancer Drugs, 1998. **9**(4): p. 327-31.
324. Veeravagu, A., et al., *The use of bone morphogenetic protein in thoracolumbar spine procedures: analysis of the MarketScan longitudinal database*. Spine J, 2014. **14**(12): p. 2929-37.

7 Anhang

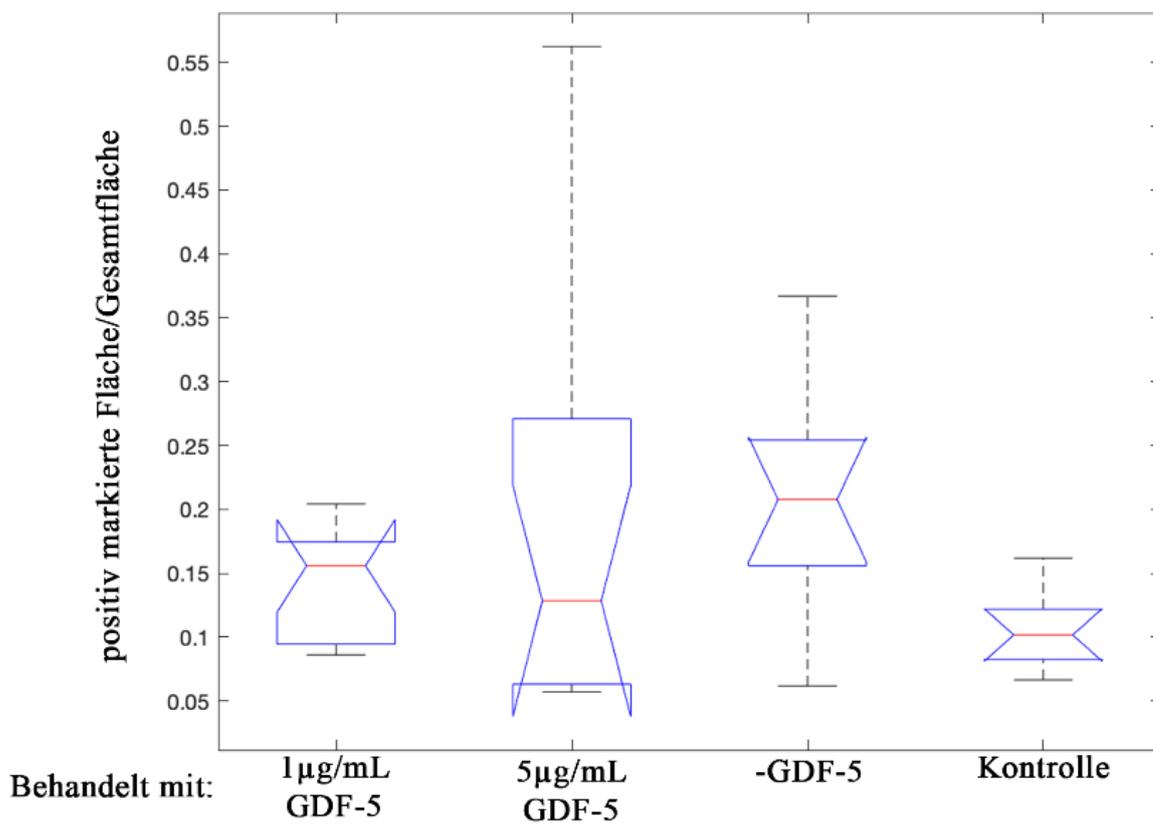
Es folgen die Boxplot-Diagramme, die keine statistisch signifikanten Ergebnisse beinhalten:

CD-31-Antikörperfärbung Fläche:



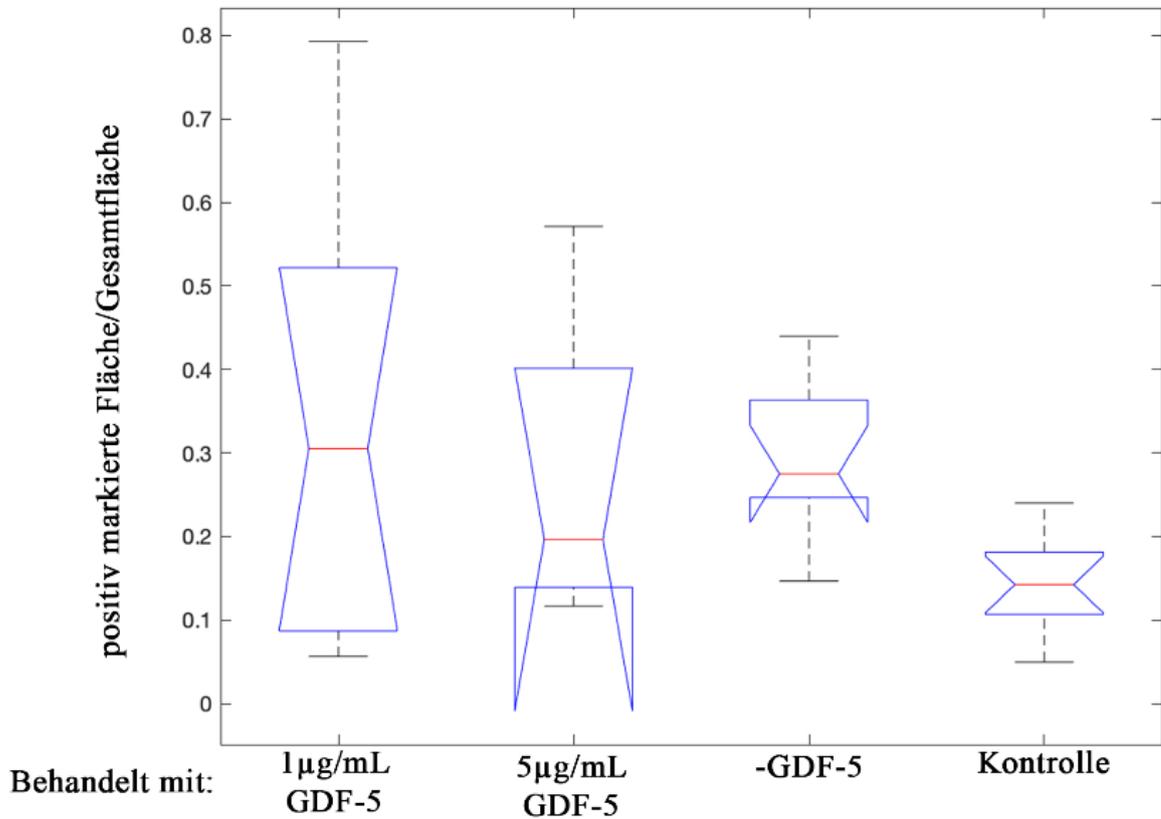
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit CD-31 gefärbten Fläche 24 Stunden nach Verbrennung

CD-31 Fläche 3 Tage



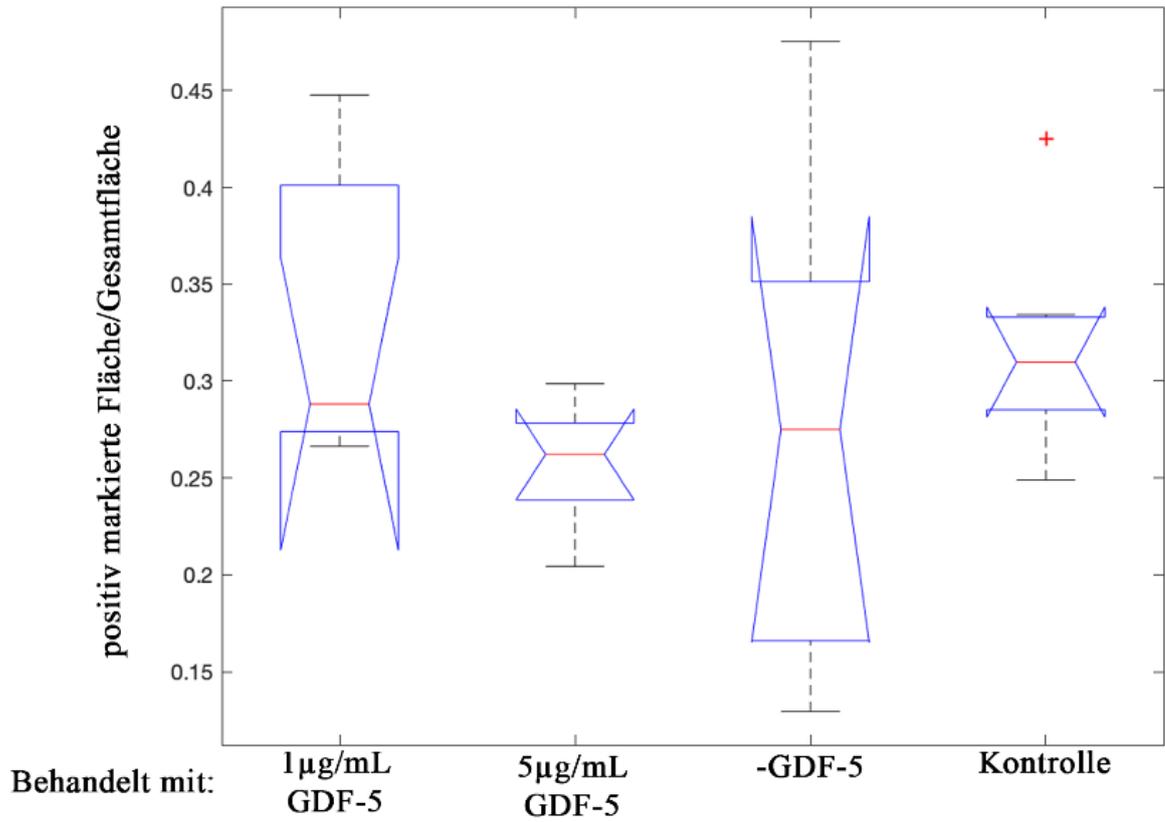
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit CD-31 gefärbten Fläche 3 Tage nach Verbrennung

CD-31 Fläche 9 Tage



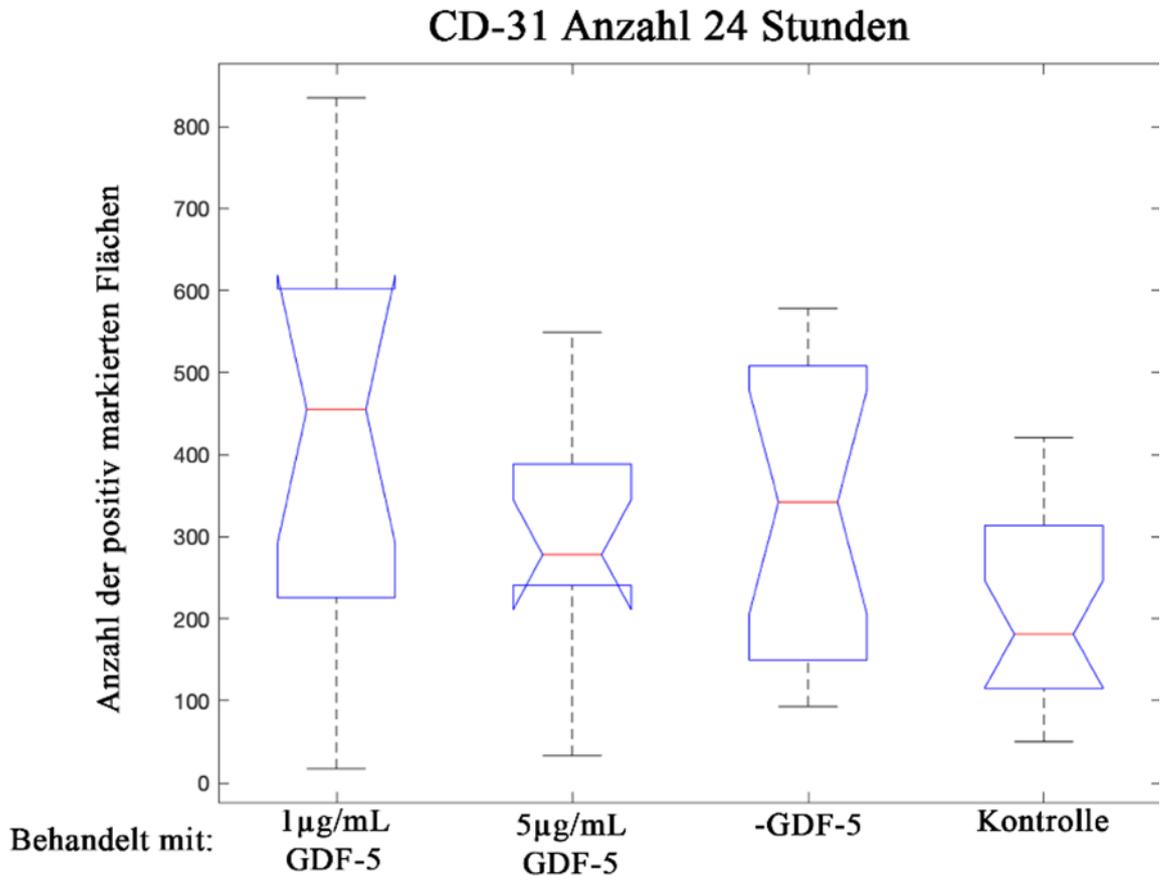
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit CD-31 gefärbten Fläche 9 Tage nach Verbrennung

CD-31 Fläche 11 Tage

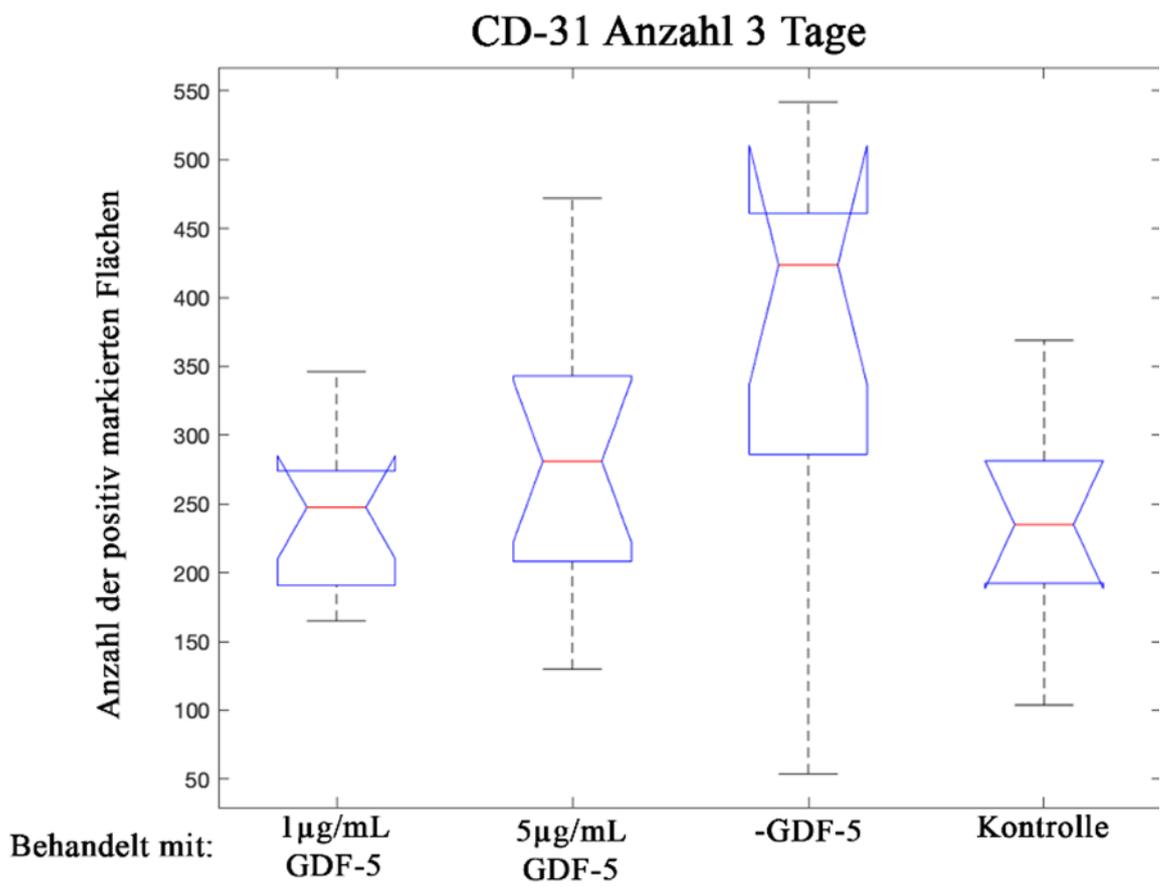


Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit CD-31 gefärbten Fläche 11 Tage nach Verbrennung

CD-31-Antikörperfärbung Anzahl:

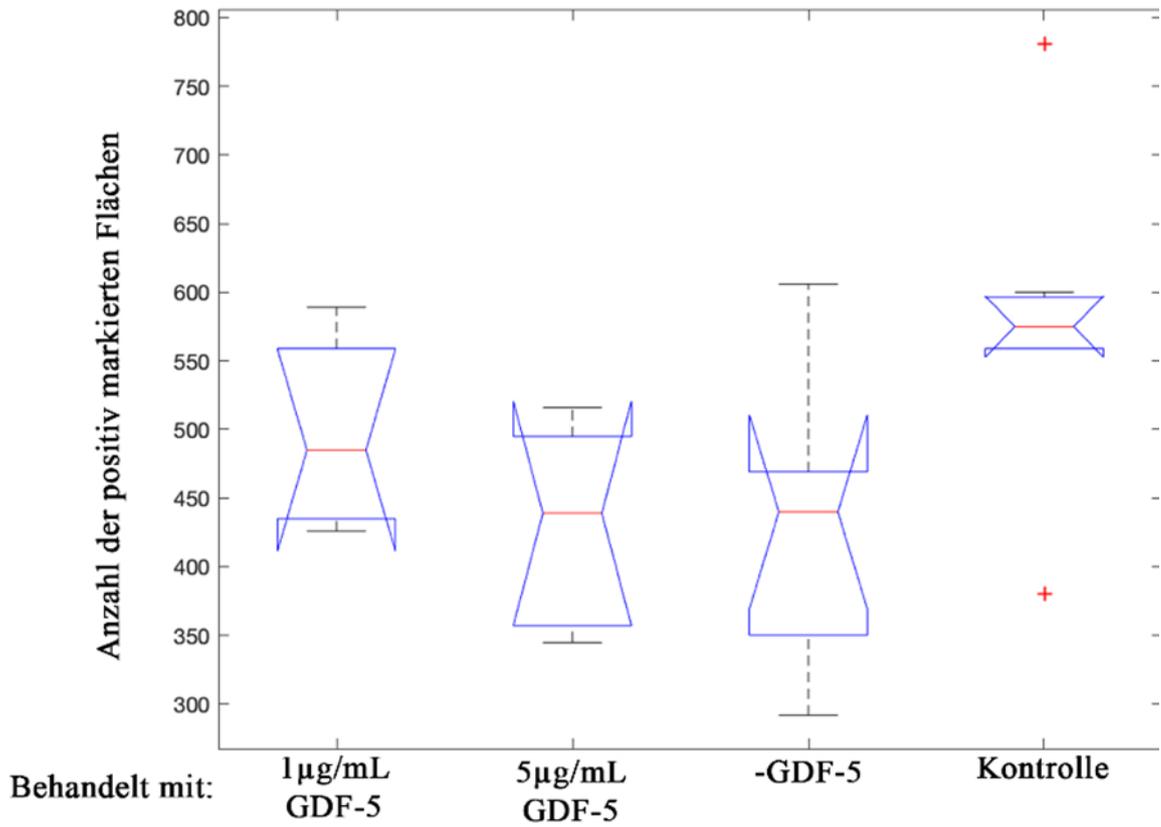


Gekerbte Boxplot-Diagramme der Anzahl der mit CD-31 gefärbten Gefäße 24 Stunden nach Verbrennung



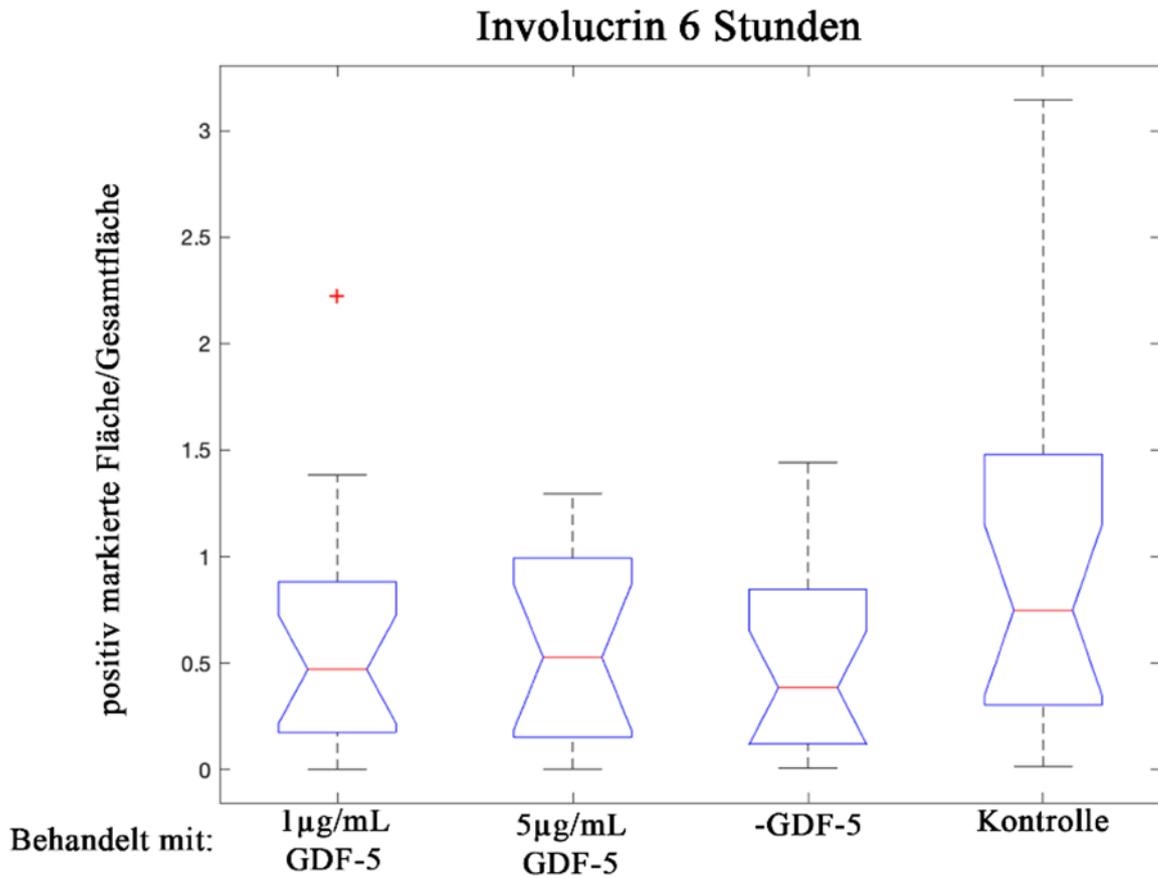
Gekerbte Boxplot-Diagramme der Anzahl der mit CD-31 gefärbten Gefäße 3 Tage nach Verbrennung

CD-31 Anzahl 11 Tage



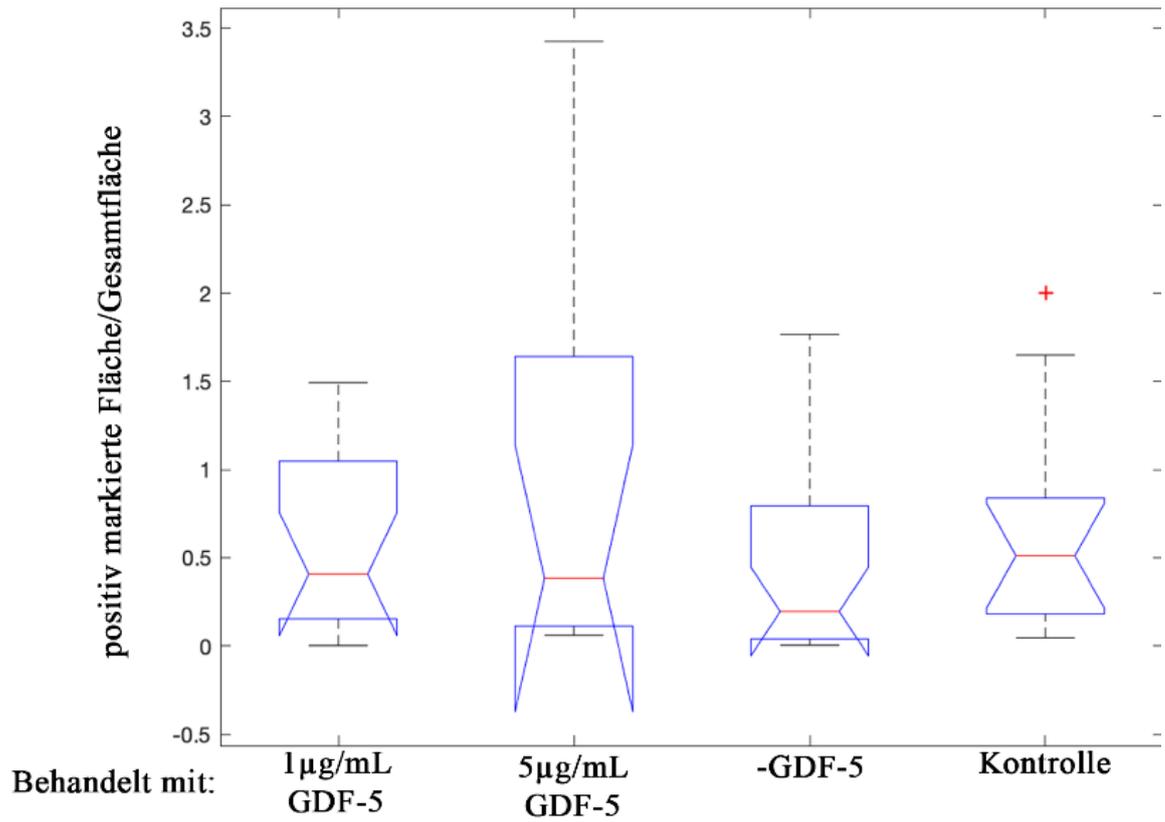
Gekerbte Boxplot-Diagramme der Anzahl der mit CD-31 gefärbten Gefäße 11 Tage nach Verbrennung

Involucrin-Antikörperfärbung:



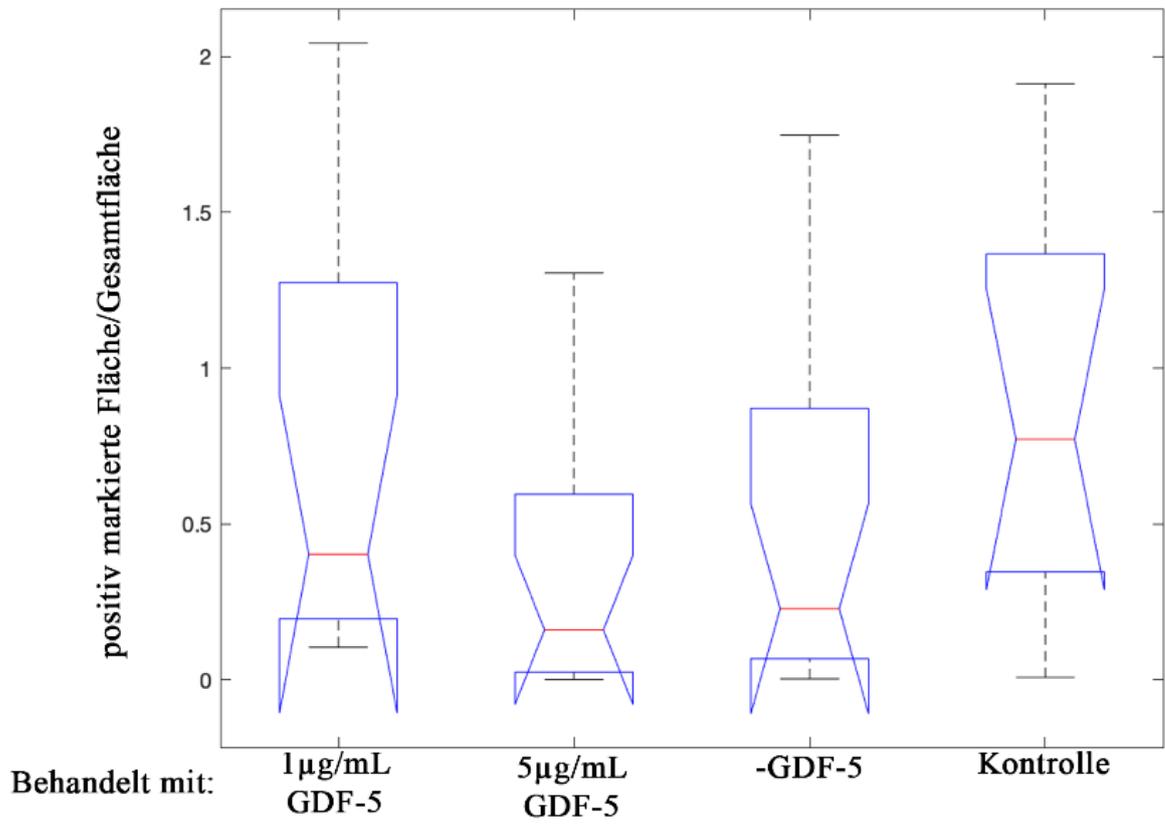
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit Involucrin gefärbten Fläche 6 Stunden nach Verbrennung

Involucrin 24 Stunden



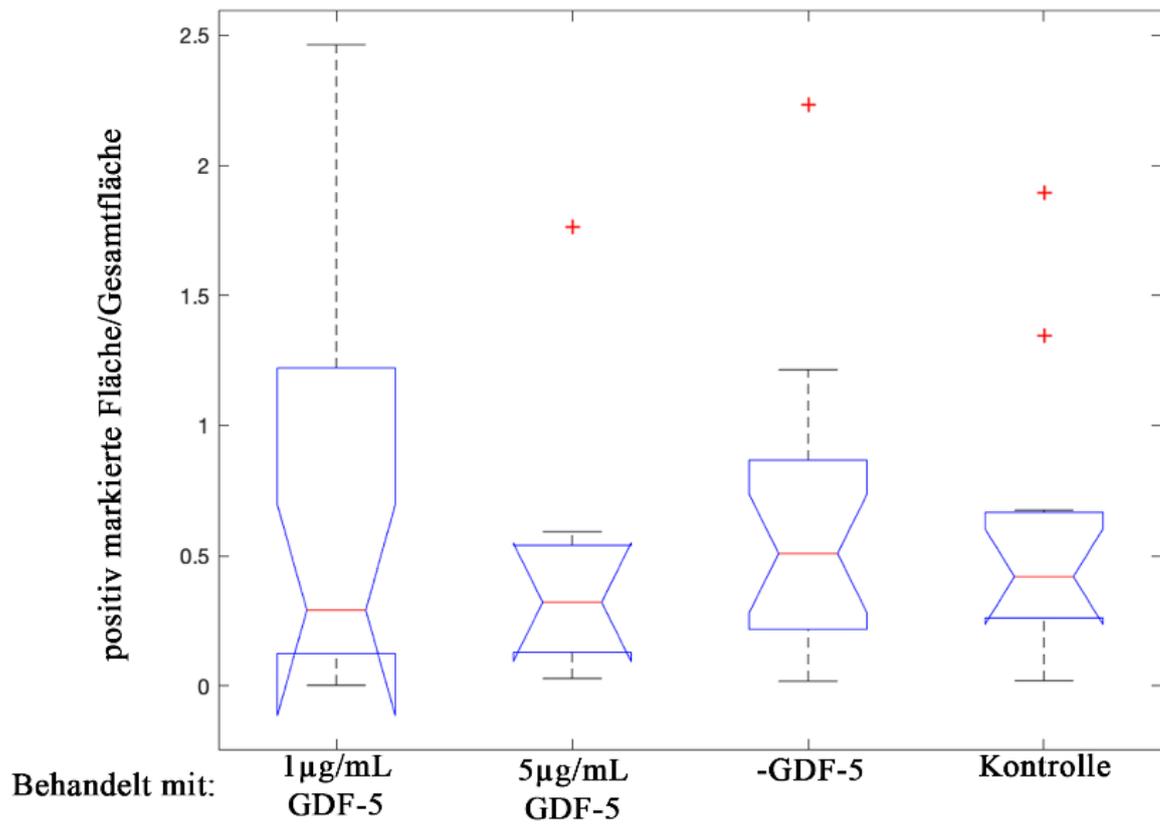
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit Involucrin gefärbten Fläche 24 Stunden nach Verbrennung

Involucrin 3 Tage

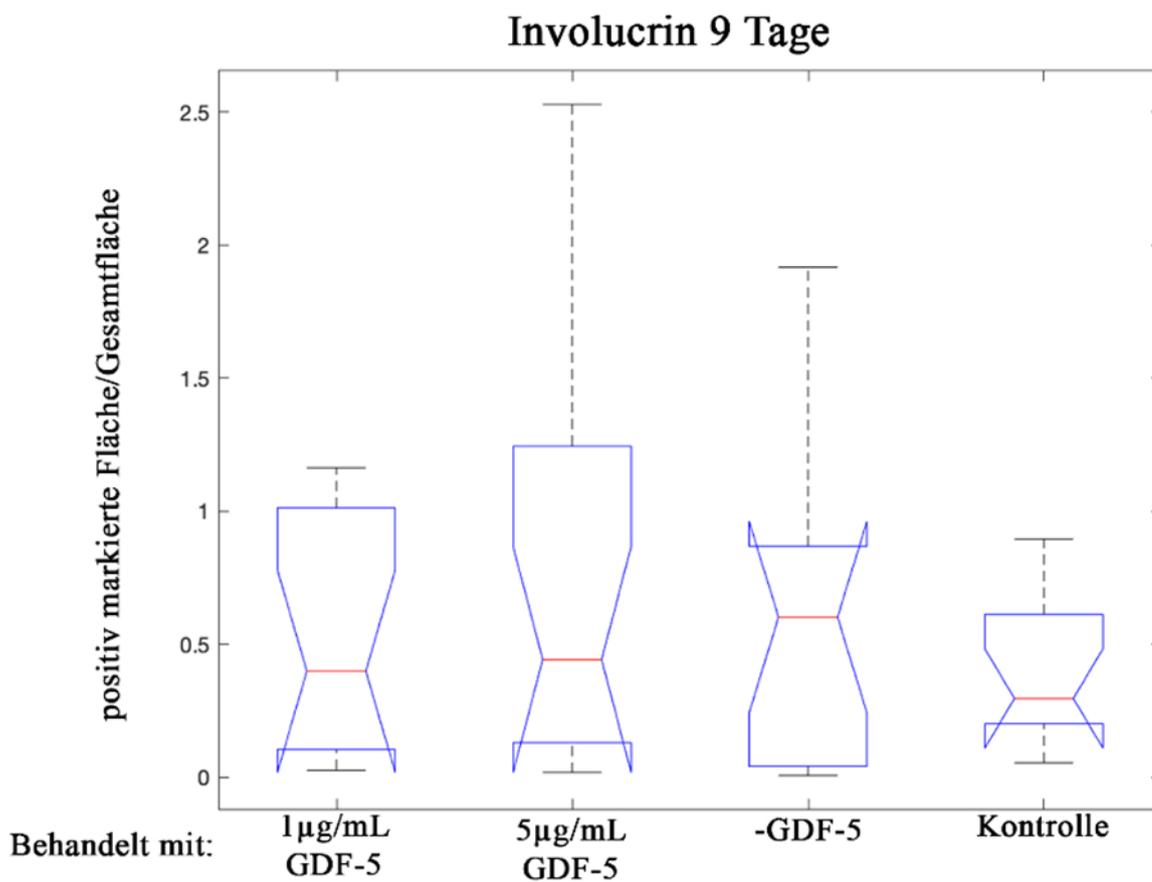


Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit Involucrin gefärbten Fläche 3 Tage nach Verbrennung

Involucrin 6 Tage

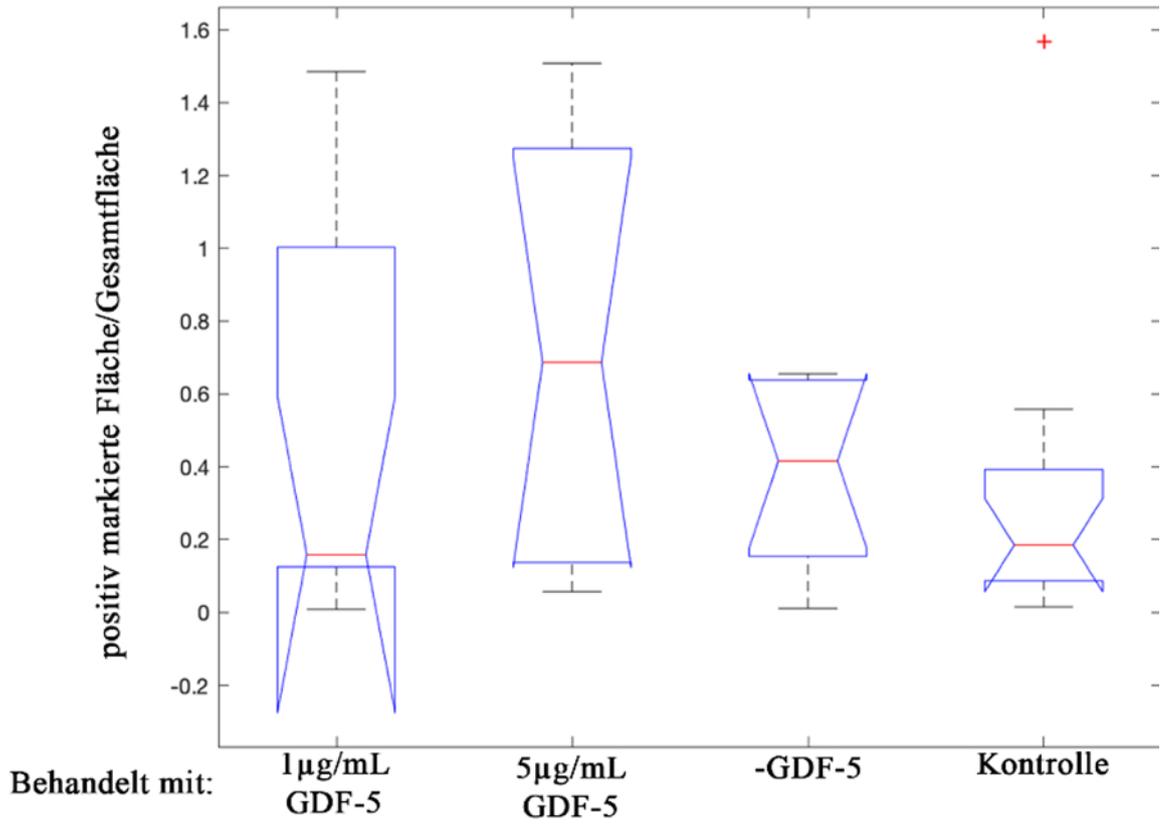


Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit Involucrin gefärbten Fläche 6 Tage nach Verbrennung



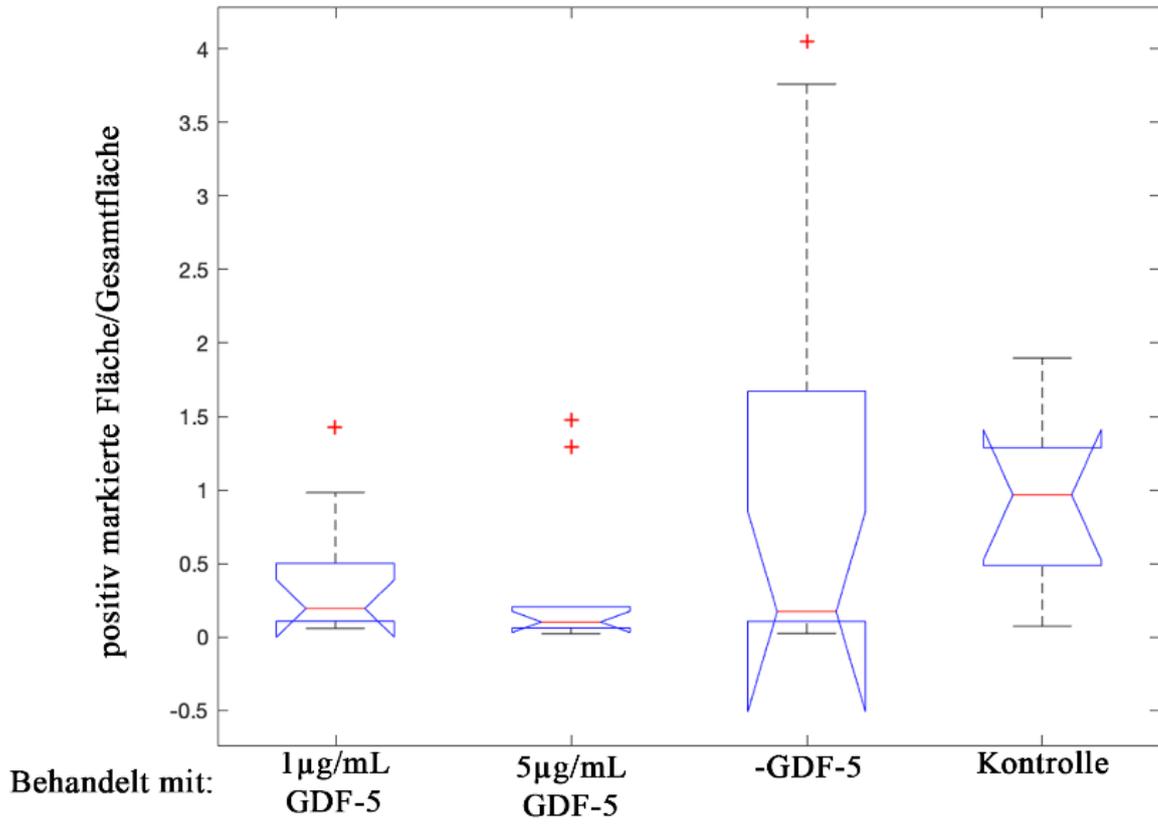
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit Involucrin gefärbten Fläche 9 Tage nach Verbrennung

Involucrin 11 Tage



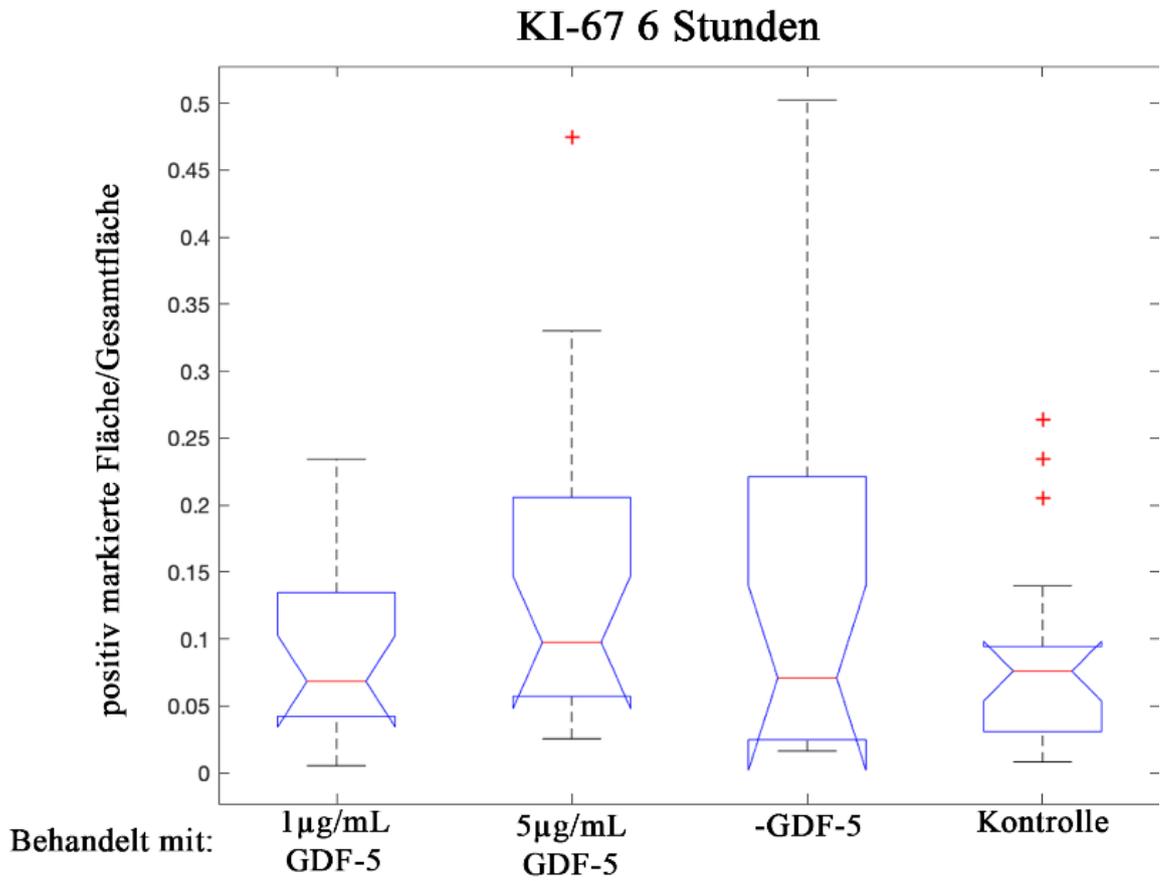
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit Involucrin gefärbten Fläche 11 Tage nach Verbrennung

Involucrin 12 Tage



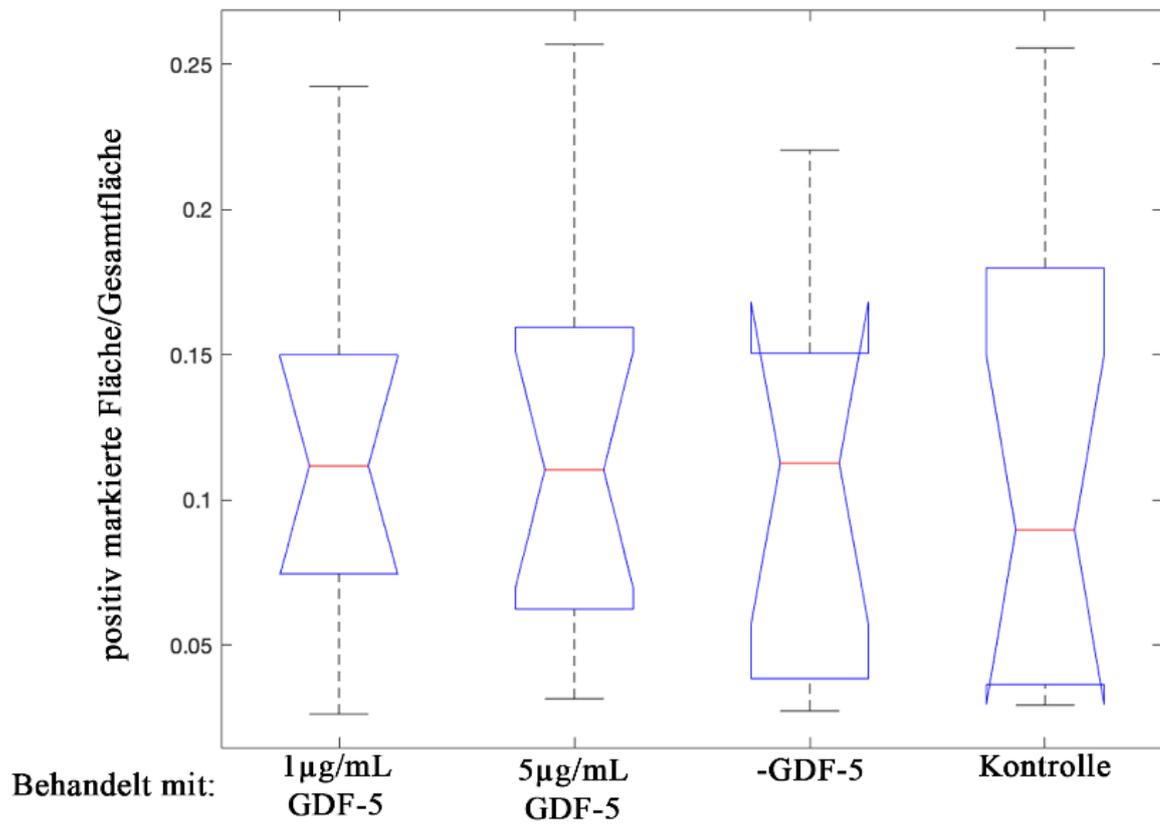
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit Involucrin gefärbten Fläche 12 Tage nach Verbrennung

KI-67-Antikörperfärbung:



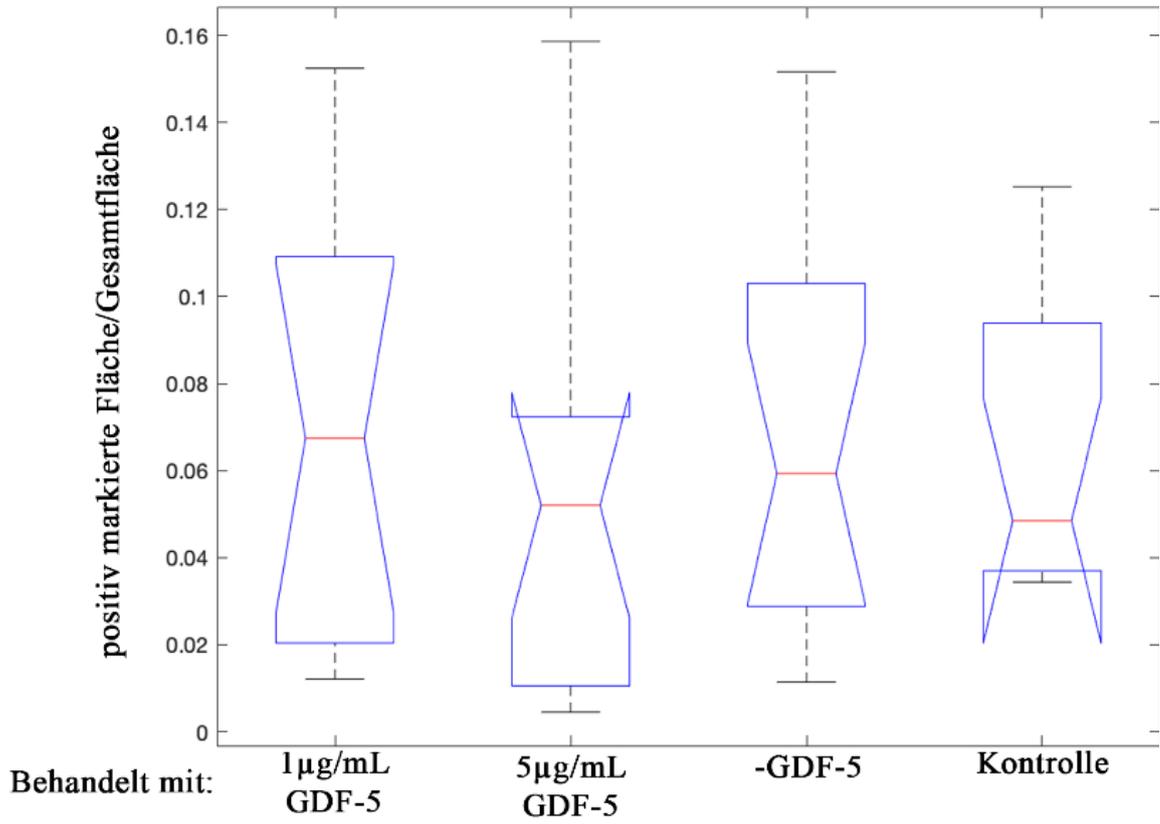
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit KI-67 gefärbten Fläche 6 Stunden nach Verbrennung

KI-67 24 Stunden



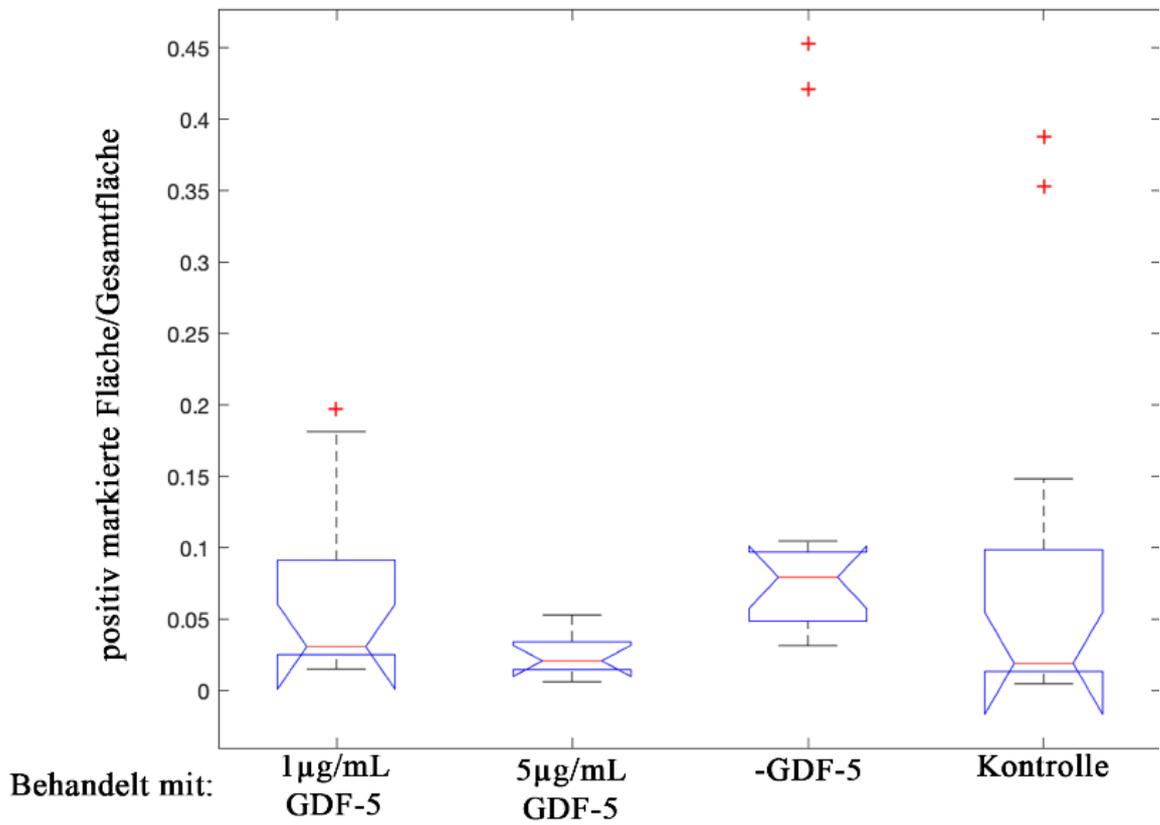
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit KI-67 gefärbten Fläche 24 Stunden nach Verbrennung

KI-67 3 Tage



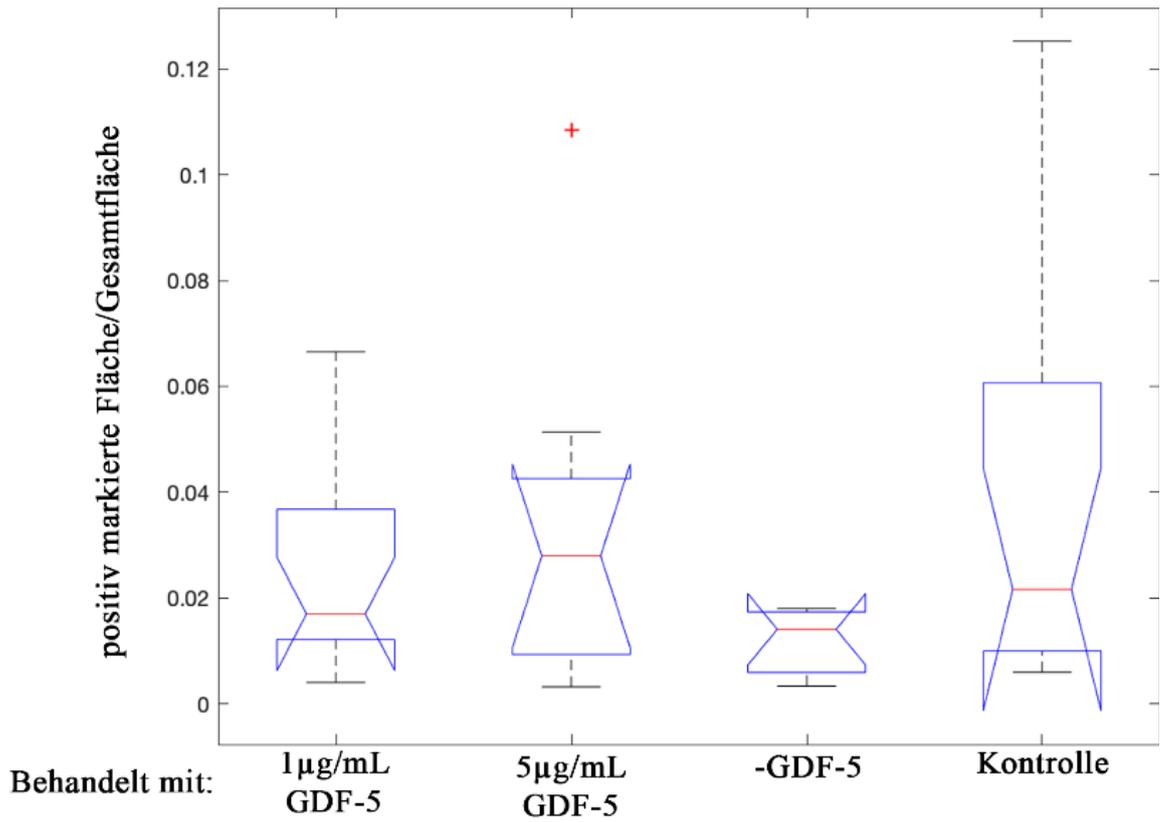
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit KI-67 gefärbten Fläche 3 Tage nach Verbrennung

KI-67 6 Tage

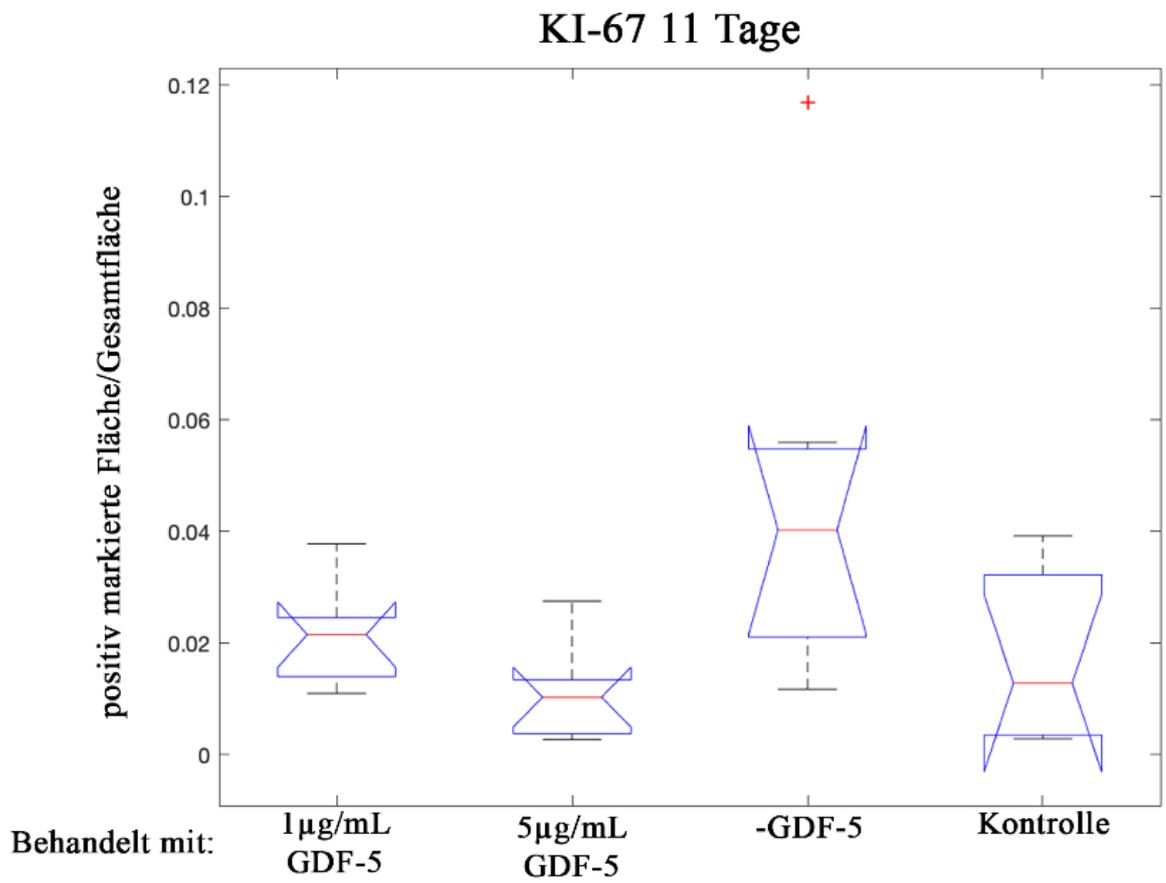


Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit KI-67 gefärbten Fläche 6 Tage nach Verbrennung

KI-67 9 Tage

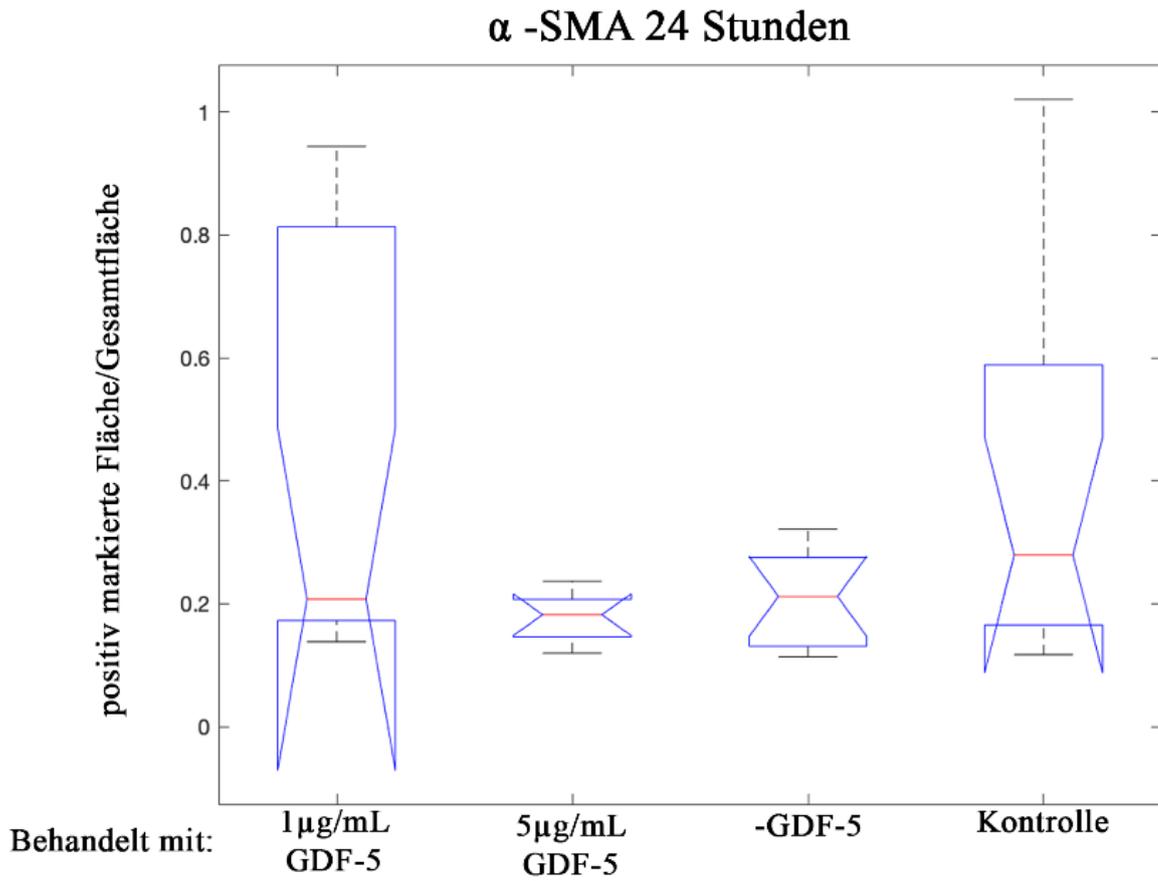


Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit KI-67 gefärbten Fläche 9 Tage nach Verbrennung

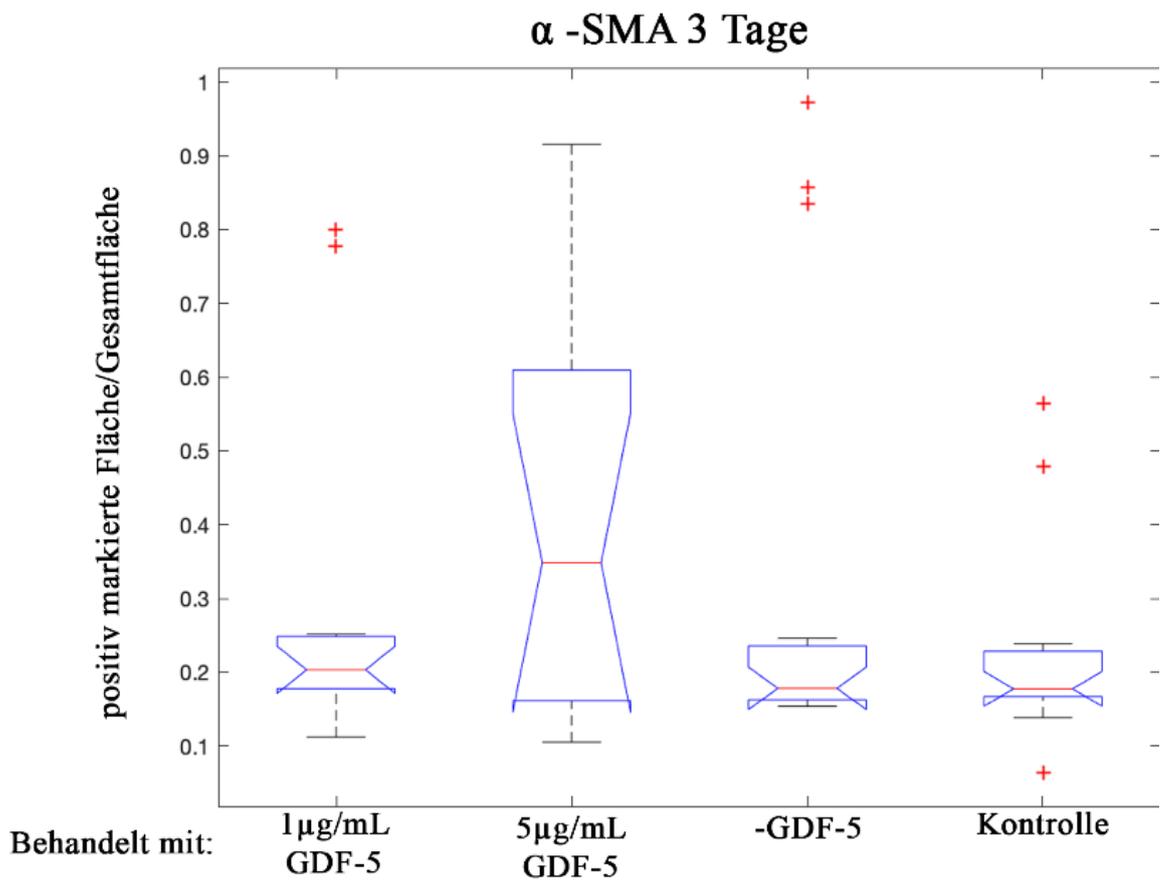


Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit KI-67 gefärbten Fläche 11 Tage nach Verbrennung

α -SMA-Antikörperfärbung:

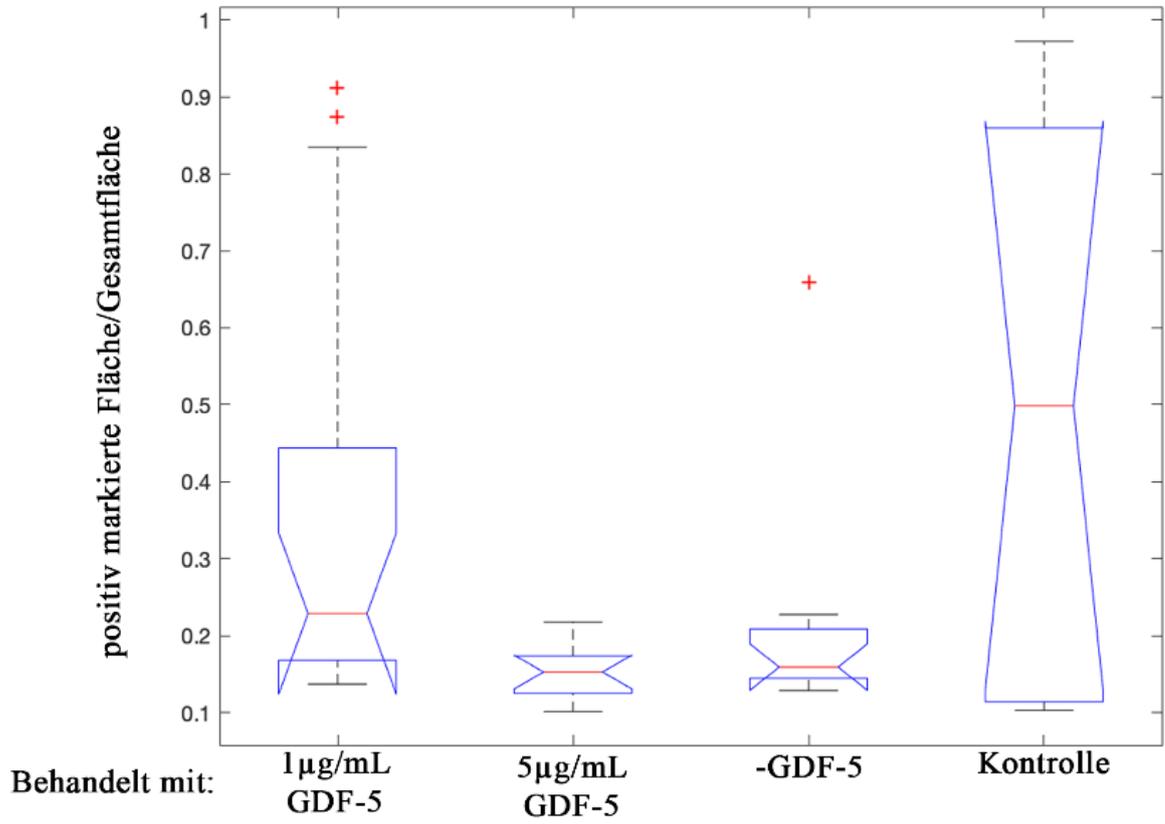


Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit α -SMA gefärbten Fläche 24 Stunden nach Verbrennung



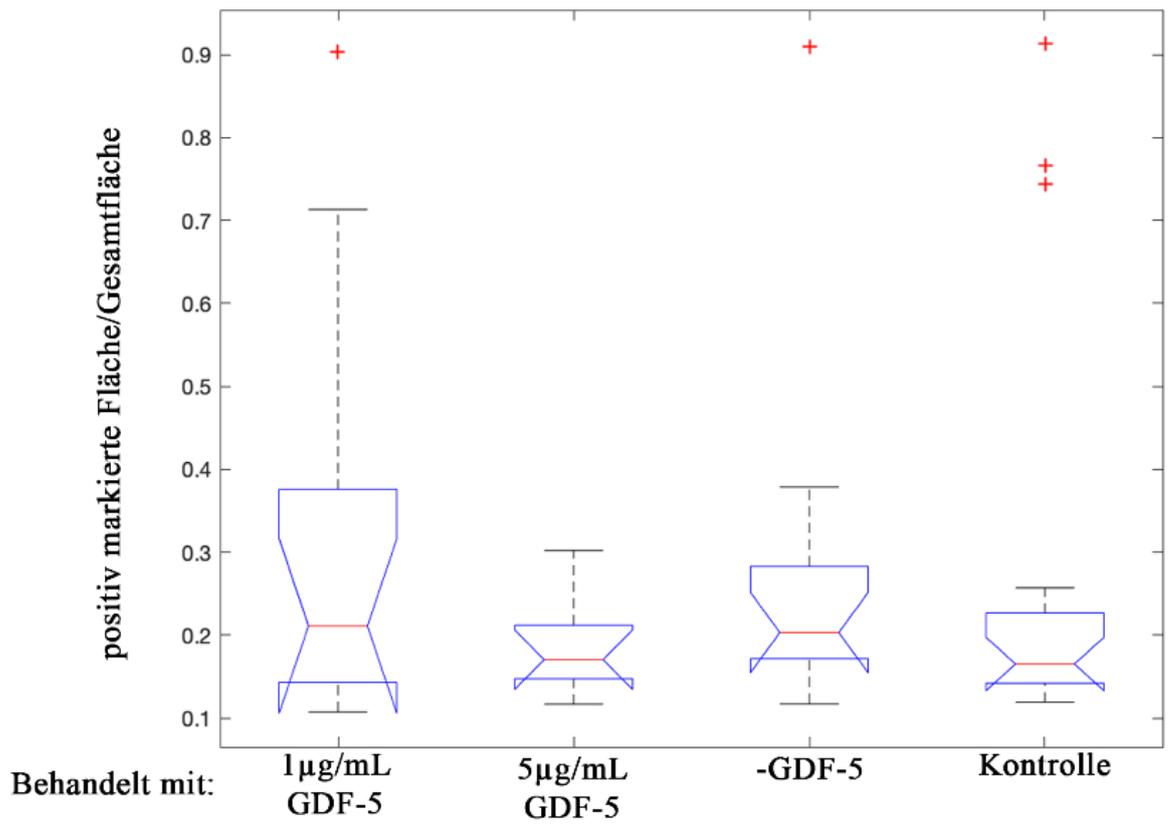
Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit α -SMA gefärbten Fläche 3 Tage nach Verbrennung

α -SMA 6 Tage

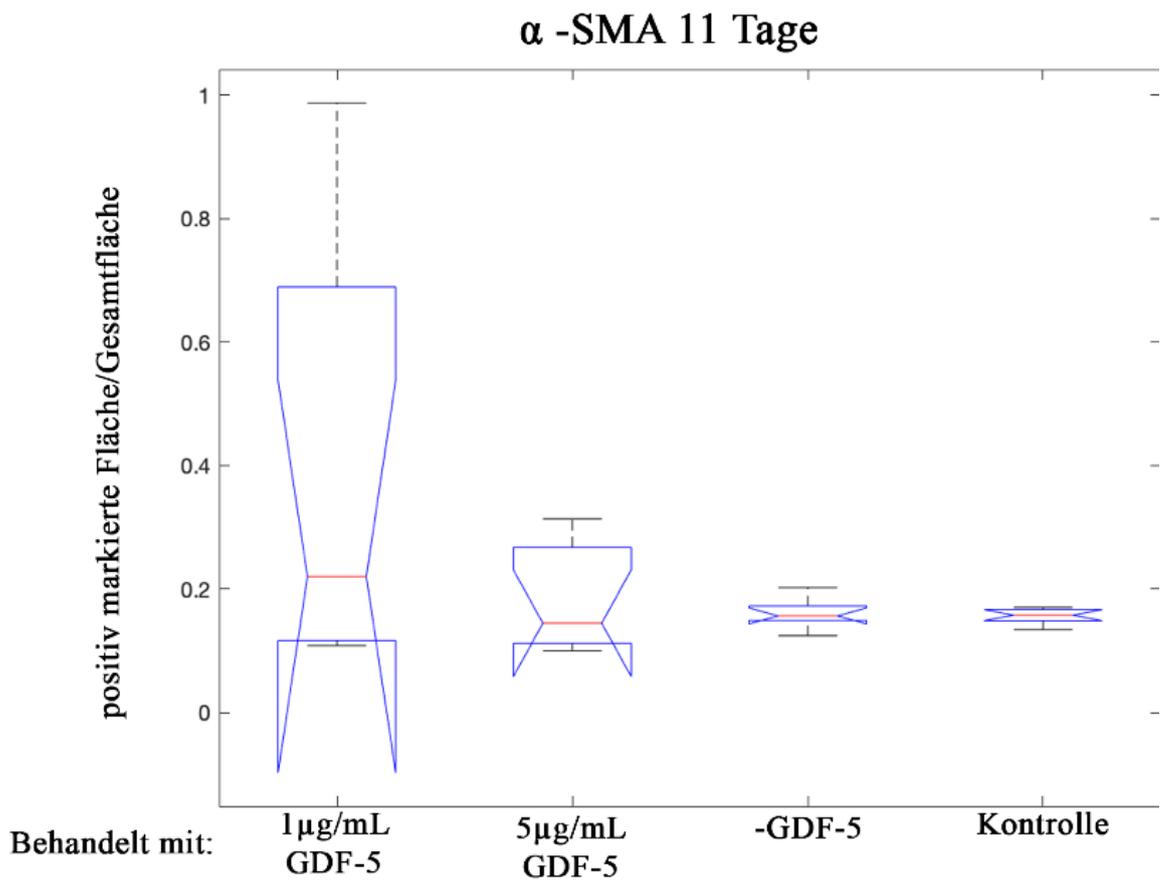


Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit α -SMA gefärbten Fläche 6 Tage nach Verbrennung

α -SMA 9 Tage

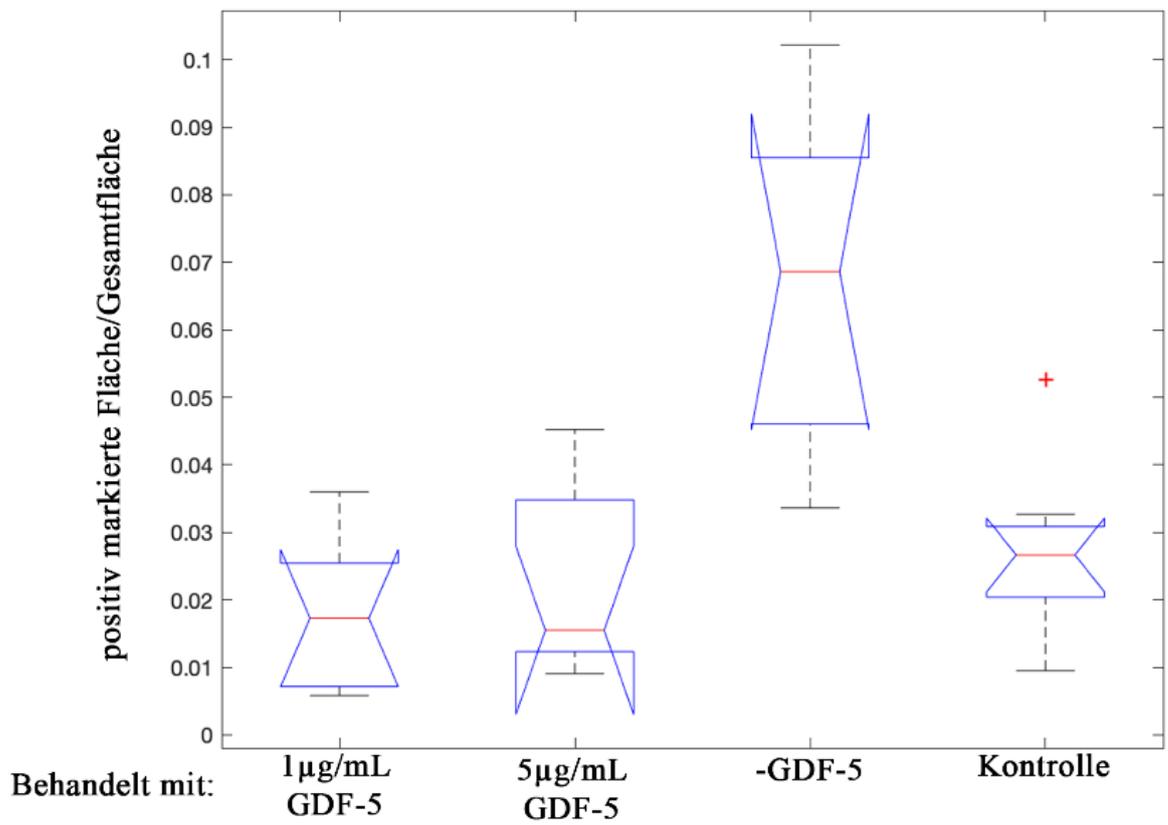


Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit α -SMA gefärbten Fläche 9 Tage nach Verbrennung



Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit α -SMA gefärbten Fläche 11 Tage nach Verbrennung

KI-67 12 Tage



Gekerbte Boxplot-Diagramme der mit α -SMA gefärbten Fläche 12 Tage nach Verbrennung

Macro zur Bearbeitung der Antikörperfärbungen als *Screenshot* in Fiji:

```
1 //@@File(label="choose CZI file", style="directory") inputDirectoryPath
2 //@@String(label="antibody", choices={"CD31", "Ki67", "Involucrin", "aSMA"}) stainedProtein
3 //@@Integer(label="min. saturation", description="minimal staining color strength, high values make it more stringent", style="slider", min=0, max=255, value=100) minSa
4 //@@Integer(label="max. brightness", description="maximum brightness in the stained area, low values make it more stringent", style="slider", min=0, max=255, value=255)
5 //@@Float(label="CD31 separation control", description="the higher the value the lower the number of object separation", style="slider", min=0.1, max=10.0, stepsize=0.1)
6 //@@Integer(label="min. stained area (pixel)", style="slider", min=0, max=50, value=5) minStainedArea
7 //@@Boolean(label="process visibly", value=false) processVisibly
8 //@@Boolean(label="close results table", value=false) closeResultsTable
9
10
11 //setup
12 setOption("BlackBackground", true);
13 run("Conversions...", "scale weighted");
14 run("Bio-Formats Macro Extensions");
15 var fileExtensionOfInterest = ".dzi";
16 var pyramidScalingFactor = 3;
17 var ki67SelectionSeries = 2;
18 var seriesCounterStart = 2;
19 var roiScalingFactor = pow(pyramidScalingFactor, (ki67SelectionSeries - seriesCounterStart));
20 var seriesCounterIncrement;
21 var finalFilesToSkip = 2;
22
23 //Section threshold
24 var sectionMin = 5; //5
25 var sectionMax = 195; //190-195
26
27 //Color Threshold parameters
28 var HueMin = 180;
29 var HueMax = 255;
30 var SatMin = minSaturation;
31 var SatMax = 255;
32 var BrightMin = 0;
33 var BrightMax = maxBrightness;
34
35 //size exclusion setup
36
37 if (!processVisibly) {
38     setBatchMode(true);
39 }
40
41 if (isOpen("Analysis")) {
42     close(".*Analysis.*");
43 }
44 processFiles(inputDirectoryPath);
45
46 if (!processVisibly) {
47     setBatchMode(false);
48 }
49
50 function processFiles(dir) {
51     fileList = getFileList(dir);
52     Table.create("Analysis");
53
54     for (file = 0; file < fileList.length; file++) {
55         currentFilePath = dir + File.separator + fileList[file];
56         Ext.isThisType(currentFilePath, supportedFileFormat);
57         if (supportedFileFormat=="true" && endsWith(currentFilePath, fileExtensionOfInterest)) {
58             Ext.setID(currentFilePath);
59             //print(currentFilePath);
60             Ext.getSeriesCount(seriesCount);
61             //print(seriesCount);
62             correctedSeriesCount = seriesCount-finalFilesToSkip;
63             if (correctedSeriesCount % 6 == 0 && correctedSeriesCount != 30) {
64                 seriesCounterIncrement = 6;
65             } else if (correctedSeriesCount % 5 == 0) {
66                 seriesCounterIncrement = 5;
67             } else if (correctedSeriesCount % 4 == 0) {
68                 seriesCounterIncrement = 4;
69             } else if (correctedSeriesCount % 3 == 0) {
70                 seriesCounterIncrement = 3;
71             }
72             //print(correctedSeriesCount);
73             for (series = seriesCounterStart; series <= correctedSeriesCount; series+=seriesCounterIncrement) {
74                 run("Bio-Formats Importer", "open=[" + currentFilePath + "] autoscale color_mode=Composite roi_import=[ROI manager] view=Hyperstack stack_order=XYZCT");
75                 bioFormats3ChannelImage=getTitle();
76                 run("RGB Color");
77                 originalRGBImageID = getImageID();
78                 originalRGBImageName = getTitle();
79                 save(currentFilePath + "_series_" + series + "_original.tif");
80                 close(bioFormats3ChannelImage);
81
82                 if (stainedProtein=="Ki67" && File.exists(currentFilePath + "_series_" + series + ".roi")) {
83                     open(currentFilePath + "_series_" + series + ".roi");
84                     selectImage(originalRGBImageID);
85                     if (selectionType() == -1) {
86                         run("Restore Selection");
87                     }
88                 }
89                 if (roiScalingFactor > 1) {
90                     run("Scale...", "x="+roiScalingFactor + " y=" + roiScalingFactor);
91                 }
92                 setForegroundColor(255, 255, 255);
93                 run("Fill");
94                 run("Select None");
95                 if (isOpen(fileList[file] + "_series_" + series + ".roi")) {
96                     close(fileList[file] + "_series_" + series + ".roi");
97                 }
98                 if (isOpen(File.separator + fileList[file] + "_series_" + series + ".roi")) {
99                     close(File.separator + fileList[file] + "_series_" + series + ".roi");
100                 }
101             }
102
103             extractFullSectionArea(originalRGBImageID, false); //fill holes is set to false to get a more realistic section area
104             extractPurpleStaining(originalRGBImageID);
105
106             if (stainedProtein=="CD31") {
107                 run("Adjustable Watershed", "tolerance=" + watershedTolerance);
108             }
109
110             analyzeStainedAreas();
111             if (isOpen("Results")) {
112                 close("Results");
113             }
114         }
115     }
116 }
```

```

116         close(originalRGBImageName);
117     }
118
119     if (isOpen("Analysis")) {
120         selectWindow("Analysis");
121         saveAs("Results", dir + File.separator + "Results_" + substring(dir, lastIndexOf(dir, File.separator)+1) + ".tsv");
122         Table.rename("Results_" + substring(dir, lastIndexOf(dir, File.separator)+1) + ".tsv", "Analysis");
123     }
124
125     } else if (endsWith(fileList[file], "/")) {
126         processFiles(substring(currentFilePath, 0, lengthOf(currentFilePath)-1));
127     }
128
129
130
131     /*
132     //for test reasons only
133     else if (endsWith(fileList[file], ".tif") && !matches(fileList[file], ".*test.*")) {
134         open(currentFilePath);
135         originalRGBImageID = getImageID();
136         originalRGBImageName = getTitle();
137         series = "test";
138         if (stainedProtein=="Ki67" && File.exists(currentFilePath + ".roi")) {
139             open(currentFilePath + "_series_" + series+1 + ".roi");
140             if (roiScalingFactor > 1) {
141                 run("Scale...", "x="+roiScalingFactor + " y=" + roiScalingFactor);
142             }
143             setForegroundColor(255, 255, 255);
144             run("Fill");
145             run("Select None");
146         }
147
148         extractFullSectionArea(originalRGBImageID, false); //fill holes is set to false to get a more realistic section area
149
150         extractPurpleStaining(originalRGBImageID);
151
152         if (stainedProtein=="CD31") {
153             run("Adjustable Watershed", "tolerance="+ watershedTolerance);
154             run("Adjustable Watershed", "tolerance="+ watershedTolerance);
155         }
156
157         analyzeStainedAreas();
158
159         close(originalRGBImageName);
160     }*/
161 }
162
163
164 if(closeResultsTable && isOpen("Analysis")) {
165     close("Analysis");
166 }
167 close("ROI Manager");
168 }
169
170
171 function extractFullSectionArea(imageID, fillHoles) {
172     selectImage(imageID);
173     run("Duplicate...", "title=[dup_"+imageID+"]");
174     fullSectionAreaImageID = getImageID();
175     fullSectionAreaImageName = getTitle();
176     run("8-bit");
177     run("Gaussian Blur...", "sigma=1.67");
178     setThreshold(sectionMin, sectionMax); //auto thresholding seems to have problems in some images
179     run("Convert to Mask");
180     if (fillHoles) {
181         run("Fill Holes");
182     }
183     roiManager("reset");
184     run("Analyze Particles...", "size=3000-Infinity pixel show=Masks clear in_situ");
185     save(currentFilePath + "_series_" + series + "_section.tif");
186     run("Make Binary");
187     run("Create Selection");
188     if (selectionType() != 1) {
189         roiManager("Add");
190         roiManager("Select", 0);
191         roiManager("Save", currentFilePath + "_series_" + series + "_section.roi");
192         run("Select None");
193     }
194     close(fullSectionAreaImageName);
195 }
196
197
198 function extractPurpleStaining(imageID) {
199     selectImage(imageID);
200
201     run("Median...", "radius=1.0");
202
203     // Color Thresholder 2.0.0-rc-69/1.52n
204     // Autogenerated macro, single images only!
205     min=newArray(3);
206     max=newArray(3);
207     filter=newArray(3);
208     a=getTitle();
209     run("HSB Stack");
210     run("Convert Stack to Images");
211     selectWindow("Hue");
212     rename("0");
213     selectWindow("Saturation");
214     rename("1");
215     selectWindow("Brightness");
216     rename("2");
217     min[0]=HueMin; //180
218     max[0]=HueMax; //255
219     filter[0]="pass";
220     min[1]=SatMin; //100
221     max[1]=SatMax; //255
222     filter[1]="pass";
223     min[2]=BrightMin; //0
224     max[2]=BrightMax; //255
225     filter[2]="pass";
226     for (i=0;i<3;i++){
227         selectWindow(""+i);
228         setThreshold(min[i], max[i]);
229         run("Convert to Mask");
230         if (filter[i]!="ston") run("Invert");

```

```

230     if (filter[i]=="stop") run("Invert");
231 }
232 imageCalculator("AND create", "0","1");
233 imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
234 for (i=0;i<3;i++){
235     selectWindow(""+i);
236     close();
237 }
238 selectWindow("Result of 0");
239 close();
240 selectWindow("Result of Result of 0");
241 rename(a);
242
243 //separate connected areas
244 /*
245 if (stainedProtein=="Ki67") {
246     run("Adjustable Watershed", "tolerance=2");
247 }
248 */
249 run("Make Binary");
250 run("Create Selection");
251 if (selecType() != -1) {
252     roiManager("Add");
253     roiManager("Select", 1);
254     roiManager("Save", currentFilePath + "_series_" + series + "_stained.roi");
255     run("Select None");
256 }
257 save(currentFilePath + "_series_" + series + "_stained.tif");
258 // Colour Thresholding-----
259 }
260 }
261
262 function analyzeStainedAreas() {
263     run("Set Measurements...", "area_fraction display redirect=None decimal=5");
264     tableSize = Table.size;
265     if (roiManager("Count")!=0) {
266         roiManager("Select", 0);
267         //run("Analyze Particles...", "size="+minStainedArea+"-Infinity pixel show=Nothing clear summarize");
268         run("Analyze Particles...", "size="+minStainedArea+"-Infinity pixel show=Masks clear in situ");

```

Macro zur Bearbeitung der Antikörperfärbungen in Textform:

//@File(label="choose CZI file", style="directory") inputDirectoryPath

//@String(label="antibody", choices={"CD31", "Ki67", "Involucrin", "aSMA"})

stainedProtein

//@Integer(label="min. saturation", description="minimal staining color strength, high values make it more stringent", style="slider", min=0, max=255, value=100) minSaturation

//@Integer(label="max. brightness", description="maximum brightness in the stained area, low values make it more stringent", style="slider", min=0, max=255, value=255) maxBrightness

//@Float(label="CD31 separation control", description="the higher the value the lower the number of object separation", style="slider", min=0.1, max=10.0, stepsize=0.1, value=2.0) watershedTolerance

//@Integer(label="min. stained area (pixel)", style="slider", min=0, max=50, value=5) minStainedArea

//@Boolean(label="process visibly", value=false) processVisibly

//@Boolean(label="close results table", value=false) closeResultsTable

//setup

setOption("BlackBackground", true);

run("Conversions...", "scale weighted");

run("Bio-Formats Macro Extensions");

```

var fileExtensionOfInterest = ".czi";
var pyramidScalingFactor = 3;
var ki67SelectionSeries = 2;
var seriesCounterStart = 2;
var roiScalingFactor = pow(pyramidScalingFactor, (ki67SelectionSeries - seriesCounterStart));
var seriesCounterIncrement;
var finalFilesToSkip = 2;

//Section threshold
var sectionMin = 5;           //5
var sectionMax = 195;       //190-195

//Color Threshold parameters
var HueMin = 180;
var HueMax = 255;
var SatMin = minSaturation;
var SatMax = 255;
var BrightMin = 0;
var BrightMax = maxBrightness;

//size exclusion setup

if (!processVisibly) {
    setBatchMode(true);
}

if (isOpen("Analysis")) {
    close(".*Analysis.*");
}
processFiles(inputDirectoryPath);

if (!processVisibly) {
    setBatchMode(false);
}

```

```

function processFiles(dir) {

    fileList = getFileList(dir);
    Table.create("Analysis");

    for (file = 0; file < fileList.length; file++) {
        currentFilePath = dir + File.separator + fileList[file];
        Ext.isThisType(currentFilePath, supportedFileFormat);
        if (supportedFileFormat=="true" && endsWith(currentFilePath, fileExtension-
OfInterest)) {
            Ext.setId(currentFilePath);
                //print(currentFilePath);
            Ext.getSeriesCount(seriesCount);
                //print(seriesCount);
            correctedSeriesCount = seriesCount-finalFilesToSkip;
            if (correctedSeriesCount % 6 == 0 && correctedSeriesCount != 30) {
                seriesCounterIncrement = 6;
            } else if (correctedSeriesCount % 5 == 0) {
                seriesCounterIncrement = 5;
            } else if (correctedSeriesCount % 4 == 0) {
                seriesCounterIncrement = 4;
            } else if (correctedSeriesCount % 3 == 0) {
                seriesCounterIncrement = 3;
            }
                //print(correctedSeriesCount);
            for (series = seriesCounterStart; series <= correctedSeriesCount; se-
ries+=seriesCounterIncrement) {
                run("Bio-Formats Importer", "open=[" + currentFilePath + "] au-
toscale color_mode=Composite rois_import=[ROI manager] view=Hyperstack stack_or-
der=XYCZT series_"+series);
                bioFormats3ChannelImage=getTitle();
                run("RGB Color");
                originalRGBImageID = getImageID();
                originalRGBImageName = getTitle();
                save(currentFilePath + "_series_" + series + "_original.tif");
            }
        }
    }
}

```

```

close(bioFormats3ChannelImage);

if (stainedProtein=="Ki67" && File.exists(currentFilePath +
"_series_" + series + ".roi")) {
    open(currentFilePath + "_series_" + series + ".roi");
    selectImage(originalRGBImageID);
    if (selectionType() == -1) {
        run("Restore Selection");
    }
    if(roiScalingFactor > 1) {
        run("Scale... ", "x="+roiScalingFactor + " y=" +
roiScalingFactor);
    }
    setForegroundColor(255, 255, 255);
    run("Fill");
    run("Select None");
    if (isOpen(fileList[file] + "_series_" + series + ".roi")) {
        close(fileList[file] + "_series_" + series + ".roi");
    }
    if (isOpen(File.separator + fileList[file] + "_series_" + se-
ries + ".roi")) {
        close(File.separator + fileList[file] + "_series_" +
series + ".roi");
    }
}

extractFullSectionArea(originalRGBImageID, false); //fill
holes is set to false to get a more realistic section area

extractPurpleStaining(originalRGBImageID);

if (stainedProtein=="CD31") {

```

```

        run("Adjustable Watershed", "tolerance=" + watershedTolerance);
    }

    analyzeStainedAreas();
    if (isOpen("Results")) {
        close("Results");
    }
    close(originalRGBImageName);
}

if (isOpen("Analysis")) {
    selectWindow("Analysis");
    saveAs("Results", dir + File.separator + "Results_" + substring(dir, lastIndexOf(dir, File.separator)+1) + ".tsv");
    Table.rename("Results_" + substring(dir, lastIndexOf(dir, File.separator)+1) + ".tsv", "Analysis");
}

} else if (endsWith(fileList[file], "/")) {
    processFiles(substring(currentFilePath, 0, lengthOf(currentFilePath)-1));
}

/*
//for test reasons only
else if (endsWith(fileList[file], ".tif") && !matches(fileList[file], ".*test.*")) {

    open(currentFilePath);
    originalRGBImageID = getImageID();
    originalRGBImageName = getTitle();
    series = "test";
    if (stainedProtein=="Ki67" && File.exists(currentFilePath + ".roi")) {

```

```

        open(currentFilePath + "_series_" + series+1 + ".roi");
        if(roiScalingFactor > 1) {
            run("Scale... ", "x="+roiScalingFactor + " y=" + roiScal-
ingFactor);
        }
        setForegroundColor(255, 255, 255);
        run("Fill");
        run("Select None");
    }

    extractFullSectionArea(originalRGBImageID, false);    //fill holes is
set to false to get a more realistic section area

    extractPurpleStaining(originalRGBImageID);

    if (stainedProtein=="CD31") {
        run("Adjustable Watershed", "tolerance=" + watershedToler-
ance);
    }

    analyzeStainedAreas();

    close(originalRGBImageName);
}*/

}

if(closeResultsTable && isOpen("Analysis")) {
    close("Analysis");
}
close("ROI Manager");
}

```

```

function extractFullSectionArea(imageID, fillHoles) {
    selectImage(imageID);
    run("Duplicate...", "title=[dup_ "+imageID+"]");
    fullSectionAreaImageID = getImageID();
    fullSectionAreaImageName = getTitle();
    run("8-bit");
    run("Gaussian Blur...", "sigma=1.67");
    setThreshold(sectionMin, sectionMax); //auto thresholding seems to have problems in
some images
    run("Convert to Mask");
    if (fillHoles) {
        run("Fill Holes");
    }
    roiManager("reset");
    run("Analyze Particles...", "size=3000-Infinity pixel show=Masks clear in_situ");
    save(currentFilePath + "_series_" + series + "_section.tif");
    run("Make Binary");
    run("Create Selection");
    if (selectionType() != -1) {
        roiManager("Add");
        roiManager("Select", 0);
        roiManager("Save", currentFilePath + "_series_" + series + "_section.roi");
        run("Select None");
    }
    close(fullSectionAreaImageName);
}

```

```

function extractPurpleStaining(imageID) {
    selectImage(imageID);

    run("Median...", "radius=1.0");

    // Color Thresholder 2.0.0-rc-69/1.52n
    // Autogenerated macro, single images only!

```

```

min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=HueMin;    //180
max[0]=HueMax;    //255
filter[0]="pass";
min[1]=SatMin;    //100
max[1]=SatMax;    //255
filter[1]="pass";
min[2]=BrightMin; //0
max[2]=BrightMax; //255
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();

```

```

selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);

//separate connected areas
/*
if (stainedProtein=="Ki67") {
    run("Adjustable Watershed", "tolerance=2");
}
*/
run("Make Binary");
run("Create Selection");
if (selectionType() != -1) {
    roiManager("Add");
    roiManager("Select", 1);
    roiManager("Save", currentFilePath + "_series_" + series + "_stained.roi");
    run("Select None");
}
save(currentFilePath + "_series_" + series + "_stained.tif");
// Colour Thresholding-----
}

function analyzeStainedAreas() {
    run("Set Measurements...", "area_fraction display redirect=None decimal=5");
    tableSize = Table.size;
    if (roiManager("Count")!=0) {
        roiManager("Select", 0);
        //run("Analyze Particles...", "size="+minStainedArea+"-Infinity pixel
show=Nothing clear summarize");
        run("Analyze Particles...", "size="+minStainedArea+"-Infinity pixel
show=Masks clear in_situ");
        selectWindow("Analysis");
        Table.set("Image", tableSize, originalRGBImageName);
        if (stainedProtein=="CD31") {
            Table.set("Count", tableSize, nResults);

```

```

    }
    Table.set("%Area", tableSize, getValue("%Area"));
} else {
    selectWindow("Analysis");
    Table.set("Image", tableSize, originalRGBImageName);
    Table.set("%Area", tableSize, "no section detected");
}
Table.set("Hue", tableSize, HueMin);
Table.set("SatMin", tableSize, minSaturation);
Table.set("BrightMax", tableSize, maxBrightness);
Table.set("MinExcSize", tableSize, minStainedArea);
Table.update;
roiManager("reset");
}

```

Macro zum Ausschneiden der falsch positiven Bereiche der KI-67-Antikörperfärbung als *Screenshot* in Fiji:

```

1 //@File(label="choose CZI file", style="directory") inputDirectoryPath
2
3 //setup
4 run("Bio-Formats Macro Extensions");
5
6 //global variables
7 var fileExtensionOfInterest = ".czi";
8 var seriesCounterStart = 2;
9 var seriesCounterIncrement;
10 var finalFilesToSkip = 2;
11
12 setTool("rotract");
13 processBioFormatFiles(inputDirectoryPath);
14 setTool("rectangle");
15
16
17
18
19 function processBioFormatFiles(currentDirectory) {
20
21     fileList = getFileList(currentDirectory);
22
23     for (file = 0; file < fileList.length; file++) {
24         currentFilePath = currentDirectory + File.separator + fileList[file];
25         Ext.isThisType(currentFilePath, supportedFileFormat);
26         if (supportedFileFormat=="true" && endsWith(currentFilePath, fileExtensionOfInterest)) {
27             Ext.setId(currentFilePath);
28             //print(currentFilePath);
29             Ext.getSeriesCount(seriesCount);
30             //print(seriesCount);
31             correctedSeriesCount = seriesCount-finalFilesToSkip;
32             if (correctedSeriesCount % 6 == 0 && correctedSeriesCount != 30) {
33                 seriesCounterIncrement = 6;
34             } else if (correctedSeriesCount % 5 == 0) {
35                 seriesCounterIncrement = 5;
36             } else if (correctedSeriesCount % 4 == 0) {
37                 seriesCounterIncrement = 4;
38             } else if (correctedSeriesCount % 3 == 0) {
39                 seriesCounterIncrement = 3;

```

```

39     seriesCounterIncrement = 3;
40 }
41 //print(correctedSeriesCount);
42 for (series = seriesCounterStart; series <= correctedSeriesCount; series+=seriesCounterIncrement) {
43     run("Bio-Formats Importer", "open=[" + currentFilePath + "] autoscale color_mode=Composite rois_import=[ROI manager] view=Hyperstack stack_order=XYC
44     roiFilePath = currentFilePath + "_series_" + series + ".roi";
45     setROI(roiFilePath);
46     close();
47 }
48 } else if (endsWith(fileList[file], ".")) {
49     processBioFormatFiles(currentDirectory + File.separator + fileList[file]);
50 }
51 }
52 }
53
54
55 function setROI(filePathToSaveROI) {
56     /*
57     while (selectionType()<=-1) {
58     }
59     */
60
61     waitForUser("please set a ROI for the region\nwhich should not be analyzed and press OK");
62     if (selectionType()<=-1) {
63         roiManager("Add");
64         roiManager("select", 0);
65         roiManager("save", filePathToSaveROI);
66         close("ROI Manager");
67     }
68 }

```

Macro zum Ausschneiden der falsch positiven Bereiche der KI-67-Antikörperfärbung als *Screenshot* in Textform:

```
//@File(label="choose CZI file", style="directory") inputDirectoryPath
```

```
//setup
```

```
run("Bio-Formats Macro Extensions");
```

```
//global variables
```

```
var fileExtensionOfInterest = ".czi";
```

```
var seriesCounterStart = 2;
```

```
var seriesCounterIncrement;
```

```
var finalFilesToSkip = 2;
```

```
setTool("rotrect");
```

```
processBioFormatFiles(inputDirectoryPath);
```

```
setTool("rectangle");
```

```
function processBioFormatFiles(currentDirectory) {
```

```
    fileList = getFileList(currentDirectory);
```

```

for (file = 0; file < fileList.length; file++) {
    currentFilePath = currentDirectory + File.separator + fileList[file];
    Ext.isThisType(currentFilePath, supportedFileFormat);
    if (supportedFileFormat=="true" && endsWith(currentFilePath, fileExtension-
OfInterest)) {
        Ext.setId(currentFilePath);
        //print(currentFilePath);
        Ext.getSeriesCount(seriesCount);
        //print(seriesCount);
        correctedSeriesCount = seriesCount-finalFilesToSkip;
        if (correctedSeriesCount % 6 == 0 && correctedSeriesCount != 30) {
            seriesCounterIncrement = 6;
        } else if (correctedSeriesCount % 5 == 0) {
            seriesCounterIncrement = 5;
        } else if (correctedSeriesCount % 4 == 0) {
            seriesCounterIncrement = 4;
        } else if (correctedSeriesCount % 3 == 0) {
            seriesCounterIncrement = 3;
        }
        //print(correctedSeriesCount);
        for (series = seriesCounterStart; series <= correctedSeriesCount; se-
ries+=seriesCounterIncrement) {
            run("Bio-Formats Importer", "open=[" + currentFilePath + "] au-
toscale color_mode=Composite rois_import=[ROI manager] view=Hyperstack stack_or-
der=XYCZT series_"+series);
            roiFilePath = currentFilePath + "_series_" + series + ".roi";
            setROI(roiFilePath);
            close();
        }
    } else if (endsWith(fileList[file], ".")) {
        processBioFormatFiles(currentDirectory + File.separator +
fileList[file]);
    }
}
}

```

```
}
```

```
function setROI(filePathToSaveROI) {
```

```
    /*
```

```
    while (selectionType()===-1) {
```

```
    }
```

```
    */
```

```
    waitForUser("please set a ROI for the region\nwhich should not be analyzed and press  
Ok");
```

```
    if (selectionType()!==-1) {
```

```
        roiManager("Add");
```

```
        roiManager("select", 0);
```

```
        roiManager("save", filePathToSaveROI);
```

```
        close("ROI Manager");
```

```
    }
```

```
}
```


Danksagung:

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Suschek, für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation, aber auch für seine freundschaftliche und verständnisvolle Art, welche die Zusammenarbeit sehr angenehm machte.

Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Schiefer, die durch die Else Kröner Fresenius Stiftung die Finanzierung meiner Arbeit ermöglichte. Somit gilt auch der Else Kröner Fresenius Stiftung mein äußerster Dank für die großzügige Finanzierung und die Ermöglichung meines Projektes.

Danken möchte ich auch Jutta Schneider, welche sich als medizinisch-technische Assistentin unseres Labors (auch außerhalb ihrer regulären Arbeitszeiten) für die Realisierung meiner Methodik sehr einsetzte.

Auch möchte ich mich bei dem Institut für Anatomie I der Heinrich-Heine-Universität, allen Voran bei Herrn Prof. Dr. Filler und Frau Paas, bedanken.

Darüber hinaus danke ich Somayah Maleki Balajoo für die große Unterstützung bei meiner statistischen Auswertung herzlich.

Zudem möchte ich meinem Lebenspartner, Jonas Schulte, herzlich danken, der nicht nur Emotionalitäten während des Projekts ertragen musste, sondern wenn möglich, auch zur Vollendung der Arbeit mit half.

Ich möchte meiner Mutter, Anca Eugenia Oprisch, danken, die mir als Informatikerin bei technischen Hindernissen stets zur Seite stand und somit wesentlich zur Vollendung meiner Dissertation beitrug. Außerdem danke ich meiner Schwester, Helga Aurelia Oprisch, die mich trotz ihres fehlenden medizinischen Fachwissens bei meiner Dissertation unterstützte.

Zum Schluss möchte ich noch meine gute Freundin, Melanie Cappallo, erwähnen, die mir ihre wissenschaftliche Expertise unermüdlich zur Verfügung stellte, auch wenn sie selbst aufgrund ihrer Masterarbeit zeitlich sehr eingebunden war. Da dies keine Selbstverständlichkeit ist, gilt ihr besonders großen Dank.