

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

**Experimentelle Untersuchung protektiver Faktoren nach
Verbrennungstraumata**
Ein In – vitro Versuch mit Keratinozyten

Dissertation

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

vorgelegt von
Serhat Macar
2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Zusammenfassung

Jedes Jahr sterben weltweit etwa 300 000 Menschen an den Folgen von Verbrennungstraumata. Die Zahl derjenigen, die Verbrennungen erleiden und mit den somatischen, psychischen, sozialen und ökonomischen Restriktionen konfrontiert sind, überschreitet die Millionen. Nach wie vor können mit präventiven Maßnahmen nicht die gewünschten Ziele erreicht werden, so dass neben der Erweiterung der Informations- und Präventionsstrategien zur Bekämpfung der Verbrennungsursache auch eine Fortentwicklung der Behandlungskonzepte Gegenstand aktueller Forschung ist, denn besonders großflächige und tiefe thermische Schädigungen werden mit schlecht heilenden Wunden, starken Schmerzen und einer reduzierten Lebensqualität assoziiert. Auf zellulärer Ebene führen Verbrennungen zu unterschiedlich stark geschädigten Zellen. Die sogenannte Stasezone enthält vitale und avitale Zellen, wobei die vital gefährdeten Zellen im Laufe von Stunden und Tagen in eine Nekrose und eine Apoptose übergehen können. Vor diesem Rahmen sollen die Apoptoseinhibitoren GDF-5 und QVD als protektive Faktoren nach Verbrennungstraumata charakterisiert werden.

In zwölf 24-Well-Platten werden in die zentralen sechs Wells 50 000 Keratinozyten in 0,5 ml Keratinozytenmedium ausplattiert. Dabei dienen sechs 24-Well-Platten als Kontroll- und die anderen sechs als Untersuchungsgruppe. Alle Platten werden zur Zelladhäsion bei 37 °C für 24 Stunden im Brutkasten inkubiert. Nach 20 Stunden, demnach 4 Stunden vor dem Versuch, wird der Heizblock auf eine Betriebstemperatur von 80 °C erhitzt. Nach 24 Stunden der Inkubation wird die Zelladhäsion kontrolliert. Aus den zentralen sechs Wells aller Platten wird nun bis auf 0,1 ml Medium alles abgesaugt. Anschließend erfolgt die thermische Schädigung der Keratinozyten durch Erhitzen der Untersuchungsplatten für 10 Sekunden auf dem Heizblock. Unmittelbar danach werden die erhitzten Platten im Eisbad für 20 Sekunden abgekühlt. In die sechs zentralen Wells aller Platten werden 0,4 ml Keratinozytenmedium pipettiert. Sodann werden alle Platten für eine Stunde inkubiert. Nach einer weiteren Stunde werden in jeweils drei Wells aller Probepplatten die Apoptoseinhibitoren GDF-5 und QVD hinzugegeben. Nach 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden erfolgt die Messung der Zellzahl jeweils einer Kontroll- und einer Untersuchungsplatte im Vergleich mit Hilfe des CellTiter-Blue®-Assays. Nach 96 Stunden zeigen die Keratinozyten, die eine Stunde nach der thermischen Schädigung mit GDF-5 behandelt wurden, keine signifikant reduzierte Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Des Weiteren ist die Wirkung des sogenannten Nachbrenneffektes im Vergleich zur Vergleichsgruppe mit QVD deutlich reduziert. Keratinozyten, die eine Stunde nach der thermischen Schädigung mit dem Apoptoseinhibitor QVD behandelt wurden, weisen eine signifikant geringere Zellzahl auf als die Kontrollgruppe.

Der Apoptoseinhibitor GDF-5 scheint ein vielversprechender protektiver und regenerativer Faktor nach Verbrennungstraumata zu sein, der womöglich neue Ansätze in aktuellen Behandlungskonzepten etablieren könnte. Weitere Forschung an anderen Zelltypen, der humanen Dermis oder an Patienten mit Verbrennungsverletzungen ist in Zukunft jedoch erforderlich.

Abstract

Worldwide around 300 000 people die each year after burn injuries. The number of those who suffers from somatic, psychological, social and economic restrictions after burn injuries exceeds the millions. Preventive measures still do not achieve the desired objectives, so that in addition to the extension of information and prevention strategies to combat the cause of incineration, research constantly tries update treatment concepts since especially large-scale and deep thermal damage is associated with poorly healing wounds, severe pain and a reduced quality of life. At the cellular level burns lead to different degrees of damaged cells. The so called stasezone contains vital and avital cells, whereby the vitally endangered cells can pass into necrosis and apoptosis within hours and days. Against this background, the apoptosis inhibitors Growth Differentiation Factor 5 and QVD should be characterized as protective factors after combustion trauma.

On twelve 24-well-plates 50 000 keratinocytes were plated into the central six wells in 0,5 ml keratinocyte medium. Six 24-well-plates served as test group and the other six served as control. All plates were incubated for cell adhesion at 37 °C for 24 hours. After 20 hours, i.e. four hours before the test, a heating block was heated to an operating temperature of 80 °C. After 24 hours of incubation the cell adhesion was controlled. From the central six wells of all plates everything was extracted up to 0,1 ml of medium. Subsequently, the thermal damage to the keratinocytes was carried out by heating the test plates for ten seconds on the heating block. Immediately afterwards the heated plates were cooled for 20 seconds in the ice bath. In the six central wells of all plates 0,4 ml keratinocyte medium was pipetted and all plates were incubated for one additional hour. After a further hour the apoptosis inhibitors GDF-5 and QVD were added in three wells of each test plate. After 1, 4, 24, 48, 72 and 96 hours, the cell viability of each test and control plate was measured in comparison with the CellTiterBlue assay.

After 96 hours the keratinocytes treated with GDF-5 one hour after thermal damage showed significantly increased cell viability compared to the control group. Furthermore, the effect of the so called "afterburn" was significantly reduced compared to the control group. Keratinocytes treated with the apoptosis inhibitor QVD one hour after thermal damage showed no differences compared to the control.

The apoptosis inhibitor GDF-5 seems to be a promising protective and regenerative factor after combustion trauma, which could possibly establish new approaches in current treatment concepts. However, further research on other cell types, human dermis or patients with burn injuries is required in the future.

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AG	Aktiengesellschaft
AU	<i>Arbitrary Unit</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BMPR-2	<i>bone morphogenetic protein receptor 2</i>
Ca	Calcium
cm	Centimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CTB	CellTiter-Blue [®] -Assay
DE	Deutschland
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälber Serum
GDF-5	<i>Growth Differentiation Factor 5</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
g	Gramm
h	Stunden
HEKn	Humane epidermale Keratinozyten
IAP	Inhibitoren der Apoptose
kg	Kilogramm
KG	Kommanditgesellschaft
m²	Quadratmeter
Mg	Magnesium

mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
QVD	Quinoline-Val-Asp-Difluorophenoxymethylketone
SOPs	<i>standard operating procedures</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
w/o	<i>without</i>
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ZVK	Zentraler Venenkatheter
°C	Grad Celsius
%	Prozent

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines	1
1.2	Haut	2
1.2.1	Aufbau und Funktion der Haut	2
1.2.2	Epidermis	2
1.2.3	Dermis	3
1.2.4	Subcutis	3
1.2.5	Keratinozyten	4
1.3	Verbrennungen	5
1.3.1	Definition	5
1.3.2	Epidemiologie	5
1.3.3	Pathophysiologie	6
1.3.4	Klassifikation	7
1.3.5	Klinik	8
1.3.6	Diagnostik	9
1.3.7	Therapie	10
1.4	Apoptose	10
1.4.1	Einleitung	10
1.4.2	Funktion der Apoptose	11
1.4.3	Der Apoptose-Apparat	11
1.4.4	Auslösung der Apoptose	12
1.5	Nekrose	13
1.6	Apoptoseinhibitoren	13
1.6.1	Growth Differentiation Factor 5	14
1.7	Ziele der Arbeit	15
2	Material	16
2.1	Geräte	16
2.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.3	Substanzen	25
2.4	Software	27
3	Methoden	28
3.1	Anmerkung	28
3.2	Zellen	28

3.3	Allgemeines	28
3.4	Isolierung von Keratinozyten aus der Haut.....	28
3.5	Zellkultur	29
3.5.1	Passagierung der Zellen	29
3.5.2	Vitalitätstest und Lebendzellzahlermittlung	30
3.5.3	Kryokonservierung	30
3.5.4	Auftauen der Zellen.....	31
3.6	Etablierung eines Verbrennungsmodells	31
3.7	Temperaturverlauf	32
3.8	Proliferationskurve von unbehandelten Keratinozyten.....	34
3.9	Proliferationskurve von unbehandelten und thermisch geschädigten Keratinozyten.....	34
3.10	Proliferationskurve thermisch geschädigter Keratinozyten mit einem stündlichen Mediumwechsel in den ersten sechs Stunden	35
3.11	Proliferationskurve einer Keratinozytenpopulation, die mit GDF-5 oder QVD behandelt wurde.....	36
3.12	Proliferationskurve thermisch geschädigter Keratinozyten, die eine Stunde vor thermischer Schädigung mit GDF-5 oder QVD behandelt wurden.....	36
3.13	Proliferationskurve thermisch geschädigter Keratinozyten, die eine Stunde nach thermischer Schädigung mit GDF-5 oder QVD behandelt wurden.....	37
3.14	Messmethoden	38
3.14.1	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	38
3.15	Statistik.....	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Temperaturverlauf	40
4.2	Proliferationskurve von unbehandelten Keratinozyten.....	42
4.3	Proliferationskurve von Keratinozyten nach thermischer Schädigung.....	43
4.4	Proliferationskurve von Keratinozyten nach thermischer Schädigung mit einem stündlichen Mediumwechsel in den ersten sechs Stunden.....	49
4.5	Proliferationskurve von Keratinozyten, die mit QVD und GDF-5 behandelt werden .	50
4.6	Proliferationskurve thermisch geschädigter Keratinozyten, die eine Stunde vor thermischer Exposition mit GDF-5 oder QVD behandelt werden.....	52
4.7	Proliferationskurve thermisch geschädigter Keratinozyten, die eine Stunde nach thermischer Exposition mit GDF-5 oder QVD behandelt werden.....	55
5	Diskussion	59
5.1	Ausblick	65
6	Literaturverzeichnis	66

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Weltweit sterben jedes Jahr rund 300 000 Menschen an den Verletzungen durch Verbrennungen. Die Zahl derer, die nach Brandverletzungen unter somatischen, psychologischen, sozialen und wirtschaftlichen Restriktionen leiden, übersteigt die Millionen.[1] Die Behandlung dieser Verletzungen sind häufig kostspielig, gehen mit langen Krankenhausaufenthalten einher und erfordern Rehabilitationsmaßnahmen. [2] Präventive Maßnahmen erreichen immer noch nicht die angestrebten Ziele, so dass Forschende neben der Ausweitung von Informations- und Präventionsstrategien zur Bekämpfung der Verbrennungsursache ständig auf die neuesten Behandlungskonzepte hinarbeiten, da besonders groß angelegte und tiefe thermische Schäden mit schlecht heilenden Wunden, starken Schmerzen und einer verminderten Lebensqualität assoziiert sind.[3, 4]

Bereits im Jahr 1953 beschrieb Jackson auf zellulärer Ebene drei radiär angeordnete Zonen einer Verbrennung. Im Zentrum der thermischen Schädigung, dem Ort der höchsten Temperaturen, ist die Koagulationszone mit nekrotischen Zellen lokalisiert. Diese wird zwiebelschalenartig von der Stasezone umgeben, die vitale und avitale Zellen enthält. Diese vital gefährdeten Zellen können im Laufe von Stunden und Tagen in eine Nekrose und eine Apoptose übergehen. Primär ist dieser Prozess durch die eingeschränkte Kapillarperfusion erklärbar, wird aber auch durch Ausschüttung von Mediatoren, Immunmodulatoren und der thermischen Wirkung selbst indoktriniert. Dies wird Nachbrenneffekt genannt. Die äußerste Zone ist die Hyperämiezone. Mediatoren signalisieren in dieser Zone eine Vasodilatation der Gefäße, um die Perfusion und somit die Alimentation des Traumas zu gewährleisten.[5]

In diesem Zusammenhang sollen im Rahmen dieses Promotionsvorhabens die protektiven Faktoren von Apoptoseinhibitoren nach Verbrennungstraumata untersucht werden. Von besonderem Interesse ist dabei der Apoptoseinhibitor *Growth Differentiation Factor 5* (GDF-5). GDF-5 besitzt neben einem proangiogenen Effekt auch positive Auswirkungen auf die Zellproliferation, Regeneration, Viabilität, Migration und Differenzierung.[6, 7] Diese Eigenschaften prädestinieren GDF-5 zu einem protektiven Faktor, wobei die Wirkung auf thermisch geschädigte Keratinozyten klärungsbedürftig bleibt und im Folgenden untersucht werden soll.

1.2 Haut

1.2.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut besteht aus drei Schichten und stellt die äußere Begrenzung zur Umwelt dar. Sie ist das größte Organ des Menschen und hat eine Gesamtfläche von 1,5 bis 2 m² und ein Gewicht von 3 bis 4 kg. Von außen nach innen sind die Epidermis, die Dermis und die Subkutis aufeinandergeschichtet. Die Epidermis ist die äußerste Hautschicht, bestehend aus einem vielschichtigen Plattenepithel, wobei die äußerste Schicht die sogenannte Hornschicht ist und aus avitalen Zellen besteht. Von der Epidermis wird die Dermis – das bindegewebige Gerüst der Haut, das vaskularisiert und innerviert ist – durch die Basalmembran getrennt. Die tiefste Schicht ist die Subkutis, ein Fettgewebepolster. Die Haut und ihre unterschiedlichen Schichten erfüllen verschiedene Aufgaben. Dazu gehören die Barriere- und Schutzfunktion gegen die Umwelt, mechanische Traumata, Mikroorganismen, physikalische und thermische Einwirkungen. Doch zählen auch die Regulation der Körpertemperatur, die immunologische Abwehr, Sinnesfunktionen wie der Tast- und Schmerzsinne und der Schutz vor Wasserverlust dazu. [8-11]

1.2.2 Epidermis

Die Epidermis, die oberste Schicht der Haut, ist ein mehrschichtiges, sich verhornendes Plattenepithel. Sie besteht zum großen Teil aus profilierenden und sich differenzierenden Keratinozyten, die bestrebt sind, an die Oberfläche zu wandern. Nach unterschiedlichen morphologischen und funktionellen Differenzierungsgraden kann die sogenannte Oberhaut in fünf Schichten unterteilt werden: dem Stratum corneum, lucidum, granulosum, spinosum und basale. Das Stratum basale ist die unterste Schicht der Epidermis und kommuniziert direkt mit der Basalmembran. Diese enthält gleichmäßig geformte Keratinozyten, die für die Ausbildung sogenannter Hemidesmosomen zur Dermis verantwortlich sind. Das Stratum spinosum, die suprabasale Schicht, enthält polygonale Keratinozyten, die durch eine vielfältige Verzahnung durch interzelluläre Adhäsionsstrukturen, den Desmosomen, entstehen. Die Keratinozyten des Stratum granulosum sind deutlich abgeflacht und beginnen die Keratinisierung. Das Stratum lucidum, die helle Schicht, tritt lediglich in vielschichtigen Epithelien wie der Fußsohle oder Handinnenfläche auf und ist gekennzeichnet durch Keratinozyten, deren einzelne Bestandteile wie Zellkerne nicht mehr differenzierbar sind. Die oberste Schicht, das Stratum corneum, besteht aus abgeflachten Keratinozyten ohne Nucleus und Organellen, deren Matrix mit Keratin gefüllt ist. Neben den Keratinozyten beinhaltet die Epidermis drei weitere Hauptzelltypen: die Melanozyten, die immunkompetenten Langerhans-Zellen und die Merkel-Zellen, die den Tastsinn vermitteln. [8-10, 12, 13]

1.2.3 Dermis

Die Dermis, auch Lederhaut genannt, ist ein Bindegewebe, das aus elastischen Kollagenfasern des Typs 1 besteht. Sie setzt sich aus zwei Schichten zusammen: dem Stratum papillare und dem tiefen Stratum reticulare. Dabei machen das Stratum reticulare 80 % und das Stratum papillare 20 % der Dermis aus. Das Stratum papillare grenzt an das Stratum basale der Epidermis und enthält die namensgebenden Bindegewebspapillen. In diese ziehen kollagene Fasern hinein, die Traktionskräfte reduzieren und somit einer Abscherung entgegenwirken. [8-10] Die kollagenen Fasern werden von einem lockeren Bindegewebe begleitet, das Kapillarschlingen, Lymphkapillaren, Nervenendaufzweigungen, Meissner Tastkörperchen, Fibroblasten und Immunzellen wie Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten enthält. Das Stratum reticulare schließt sich der Papillarschicht fließend an. Dieses enthält starke kollagene Fasern, die in verschiedene Richtungen orientiert sind, sodass sie eine hohe Dehnbarkeit der Haut ermöglichen. Elastische Netze zwischen den kollagenen Fasern ermöglichen eine Rückordnung der starken kollagenen Faserbündel. [8, 10, 14, 15]

1.2.4 Subcutis

Die Tela subcutanea ist die tiefste Schicht der Haut und besteht aus Fettgewebe sowie einem geringeren Anteil an lockerem Bindegewebe. Sie ist mit den sogenannten Retinaculae cuti durchsetzt, die die Subcutis mit den darunterliegenden Strukturen verbindet. Dazu zählen zum Beispiel das Periost oder die Faszien. Die Dicke der Subcutis wird von verschiedenen Faktoren bestimmt, zu denen das Körpergewicht, das Geschlecht und somit der hormonelle Einfluss und die Körperregion gehören. Bevorzugte Körperregionen für die Einlagerung von Depotfett sind beim Mann die Bauchhaut, bei der Frau hingegen Brust, Hüfte und Gesäß. [8-10, 13]

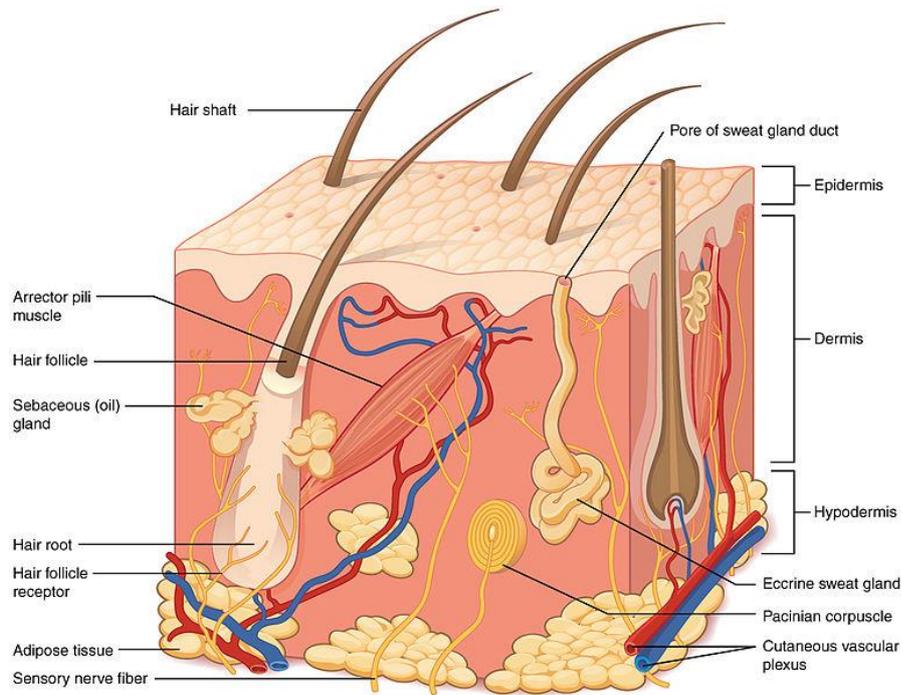


Abb. 1.1 zeigt den schematischen Aufbau der Haut mit den drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis (Hypodermis). [16]

1.2.5 Keratinocyten

Die Keratinocyten der Haut entstehen aus Stammzellen der epidermalen Basalmembran. Im Laufe des Lebenszyklus durchlaufen Keratinocyten verschiedene Proliferations- und Differenzierungsphasen und wandern vom Stratum basale der Epidermis zur Oberfläche hin. Wie bereits beschrieben, verändern diese Keratinocyten während der Migration ihre Morphologie, bis schließlich im Stratum corneum keratinisierte, avitale Zellen ankommen. Sie erfüllen eine bedeutende Aufgabe, denn sie bilden den Schutzmantel gegen die Umwelt und äußere Reize. Der Prozess der Desquamation beschreibt dabei das Abschilfern der obersten Zellschichten durch nachfolgend proliferierende und sich differenzierende Keratinocyten. Dieser Prozess und die damit verbundene Erneuerung der Epidermis dauert etwa 28 Tage. Das Zytoskelett der Keratinocyten ist reich an Intermediärfilamenten. Diese sind 10 nm dick und enthalten Keratine unterschiedlicher Subtypen, die sich im Verlauf der Differenzierung und Proliferation ändern. [9, 10, 17]

1.3 Verbrennungen

1.3.1 Definition

Eine Verbrennung ist definiert als thermisches Trauma, das zu einer Gewebsschädigung führt. Diese thermische Schädigung kann durch die Einwirkung von Flammen, heißen Flüssigkeiten, Dampf, Gasen, Strahlung, heißen Stoffen oder Kontaktflächen, Explosionen, Reibungen sowie durch die Exposition gegenüber elektrischem Strom oder chemischen Substanzen ausgelöst werden. [18] Maßgeblich für die thermische Schädigung sind die Höhe der Temperatur und die Dauer der Exposition, sodass nicht nur die Haut und deren Anhangsgebilde lokal, sondern auch große Areale des Organismus betroffen sein können. Im Rahmen der Verbrennungskrankheit kann dies eine Kreislaufreaktion hin zum Schock, eine systemische Entzündungsreaktion bis zur Sepsis und den Exitus letalis nach sich ziehen. Faktoren wie die Überlebenschancen, funktionelle und ästhetische Ergebnisse, aber auch die zu erreichende Lebensqualität sind von der Akut- und Langzeitversorgung sowie den Rehabilitationsmaßnahmen abhängig. [18-21]

1.3.2 Epidemiologie

Jedes Jahr erleiden in Deutschland 600 von 100 000 Einwohnern leichte Verbrennungen, einer von 55 000 Einwohnern wiederum zieht sich schwere zu. Epidemiologisch sind Männer mit 72,5 % von Verbrennungen signifikant häufiger betroffen als Frauen mit 28,5 %. Neben der stark unterschiedlichen Häufung bei den Geschlechtern gibt es ebenfalls einen deutlichen Unterschied in den diversen Altersklassen. Am häufigsten sind mit 59,5 % Menschen im Alter zwischen 20 und 59 Jahren betroffen, gefolgt von 24,6 % der Brandverletzten bei den über 60-Jährigen. Mit 15,9 % sind Kinder und Jugendliche die am wenigsten betroffene Altersgruppe, wobei der Anteil der unter 10-Jährigen mit 9,7 % relativ hoch ist. Der prozentual größte Anteil von Verbrennungen wird mit 44,9 % durch direkte Flammeneinwirkung verursacht. Darauf folgen Verbrühungen (25,9 %), Explosionsverletzungen (11,2 %), Kontaktverbrennungen (6,7 %), Stromunfälle (4,9 %) und Sonstiges (5,2 %). Verbrennungen im häuslichen Umfeld (65,4 %) oder im Rahmen eines Arbeitsunfalles (21,4 %) sind mit Abstand die häufigsten Gefahrenstandorte. In den übrigen Fällen treten Verbrennungen im Rahmen einer suizidalen Absicht (5,2 %), eines Verkehrsunfalls (1,8 %) oder einer kriminellen Handlung (1,1 %) auf. In wenigen Fällen (5,1 %) trifft keine der genannten Ursachen zu. [18, 21-23]

1.3.3 Pathophysiologie

Eine Verbrennung kann nach Jackson in drei konzentrische Zonen eingeteilt werden, die den Grad der thermischen Schädigung widerspiegeln.

1. Die Koagulationszone, auch Nekrosezone genannt, ist der zentrale Lokus mit der höchsten thermischen Schädigung, in der die Zellen der Haut nekrotisch werden.
2. Die intermediäre Stasezone enthält vitale und avitale Zellen, wobei der Metabolismus in dieser Zone eingeschränkt ist und die Zellen vom Absterben bedroht sind.
3. Die äußerste Zone ist die der Hyperämie. In dieser Zone sind die thermische Schädigung am geringsten und der Metabolismus, wie auch die Zirkulation, am höchsten, sodass diese einen protektiven Effekt auf die vitalen Zellen der Stasezone hat. [5]

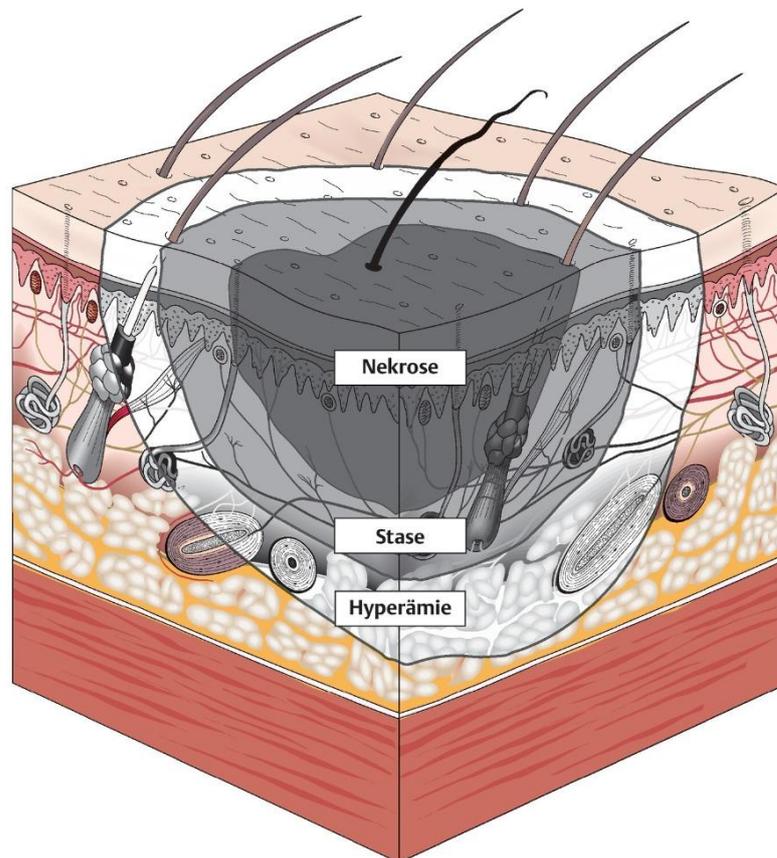


Abb. 1.2 zeigt die drei Verbrennungszonen nach Jackson: in Schwarz die zentrale Nekrosezone, in Grau die Stasezone und in Weiß die äußere Hyperämiezone. [24]

1.3.4 Klassifikation

Eine thermische Verletzung kann anhand der Ausdehnung in die Tiefe in sogenannte Verbrennungsgrade klassifiziert werden. Dabei werden vier Grade voneinander unterschieden. Der erste Grad der Verbrennung betrifft die Epidermis und stellt sich klinisch mit einer Rötung und Schmerzen dar. Der zweite Verbrennungsgrad kann in 2a und 2b unterteilt werden. Verbrennungen des Grades 2a betreffen die oberflächliche Dermis. Klinisch zeigen sich bei Verbrennungen dieses Grades eine Blasenbildung mit rosigem und rekapillarisierendem Wundgrund. Die Haare sind fest verankert und die Betroffenen beklagen starke Schmerzen. Verbrennungen des Grades 2b betreffen die tiefe Dermis mit den Hautanhangsgebilden und führen ebenfalls zur Blasenbildung. Der Wundgrund dieser Blasen wiederum ist blasser und schwach rekapillariert. Die Haare sind leicht zu entfernen und die Patient/-innen haben weniger starke Schmerzen. Eine Verbrennung des Grades 3 betrifft die komplette Dermis. Die Wunde hat einen trockenen, weißen, lederartigen und harten Wundgrund. Haare sind nicht mehr vorhanden und die Patient/-innen beklagen keinerlei Schmerzen. Verbrennungen des vierten Grades durchdringen die Haut bis zum Unterhautfettgewebe, den Muskeln und deren Faszien hin zu den Knochen. Klinisch zeigt sich eine Verkohlung. Des Weiteren gibt es sogenannte Verbrennungen unbestimmter Tiefe. Hierunter werden Verbrennungen des zweiten Grades zusammengefasst, deren Beurteilung hinsichtlich der oberflächlichen oder tiefen dermalen Verletzung und Operationsbedürftigkeit problematisch ist. [18, 21, 25-27]

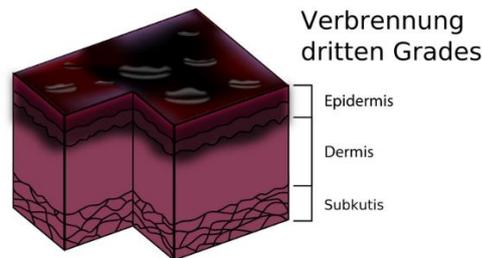
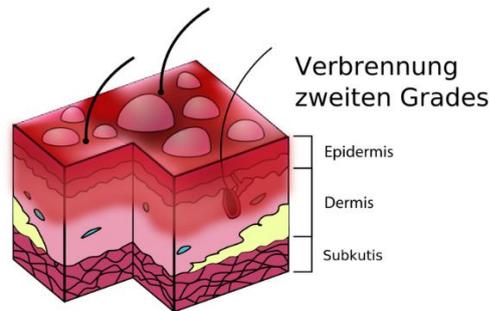
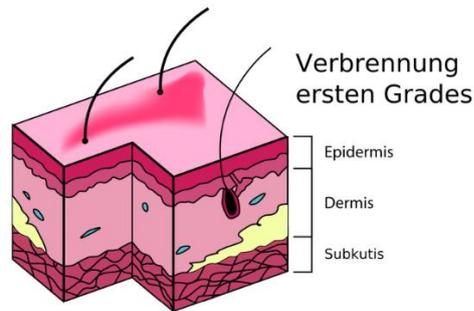


Abb. 1.3 zeigt eine schematische Darstellung der Verbrennungsgrade 1-3 mit Affektion der drei Hautschichten abhängig des Verbrennungsgrades.[28]

1.3.5 Klinik

Die Klinik und die Symptome einer Verbrennung sind kongruent zu den oben beschriebenen Verbrennungsgraden. Eine Verbrennung des ersten Grades geht mit Schmerzen, Rötungen und Schwellungen einher. Eine Verbrennung zweiten Grades stellt sich mittels Schmerzen, Rötungen und Blasen dar, dabei verheilen Verbrennungen des Grades 2a ohne Narben, wohingegen Verbrennungen des Grades 2b Narben hinterlassen. Verbrennungen des dritten Grades sind von Nekrosen, schwarzen, grauen und weißen Hautlederungen sowie Schmerzlosigkeit gekennzeichnet, da ein Verlust der Oberflächensensibilität vorliegt. Eine Spontanheilung ist ab dem dritten Verbrennungsgrad nicht mehr möglich. Der vierte Verbrennungsgrad ist von einer Verkohlung gekennzeichnet, wobei hier vor allem Komplikationen wie eine Superinfektion und Multiorganversagen im Vordergrund stehen. [21, 26, 27, 29]

1.3.6 Diagnostik

Der erste Schritt der Diagnostik ist die Anamnese. Neben den üblichen in der Anamnese zu erhebenden Fakten – wie Leitsymptome, Vorerkrankungen, Voroperationen, Medikation – ist in der Akutsituation der Verbrennung vor allem der Unfallhergang von besonderem Interesse, da dieser Aufschluss über die Art und den Mechanismus der Verbrennung geben kann. In einem nächsten Schritt erfolgt die körperliche Untersuchung. Hierbei sollte die Patient/-in zunächst entkleidet werden, um inspektorisch das Ausmaß der Verbrennung zu bestimmen. Dies kann anhand der Neunerregel nach Wallace erfolgen. Neben dem Ausmaß sollte auch die Tiefe der Verbrennung anhand der oben bereits aufgeführten Klassifikation erhoben werden. Zusätzlich sollten neben Anamnese und körperlicher Untersuchung eine laborchemische Kontrolle zum Ausschluss einer systemischen Beteiligung sowie mikrobiologische und histopathologische Wundabstriche erfolgen, um den Grad der Verbrennung zu bestimmen und Superinfektionen oder eine Sepsis auszuschließen. Je nach Unfallmechanismus können auch bildgebende Verfahren wie ein konventionelles Röntgen herangezogen werden, um Frakturen auszuschließen. Im Rahmen eines Inhalationstraumas kann ein Röntgenthorax oder eine Laryngo-Bronchoskopie indiziert sein, um Verletzungen des Atemapparates auszuschließen. [18, 21, 30, 31]

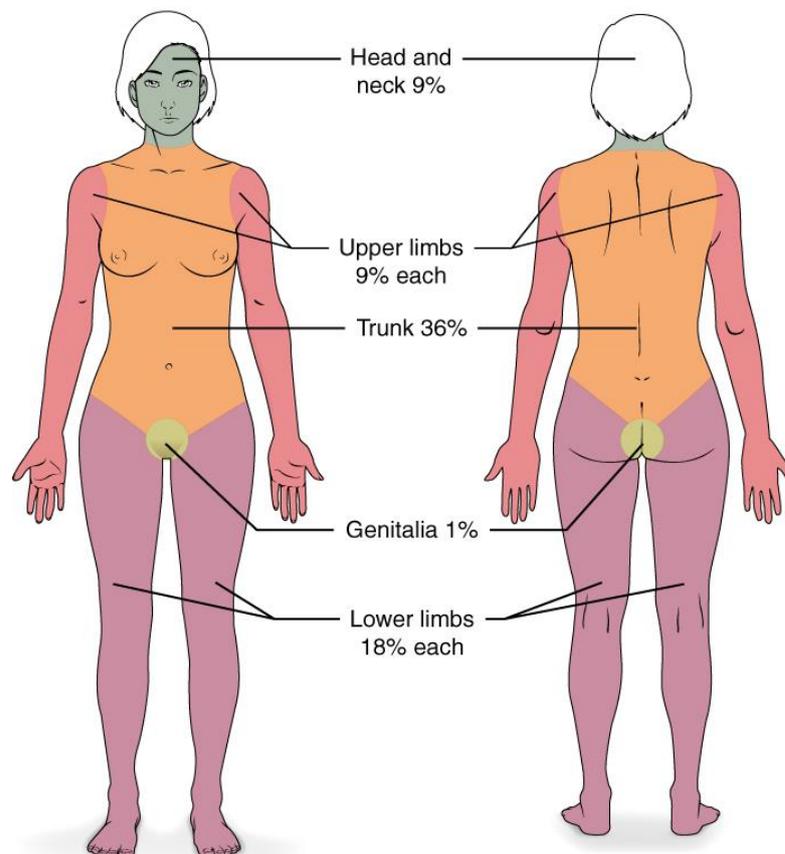


Abb. 1.4 zeigt die 9er-Regel nach Wallace, die zur Beurteilung der thermisch geschädigten Körperoberfläche dient.[32]

1.3.7 Therapie

Grundsätzlich erfolgt eine Unterscheidung zwischen der Therapie von lokalen und der von systemischen Verbrennungen. Des Weiteren gilt es, die präklinische von der klinischen Versorgung zu differenzieren. In der Akutsituation bei lokalen Verbrennungen muss zum einen die verbrannte Kleidung entfernt und zum anderen die verbrannte Haut mit 15–20 °C kaltem Wasser gekühlt werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass bei Verbrennungen, die mehr als 30 % der Haut betreffen, auf Grund der Hypothermiegefahr nicht lokal gekühlt werden darf. Zusätzlich gilt es, die Verbrennungen steril abzudecken, zum Beispiel mit metallischen Verbandstüchern. In der akuten Situation von systemischen Verbrennungen ist die oberste Prämisse, die Vitalfunktionen zu sichern, gegebenenfalls mittels frühzeitiger Intubation vor allem bei Inhalationstraumata und Verbrennungen von mehr als 30 % der Körperoberfläche. Des Weiteren sollten frühzeitig mehrere großvolumige Zugänge gelegt werden, um eine Analgesie und Volumensubstitution zu gewährleisten. Für eine normgerechte Therapie der Verbrennungen ist ein frühzeitiger Transport in sogenannte Verbrennungszentren indiziert. Diese sind vor allem dann notwendig, wenn ab einem Verbrennungsgrad 2 mehr als 20 %, ab einem Verbrennungsgrad 3 mehr als 10 % der Haut, Kinder und Menschen über 50 Jahren betroffen sind. Dies gilt auch bei Verbrennungen von speziellen Körperteilen wie der Hände, der Füße, des Gesichts oder des Genitals. In der klinischen Versorgung müssen allgemeine von speziellen Maßnahmen unterschieden werden. Zu den allgemeinen Maßnahmen gehören die ZVK-Anlage, die Intubation, die Tetanusprophylaxe und die Flüssigkeitssubstitution nach der Parkland-Formel. Die spezielle Versorgung von Verbrennungen des ersten und zweiten Grades beruht vorwiegend auf der Versorgung mittels antiseptischer Salbe. Verbrennungen des dritten und vierten Grades werden chirurgisch mittels Debridements, Nekrosotomie, Escharotomie und Hauttransplantationen behandelt. [18, 21, 30, 31, 33-36]

1.4 **Apoptose**

1.4.1 Einleitung

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein aktiver Prozess, der von der Zelle durch internale oder externale Triggerfaktoren hervorgerufen wird und zum Tod dieser führt. Der Prozess der Apoptose läuft ohne Entzündungsreaktionen ab. Während des Prozesses schrumpft die Zelle, deformiert sich und verliert jeglichen Kontakt zu benachbarten Zellen. Die Desoxyribonukleinsäure (DNS) kondensiert und fragmentiert die Zelle und wird schließlich von Makrophagen phagozytiert. [37, 38]

1.4.2 Funktion der Apoptose

Die Apoptose ist essenziell für unterschiedliche Prozesse des Organismus. Während der Differenzierung des Organismus wird durch die Apoptose bestimmter Zellen die Körpermorphologie geformt. [37, 39, 40] Dabei wird zum Beispiel das Interdigitalgewebe eines Embryos entfernt. Des Weiteren werden während der Entwicklung des Nervensystems überschüssige Neurone terminiert. [39, 40] Im Rahmen der Immuntoleranz übernimmt die Apoptose ebenfalls eine zentrale Aufgabe, denn sie ist bedeutender Bestandteil der Genese. Immunzellen werden im Laufe ihrer Differenzierung repetitiv auf ihre Funktionalität hin geprüft. Falls sich diese zum Beispiel gegen körpereigenes Gewebe richten, wird die Apoptose eingeleitet, sodass ca. 90 % der reifen Lymphozyten der Apoptose erliegen. Eine weitere bedeutende Aufgabe der Apoptose ist die Homöostase der Zellzahl. [39, 40] Gewebe, die ständiger Proliferation oder Differenzierungen unterliegen, werden durch die Apoptose im Gleichgewicht gehalten, da eine Störung zwischen Neubildung und Absterben von Zellen zur Entwicklung von tumorösen Prozessen beitragen kann. Geschädigte, defekte oder infizierte Zellen stellen ein potenzielles Risiko für das Funktionieren des Organismus dar, sodass zum Beispiel Schäden an der DNS, die nicht mehr durch Reparaturprozesse behoben werden, durch die Apoptose eliminiert werden und das Risiko gesenkt wird, das durch eine Anhäufung maligne Zellen entstehen. [38, 40, 41]

1.4.3 Der Apoptose-Apparat

Der Großteil der Proteine, die am Apparat der Apoptose beteiligt sind, lässt sich in drei Gruppen einteilen: die Caspasen, Proteine der *B-cell lymphoma 2* Familie (Bcl-2) und die Inhibitoren der Apoptoseproteine (IAPs). Caspasen sind Proteasen, die Proteine spezifisch hinter Aspartatresten schneiden, und die bedeutsamsten Mediatoren der Apoptose. In gesunden Zellen sind sie als Procaspasen, die inaktiven Vorstufen, zu finden, die im Rahmen einer Kaskade aktiviert werden. Die Caspasen 2, 8, 9 und 10 sind Initiator-Caspasen und lösen die Apoptose aus. Die Caspasen 3, 6 und 7 wiederum sind Effektor-Caspasen und dienen der proteolytischen Spaltung. Die Proteine der Bcl-2-Familie dienen der Regulation der Apoptose und wirken an den Mitochondrien. Sie lassen sich in pro- und antiapoptotische Subfamilien untergliedern, die die Kaskade der Caspasen auslösen oder ihre Wirkung reduzieren oder verstärken können. Die Expression der IAPs wird durch Wachstumshormone getriggert und durch mitochondriale Proteine inhibiert. Die IAPs – besonders die *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) - sind antiapoptotisch wirkende Proteine, die die Caspasen 3, 7 und 9 inhibieren, und vermitteln den Abbau der Caspasen 3 und 7 durch Proteosomen. [42-44]

1.4.4 Auslösung der Apoptose

Es gibt drei Arten, mit denen die Apoptose aktiviert werden kann. Das sind der extrinsische, der intrinsische und der Granzym/Perforin-Signalweg. Diese wiederum enden in einer gemeinsamen Endstrecke, die die Effektor-Caspasen aktiviert. Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren aktiviert. [39, 42] Nachdem die Liganden an Rezeptoren der Tumornekrosefaktoren binden, trimerisieren diese, sodass es zu einer intrazellulären Bindung eines Adaptermoleküls kommt und ein *death inducing signaling complex* (DISC) entsteht. Die DISC führen zu einer erhöhten Rekrutierung von Procaspasen 8, die durch autokatalytische Prozesse zu Caspase 8 synthetisiert und folgend die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktivieren. Zusätzlich kann die Caspase 8 durch Spalten des proapoptotischen Proteins Bid der Bcl-2-Familie den intrinsischen Weg aktivieren. Beim intrinsischen Signalweg spielt die Integrität der Mitochondrien eine grundlegende Rolle. Diese wird durch eine Balance zwischen den antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie und den proapoptotischen Proteinen wie Bak, Bax und Bid aufrechterhalten. [39, 42] Falls nun intrazellulärer Stress auftritt, zum Beispiel genotoxischer Stress, überwiegen proapoptotische Proteine, woraufhin Permeabilitäts-Transitionsproteine gebildet werden und mitochondriale Apoptose-Mediatorproteine in das Zytoplasma freigesetzt werden. Der bedeutendste dieser Mediatoren ist das Cytochrom c, das an Apaf-1 bindet. [39, 42] Dadurch wird das Apoptosom gebildet, das die Procaspase 9 spaltet und die Caspase 9 aktiviert, die wiederum die Effektor-Caspasen aktiviert. Immunzellen, zum Beispiel die zytotoxischen T-Zellen, verstärken die Ausschüttung von Granzymen und Perforinen. Die Perforine lagern sich an der Zytoplasmamembran an und bilden Poren, durch die Granzyme das Zellinnere erreichen. Außerdem spalten sie die Procaspase 3 und aktivieren den mitochondrialen Weg über Bid. Die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 terminieren zelluläre Proteine, etwa Proteine des Zytoskeletts, Endonuklease-Inhibitoren, Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren und hnRNPs. [39, 42, 45, 46]

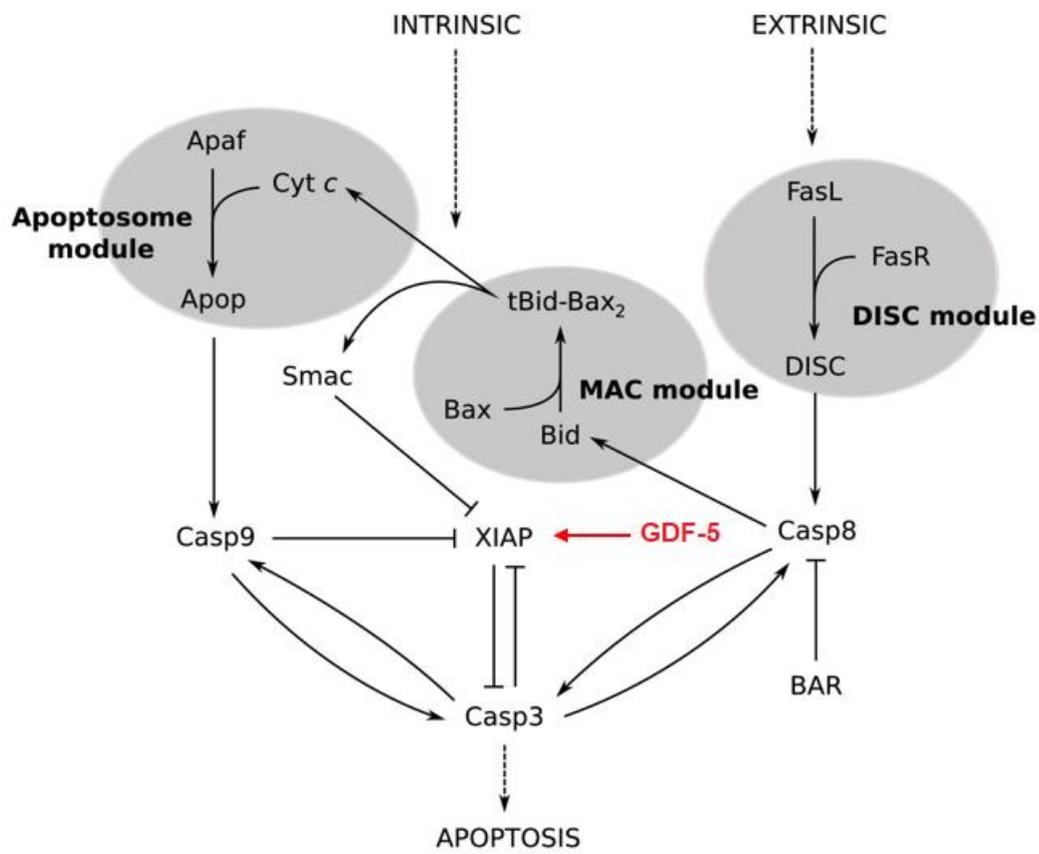


Abb. 1.5 zeigt eine schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs der Apoptose sowie der Wirkung des Apoptoseinhibitors GDF-5. Die Abbildung wurde adaptiert und angepasst nach Harrington. [47]

1.5 Nekrose

Die Nekrose stellt die zweite Form des Zelltodes dar. Sie ist eine passive, pathologische Reaktion auf eine extrinsische, irreversible Schädigung der Zelle. Die Folge ist ein Schwellen der Zelle, sodass es zu Permeabilitätsstörungen der Plasmamembran kommt und der Zellinhalt in den Interzellularraum fließt. Die Folge ist eine Entzündungsreaktion. [48, 49]

1.6 Apoptoseinhibitoren

Wie oben bereits erwähnt, gehört die Apoptose zu den physiologischen Prozessen des menschlichen Individuums. Ein defekter oder fehlerhaft programmierter Zelltod

kann zu einer Immunsuppression, malignen Grunderkrankungen und auch zu degenerativen Erkrankungen führen. [50] Apoptoseinhibitoren sind Proteine einer Familie, die an unterschiedlichen Punkten des Apoptoseapparats angreift und physiologischerweise den programmierten Zelltod verhindert. [51]

1.6.1 Growth Differentiation Factor 5

Der Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5 (GDF-5) gehört zur Familie der knochenmorphogenetischen Proteine und der übergeordneten Gruppe der Wachstumsfaktoren der TGF-beta-Familie. Er ist bekannt für die Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. [52] Der GDF-5 wird im zentralen Nervensystem exprimiert und dient auch dem Schutz dopaminergischer Neuronen. Ebenso stimuliert GDF-5 die Interaktion von *bone morphogenetic protein receptor-2* (BMPR-2) und *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP). In der Folge wird die Ubiquitinierung von XIAP reduziert, sodass die Stabilität des XIAPs steigt. Die erhöhte XIAP-Konzentration wiederum bindet und inaktiviert Caspasen, die wie bereits oben beschrieben essenzieller Teil des Apoptoseapparats sind, sodass auch beziehungsweise besonders eine Regulation der Apoptose stattfindet. [52] Außerdem kann GDF-5, neben dem Zellwachstum und der Differenzierung ebenfalls die Zellmigration, -proliferation und Kollagensynthese aktivieren, die zentrale Bestandteile der Wundheilung darstellen. [6, 53, 54] Bereits 1997 konnte Yamashita nachweisen, dass GDF-5 die Angiogenese induziert. [55] Eine induzierte Angiogenese, die Inaktivierung von Caspasen und die Steigerung der Zelldifferenzierung, -proliferation sowie -migration prädestinieren GDF-5 als protektiven Faktor nach Verbrennungstraumata.

1.7 Ziele der Arbeit

Zunächst ist das Ziel dieses Promotionsvorhabens die Etablierung und Ausarbeitung eines zellbasierten In-vitro-Verbrennungsmodells, das es ermöglichen soll, auf zellulärer Ebene thermischen Schaden zu induzieren. Dieses Modell soll flexibel mit Blick auf die genutzte Zellkultur sein und variabel in Bezug auf die thermisch induzierte Schädigung, sodass Parameter wie Expositionsdauer und Expositionstärke nach Wunsch verändert werden können.

Nachdem ein In-vitro-Verbrennungsmodell etabliert wurde, soll in einem nächsten Schritt die Proliferation von thermisch geschädigten Keratinozyten charakterisiert werden. Hierbei ist primär die Proliferation im zeitlichen Zusammenhang mit Blick auf den sogenannten Nachbrenneffekt von besonderem Interesse, sodass vor allem das Wachstum in den ersten 96 Stunden nach der thermischen Schädigung überwacht werden sollte.

Schließlich soll der Einfluss von protektiven Faktoren, zum Beispiel Apoptoseinhibitoren, auf die Proliferation von hitzegeschädigten Keratinozyten beschrieben werden. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle GDF-5, das über außergewöhnliche Charakteristika verfügt. Dazu zählen, wie bereits erwähnt, die antiapoptotischen und proangiogenetischen Eigenschaften sowie die positive Wirkung auf Migration, Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten. [6, 56]

Falls protektive Faktoren, wie der Apoptoseinhibitor GDF-5, den gewünschten Effekt auf die Proliferation der Keratinozyten in diesem Zellverbrennungsmodell zeigen sollten, bestünde die Möglichkeit, nach weiterer intensiver Forschung in Zukunft diese weltweit in der klinisch relevanten Verbrennungsbehandlung zu etablieren, denn primäre Ziele jeder Behandlung sind die Sicherung von vitalem Gewebe sowie eine schnelle und stabile Wundregeneration, sodass vor allem bei großflächigen Verbrennungen die Überlebenschancen gesteigert werden könnten. [6, 56] Des Weiteren könnte dadurch die gesamte Nachbehandlung positiv beeinflusst werden, indem zum einen Behandlungskosten gesenkt werden und zum anderen das Auftreten von funktionell und ästhetisch einschränkenden Narben reduziert wird.

Eine effizientere Verbrennungsbehandlung, geringere Mortalität, reduzierte Behandlungskosten und weniger Komplikationen würden letztlich den Menschen helfen, die nach Brandverletzungen unter somatischen, psychologischen, sozialen und wirtschaftlichen Einschränkungen leiden. [6, 56]

2 Material

Die Materialien wurden größtenteils als Standards aus dem Archiv des Labors der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genutzt. Dies wird an dieser Stelle erwähnt, um einen Konflikt dieser Textstellen als Plagiate zu vermeiden.

2.1 Geräte

Gerät	Produktbezeichnung	Produzent
Aluminiumständer zur kühlen Probenlagerung	Rotilabo-Alu.Rack 1.5	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, DE
Autoklav	Systec DX-90	Systec GmbH, Linden, DE
Bechergläser	DURAN Becher niedrige Form und Ausguss	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, DE
Blotting Gerät	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Brutschrank (37 °C)	Heraeus B 6060	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Brutschrank (37 °C; 5 % CO2)	HERACELL 150i CO2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Eismaschine	RF 0244 A	Manitowoc Ice, Manitowoc, Wisconsin, USA
Eiswanne zur kühlen Probenlagerung	neoLab Eisbad klein aus PS, innen 210 x 140 x 80 mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Gasflamme	Fuego SCS basic	WLD-Tec, Göttingen, DE

Gefrierschrank -20 °C	GUw 1213	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Gefrierschrank -25 °C	Labor-Gefrierschrank FROSTER	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, DE
Gefrierschrank -81 °C	Freezer Nr. 3156361701 REV	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Handzählgerät	Einhandzählgerät aus Edelstahl	Infactory, Pearl GmbH, Buggingen, DE
Heizblock	dry bath	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Heizblock	Thermoblock TB1	Biometra GmbH, Jena, DE
Infrarot Thermometer	1200 - 50 D USB	Voltcraft, Conrad Electronic AG, Hirschau, DE
Kühlschrank 4 °C	KUw 1740	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Kühlschrank 4 °C mit Glastür	QCR2304U14	Queue Systems Inc., Asheville, USA
Laborflasche	DURAN Original Laborflasche	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, DE
Liquid Nitrogen Freezer	Locator 4+	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Magnetrührgerät	620 Standard	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Mehrfachdispenser	Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Messbecherglas	Pyrex Beakers, low form, Griffin	SciLabware Ltd., Stoke-on-Trent, UK
Messzylinder	Messzylinder, PP, Klasse B, niedere Form, erhabene Skala	VITLAB GmbH, Grossostheim, DE
Messzylinder	Borosilikatglas 3.3, niedrige Form, Klasse B	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Messzylinder	PP, durchscheinend, hohe Form, Klasse B	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Metallplatte	24-Well Edelstahl Unterbodenplatte	Laborinterne Herstellung
Mikroskop	Axiovert 40 C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Photometer	multilabel plate reader Victor3	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
Photometer PC	Optiplex GX620	Dell Inc., Round Rock, USA
Pipettierhilfe	accu-jet pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Pipettierhilfe	pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Pipettierhilfe	Omega Pipettor	Argos Technologies Inc., Vernon Hills, USA
Pumpe	LABOPORT	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Rüttelplatte	Kleinschüttler KM-2	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, DE
Sicherheitswerkbank mit Abzug	TA 1500 x 900 - 900 (Laborsystem mc6)	W.Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, DE

Sonifizierer	UP50H (Cycle 0,5; Amplitude 80 %) mit Sonotrode MS1	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, DE
sterile Werkbank	Herasafe KS 18	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
sterile Werkbank	Euroflow EFA5	Clean Air Techniek bv, Woerden, NL
Taumelrollenmischer	RM 5	Ingenieurbüro CAT M.Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, DE
Taumelrollenmischer	RM 10 W	Ingenieurbüro CAT M.Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, DE
Thermostat für Wasserbad	Thermomix BU	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Timer	4104443	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Vortexer	IKA MS3 basic (3000 U/min)	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, DE
Vortexer	Vortex mixer	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DE
Vortexer	L46 Power Mixer	Labinco BV, Breda, NL
Waage (d=0,1 mg)	ABJ 220-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Waage (d=10 mg)	Adventurer Pro AV412	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA

Wärme-Bad 37 °C	Aqualine AL 12	LAUDA DR. R. WOBSE R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshöfen, DE
Western Blot Imaging Instrument	ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Zählkammer Hämocytometer	/ Neubauer, Tiefe 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshöfen, DE
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific Fisher GmbH, Schwerte, DE
Zentrifuge	MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific Fisher GmbH, Schwerte, DE

Tabelle 2.1: Verzeichnis der Geräte

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Produktbezeichnung	Produzent
15 ml Zentrifugenröhrchen	15 ml tubes, sterile, graduation and writing area	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
24-Well-Platte	24 well plate, cell culture treated, with lid, lid with condensation ring, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
50 ml Zentrifugenröhrchen	50 ml tubes, sterile, graduation and writing area	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE

6-Well-Platte	6 well plate, cell culture treated, with lid, lid with condensation ring, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
96-Well-Plate	96 well plate, cell culture treated, with lid, lid with condensation ring, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Abwurfbeutel	Vernichtungsbeutel 200 x 300 mm, PP, transparent, Stärke: 50 µm, autoklavierbar, ohne Druck	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Aqua ad iniectabilia	Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi France, Sèvres, FR
Aqua destillata	Demi-Wasser	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, DE
Butangas	Butan CV360	Camping Gaz (Deutschland) GmbH, Hungen-Inheiden, DE
CO2-Gas	Kohlendioxid UN 1013	Linde AG, Geschäftsbereich Linde Gas, Pullach im Isartal, DE
Desinfektionsmittel Wärme-Bad	Thermoklar	BIOMED Labordiagnostik GmbH, Oberschleissheim, DE

Einweg-Wägeschalen	diamond weighing boats, white, antistatic	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Ethanol (70 %) zur Desinfektion	Technisolv Ethanol 70 % (V/V) denaturated Eurodenaturant	vwr International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, FR
Ethanol (99 %)	Emsure; Ethanol absolute for analysis	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Folie	Microtiter Sealing Tape	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Fusselarme Papiertücher	KIMTECH SCIENCE* Präzisionstücher weiß/klein	Kimberly-Clark Global Sales Inc., Roswell, USA
gläserne Pasteurpipetten	Glass Pasteur Pipettes	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Handschuhe	Micro-Touch Nitra-Tex Nitrile Powder-Free Examination Gloves	Ansell GmbH, München, DE
Handschuhe	Classic Nitrile, Powder-Free, blau	Abena GmbH, Zörbig, DE
HEKn	Primary human epidermal keratinocytes isolated from neonatal foreskin, cryopreserved at the end of the primary culture	Gibco Corp. Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE

Keratinocyten Medium	Keratinocyte-SFM Medium	Gibco Corp. Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Micro tube/SafeSeal tube	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Mikrotiterplatte	Microplate, 96 well, PS, F-Bottom, Clear	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Papiertücher	tapira Plus Kosmetiktücher	GVS Großverbraucherspezialisten eG, Heidenheim, DE
Petri-Schale	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Pipetten (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	eppendorf research/research plus/reference	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipetten (0,5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl)	Finnpipette	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Pipetten (2-20 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl)	pipetman classic	Gilson S.A.S., Villiers-le-Bel, FR
Schwarze Tonne	Kontaminationsabfall	MAUSER Corporate GmbH, Brühl, DE
Spitzen (0,5 ml, 5 ml, 10 ml)	Combitips advanced steril/unsteril	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Spitzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	costar stripette serological pipet	Corning Inc., Corning, USA

Spitzen 10/20 µl	10/20 µl XL Graduated Tip/Filter Tip	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
Spitzen 1000 µl	1000 µl Graduated Tip/Filter Tip	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
Spitzen 200 µl	200 µl Bevelled Tip/Filter Tip	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
Spritze (20 ml)	Injekt 20 ml, Luer Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Spritzflasche	Nalgene belüftete Unitary LDPE-Sicherheits-spritzflaschen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Spritzflasche	Weithals-Spritzflaschen Serie 303 LDPE, rund, naturfarben, mit Gefahrgutaufdruck	KAUTEX TEXTRON GmbH & Co. KG, Bonn, DE
Sterilfilter	Millex-GS, Sterile Filter Unit with MF-Millipore MCE Membrane, 0,22 µm	Merck Millipore Ltd., Burlington Massachusetts, USA
Subliment	Keratinocyte-SFM Medium (Kit) with L-glutamine, EGF, and BPE	Gibco Corp. Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Verschlussfolie	Parafilm "M"	Bemis Company Inc., Neenah, Wisconsin, USA

Zellkulturflasche	cell culture flasks, 650 ml, 175 cm ² , PS, red filter screw cap, TC, clear, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellschaber	Cell Lifter, Polyethylene, sterile	Corning Inc., Corning, NEW York, USA
Zellsieb (100 µm)	Cell Strainer; 100 µm Nylon	Corning Inc., Corning, NEW York, USA
Zellsieb (100 µm)	EASYstrainer, 100 µm, für 50ml Röhrchen, gelb, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE

Tabelle 2.2: Verzeichnis der Verbrauchsmaterialien

2.3 Substanzen

Substanz	Produktbezeichnung	Produzent
Cell Titer Blue	Cat. Nr. G 8081	Promega Corp., WI 53177 USA
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Milch	Milchpulver, blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Blotting Membran	Nitrocellulose Blotting-Membran (Porengröße 0,2 µm)	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Blotting Papier	Blotting Filter Papers, 2.5 mm thickness, 7.5 cm x 8.4 cm	Invitrogen, Carlsbad, USA

Dispase Typ II	Dispase II (neutral protease, grade II); from Bacillus polymyxa, lyophilizate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
GDF-5	NR 8340 - G5	R&D Systems, Minneapolis, USA
Green CMFDA	SC 396581 LOT # L1115	Santa Cruz Biotechnology, Dallas Texas, USA
Bisbenzimid	33342 Hoechst	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
NaCl	Sodium chloride	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Penicillin & Streptomycin Mischung	Penicillin-Streptomycin; 10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, sterile filtered, for cell culture	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Propidiumiodid	P 4170	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
QVD	Q-VD-OPh hydrate	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Trypsin	Trypsin-EDTA 10X; sterile filtered	Biowest, Nuaille, FR

Tabelle 2.3: Verzeichnis der Substanzen, Lösungen und Puffer

2.4 Software

Software	Produktbezeichnung	Produzent
Endnote	Endnote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, Pennsylvania, USA
Office-Paket	Microsoft Office 2010 (Office Professional Plus)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Office-Paket	Microsoft Office 2016 (Office 365 Pro Plus)	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Tabelle 2.4: Verzeichnis der genutzten Software

3 Methoden

3.1 Anmerkung

Ein Teil der genutzten Methodiken basiert auf den *standard operating procedures* (SOPs) des Labors der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. In Rücksprache mit Prof. Dr. rer. nat. Suschek erfolgte die teilweise wörtliche Übernahme der SOPs. Diese Anmerkung dient der Vermeidung von Plagiaten und Plagiatsvorwürfen.

3.2 Zellen

Die Keratinozyten wurden aus Abdominalplastiken extrahiert, die durch die Klinik für plastische und ästhetische Chirurgie der Merheim-Kliniken der Stadt Köln zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben wurden bereits durch die Klinik selbst anonymisiert, exklusive des Alters, des Geschlechts und des Ortes der Entnahme. Gemäß der Richtlinien der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studennummer 3634) haben die Patientinnen und Patienten ihr Einverständnis erklärt, dass das von ihnen entnommene Gewebe zu Forschungszwecken genutzt werden darf. Des Weiteren wurden primäre, humane epidermale Keratinozyten der Firma Gibco verwendet. Diese wurden aus den Präputien von Neugeborenen, die 14 Tage oder jünger waren, isoliert und gepoolt.

3.3 Allgemeines

Alle Arbeiten an Zellkulturen wurden mit Hilfe einer Sterilbank unter sterilen Kautelen realisiert. Die für die Zellkulturen benötigten und genutzten Materialien sowie Substanzen wurden entweder steril bezogen oder vor dem Gebrauch steril filtriert beziehungsweise autoklaviert. [57] Die Lagerung und Nutzung der Medien und Substanzen erfolgte den Herstellervorgaben entsprechend. Vor ihrem Gebrauch in der Zellkultur wurden Medien und Substanzen auf Temperaturen zwischen 21 °C und 37 °C erhitzt, falls nicht anders durch den Hersteller angegeben. [57]

3.4 Isolierung von Keratinozyten aus der Haut

Initial wird die Kutis vom subkutanen Fettgewebe separiert. Dies erfolgt unter Zuhilfenahme eines Einwegskalpells und einer chirurgischen Pinzette. Die Kutis wird dann in circa 5 mm breite und 10 bis 15 mm lange Streifen geschnitten. Die Kutisstreifen werden folgend in ein 50-ml-Falcon überführt, das je nach

Materialmenge 15 bis 30 ml Dispaselösung enthält. Im Anschluss wird das Falcon mit den Hautstreifen für 24 Stunden bei 4 °C auf einem Roller inkubiert. Nach den 24 Stunden werden die Kutisstreifen in einem auf 37 °C vorgeheizten Wasserbad für 10 bis 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion der Dispaselösung wird durch die Zugabe von 20 ml eiskaltem PBS in das Falcon mit den Kutisstreifen gestoppt. Mit Hilfe einer anatomischen und einer chirurgischen Pinzette erfolgt die Trennung der Epidermis von der Dermis. Dabei wird die Dermis mit Hilfe der chirurgischen Pinzette fixiert und die graue Phase, das heißt die Epidermis, mit der anatomischen Pinzette gelöst und in ein neues 50-ml-Falcon überführt. In dieses 50-ml-Falcon werden dann 5 ml einer 1:10-Lösung von Trypsin und EDTA und 10 ml PBS überführt. Das Falcon, das die Epidermis enthält, wird anschließend für 10 Minuten bei 37 °C im Brutkasten inkubiert und darauffolgend gevortext. Nach dem Vortexen werden 15 ml kaltes FCS in das Falcon hinzugegeben, um die chemische Reaktion zu stoppen. Nun werden die epidermalen Spalten aus dem Falcon entnommen und über ein Teflonsieb mit der Porengröße 50 bis 100 µm in ein neues 50-ml-Falcon gestrichen und mit kaltem PBS nachgespült. Nachdem alle Epidermisstreifen gesiebt wurden, wird das Falcon, das diese enthält, für 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand des Falcons wird vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wird aufgenommen und in eine Petrischale mit 13 ml Keratinozytenmedium überführt. Der Status der Keratinozyten in der Petrischale wird mit Hilfe eines Mikroskops kontrolliert. Dann erfolgt die Inkubation der Keratinozyten für 24 Stunden bei 37 °C im Brutkasten. Nach den ersten 24 Stunden wird ein halber Mediumwechsel durchgeführt. Eine Passagierung der Zellen erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von 90 bis 100 % in der Petrischale. [57-59]

3.5 Zellkultur

3.5.1 Passagierung der Zellen

Die Passagierung ist definiert als das Ablösen der adhärenen Zellen durch Trypsin-Verdau und das erneute Adhärenieren der Zellen in einem neuen Kulturgefäß. Mit jeder Passagierung erhöht sich die Zahl der Passage um eins. Eine Passagierung erfolgte stets im Verhältnis 1:2. [57] Für alle Versuche wurden keine Zellen der Passage sechs oder höher genutzt. Die Keratinozyten werden nach einmaligem Waschen der Petrischale mit PBS w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺ durch Trypsin/EDTA in einer 1:10-Konzentration vom Boden der Petrischale gelöst. Dabei wird die Petrischale nach Zugabe der Trypsin/EDTA-Lösung für drei bis zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei darf die maximale Dauer von zehn Minuten nicht überschritten werden, da ansonsten eine Schädigung der Keratinozyten droht, sodass mit einer Frequenz von drei bis fünf Minuten unter dem Mikroskop eine Sichtkontrolle erfolgt. Als bald sich ein Lösen der Keratinozyten vom Boden der Petrischale darstellt, wird mittels eines kontrollierten Klopfens gegen die Petrischale, dem Shakeoff-Verfahren, ein vollständiges Separieren der Keratinozyten initiiert. Optional besteht die Möglichkeit, wenige adhärenente Keratinozyten mit Hilfe eines Zellschabers zu lösen, wobei hier

eine vorsichtige Nutzung geboten ist, da ansonsten die Möglichkeit einer mechanischen Zerstörung der Keratinozyten besteht. Anschließend wird die Enzymreaktion durch die Trypsin/EDTA-Lösung mittels 5 ml Trypsin-Neutralisator terminiert, worauf die Zentrifugation der Zellsuspension bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten erfolgt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 1 bis 2 ml Medium suspendiert und in eine Petrischale mit 13 ml Keratinozytenmedium überführt. Alternativ besteht die Möglichkeit einer Resuspendierung in Einfriermedium. [57, 59]

3.5.2 Vitalitätstest und Lebendzellzahlermittlung

Die Zellvitalität und die Lebendzellzahl werden mit der sogenannten Trypanblau-Färbung eruiert. Das bedeutet, dass initial eine Neubauer-Zählkammer vorbereitet werden muss, indem Deckglas und Objektträger gründlich gereinigt werden und dann das Deckglas angehaucht und folgend fest auf den Objektträger gedrückt wird, sodass sich Interferenzringe bilden. Dann werden die Zellen, wie bereits in den oberen Abschnitten beschrieben, mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung gelöst, sodass das entstandene Pellet in 1 ml Keratinozytenmedium suspendiert werden kann. Zehn Mikroliter dieser Zellsuspension werden im 1:1-Verhältnis mit Trypanblau in ein 1,5-ml-Epiröhrchen überführt und kurz durchmischt. Zehn Mikroliter dieser Suspension werden nun auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Trypanblau ist ein saurer Azofarbstoff, der nur durch die Zellwände toter und nicht vitaler Zellen diffundiert, sodass letale Zellen blau gefärbt werden und die vitalen Zellen im Mikroskop hinter dem blauen Hintergrund der Trypanblaulösung weiß erscheinen. Dies ermöglicht sowohl die Bestimmung des Anteils lebender Zellen in der Zellsuspension als auch eine Bestimmung der Lebendzellzahl pro Milliliter. Der Mittelwert von vier definierten äußeren Linien aller vier Großquadranten, die mit Hilfe eines Handzählers ausgezählt werden, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor ergibt die Zellzahl pro Milliliter:

Zellzahl pro Milliliter = Zahl der gezählten Zellen/4 x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10⁴ (Kammerfaktor)

Die Gesamtzellzahl wiederum ist das Produkt der Zellzahl pro Milliliter multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension:

Gesamtzahl = Zellzahl/ml x Gesamtvolumen der Zellsuspension [57, 59]

3.5.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung werden die Zellen mittels Trypsin gelöst und die Zellzahl wird unter zu Hilfenahme der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 1200 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten wird der Überstand vollständig und vorsichtig abgesaugt und das Pellet anschließend in

Einfriermedium resuspendiert ($> 1 \times 10^6$ Zellen/ml). Ab diesem Zeitpunkt erfolgen alle weiteren Schritte auf Grund der Eigenschaften von DMSO bei Temperaturen über $0\text{ }^\circ\text{C}$ als Arbeiten auf Eis. Die im Einfriermedium resuspendierten Zellen werden anschließend zur Kryokonservierung in Reaktionsgefäße übertragen und es erfolgt die Absenkung der Temperatur mittels Kryoeinfriergerät mit einer Frequenz von $1\text{ }^\circ\text{C}$ pro Minute. Für eine Lagerung der kryokonservierten Zellen unter drei Monaten wird eine Kühltruhe gewählt, die Temperaturen von minus $80\text{ }^\circ\text{C}$ gewährleistet. Falls die Zellen länger als drei Monate gelagert werden müssen, werden diese im Flüssigstickstoff bei minus $196\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. [57, 59]

3.5.4 Auftauen der Zellen

Jene Zellen, die nach der Kryokonservierung erneut in Kultur genommen werden, werden initial im Wasserbad bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ aufgetaut und anschließend in ein 50-ml-Falcon mit Proliferationsmedium im Verhältnis von 1:10 aufgenommen. Das Verhältnis dient dazu, dass das DMSO auf eine subtoxische Konzentration verdünnt wird. Das 50-ml-Falcon wird nun für 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, sodass anschließend der Überstand vorsichtig abgesaugt werden kann und das zytotoxische DMSO entfernt wird. Anschließend wird das Pellet in 1–2 ml Proliferationsmedium suspendiert und in eine Petrischale mit 13 ml Medium überführt. Um avitale oder nicht adhärente Zellen oder Zellbestandteile zu entfernen, werden die Zellen nach 24 Stunden mit PBS w/o Ca^{2+} w/o Mg^{2+} gewaschen und anschließend in frischem Proliferationsmedium suspendiert und im Brutkasten bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. [57, 59]

3.6 **Etablierung eines Verbrennungsmodells**

Das Verbrennungsmodell, das in diesem Promotionsvorhaben und somit in den kommenden Versuchen genutzt wird, basiert auf dem Verbrennungsmodell von Wergen. Er hat es in der Dissertation „Entwicklung eines in-vitro-Modells zur Untersuchung des sekundären Wundprogresses in der Stase-Zone von Verbrennungsverletzungen“ genutzt und etabliert. Für diese Arbeit wurde es lediglich in der Handhabung modifiziert. [60]

Die grundsätzlichen Anforderungen an das Verbrennungsmodell sind es, die Parameter ‚Expositionsstärke‘ und ‚-dauer‘ so genau als möglich zu exprimieren und aufrechtzuerhalten, jedoch auch in der Wahl dieser variabel zu sein.

Hierzu wird ein Heizblock genutzt. Dieser hat im Gegensatz zu einer offenen Flamme den Vorteil, dass die Temperatur in Grad Celsius über das Gerät selbst genau eingestellt werden kann und keinen Temperaturschwankungen unterliegt. Zusätzlich geht die Handhabung des Heizblockes mit einer deutlich geringeren Gefährdung einher als zum Beispiel die Nutzung einer offenen Flamme. Um die

Temperaturexposition auf die Well-Platten gleichmäßig auszuüben, wurde in der laboreigenen Werkstatt eine wärmeleitende Bodenplatte aus Metall hergestellt. Auf diese wird zur Erhitzung die Well-Platte positioniert. Während der Temperaturexposition wird zusätzlich ein Gewicht von 1,2 kg auf die Well-Platte gelegt, um eine wärmeinduzierte Verformung des Plastiks so gut als möglich zu verhindern. Neben dem Heizblock wird ein Eisbad mit einem Fassungsvermögen von ca. 1500 ml aufgebaut, um nach der Wärmeexposition die der Hitze ausgesetzten Well-Platten wieder auf Raumtemperatur zu kühlen und so eine verlängerte thermisch induzierte Schädigung zu verhindern. Während der Versuche wird ein Infrarotthermometer genutzt, um zu jedem Zeitpunkt der Versuche einen Temperaturverlauf zu visualisieren. Hierbei werden bezüglich des Abstandes die Herstellervorgaben berücksichtigt.



Abbildung 3.1 zeigt den Versuchsaufbau des Kontaktverbrennungsmodells nach Wergen, dabei wird auf den Thermoheizblock eine hausgeigen hergestellte Aluminiumplatte zur gleichmäßigen Erhitzung der über ihr liegenden 12-Well-Platte gelegt. [60]

3.7 Temperaturverlauf

In ein repräsentatives Well einer 24-Well-Platte, in diesem Fall das Well B3, werden 0,5 ml Keratinozytenmedium hinein pipettiert. Die Well-Platte wird nun über 24 Stunden in einem Brutkasten bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Ein Thermoheizblock und eine speziell angepasste Metallplatte, die zur gleichmäßigen Hitzeübertragung zwischen Thermoheizblock und Well-Platte dient, werden vier Stunden vor den drei unterschiedlichen Versuchsansätzen auf die Betriebstemperaturen von jeweils 60 °C, 80 °C und 100 °C erhitzt.

Die 24-Well-Platte wird aus dem Brutkasten genommen, auf direktem Wege (ca. 4 Sekunden) auf den Thermoblock gelegt und je nach Versuchsansatz bei 60 °C, 80 °C oder 100 °C für bis zu 40 Sekunden erhitzt. Unmittelbar danach erfolgt die Kühlung der Well-Platte für 20 Sekunden im danebenliegenden Eisbad. Währenddessen wird durchgehend, das heißt ab Entnahme der Well-Platte aus dem Brutkasten, die Temperatur des repräsentativen Wells mittels Infrarot-Thermometer gemessen und mittels beiliegender Software digitalisiert. Dabei ist nach Entnahme aus dem Brutkasten der Deckel der Well-Platte zu entfernen, da es ansonsten zu einer Verfälschung der Temperaturmessung kommt. Des Weiteren ist der durch den Hersteller angegebene Abstand zwischen Well-Platte und Thermometer einzuhalten. Da keine feste Vorrichtung besteht, die den Abstand und die Abmessung zwischen Thermometer und Well-Platte konstant hält, kann es durch Abstandsschwankungen teilweise zu Temperaturschwankungen kommen.

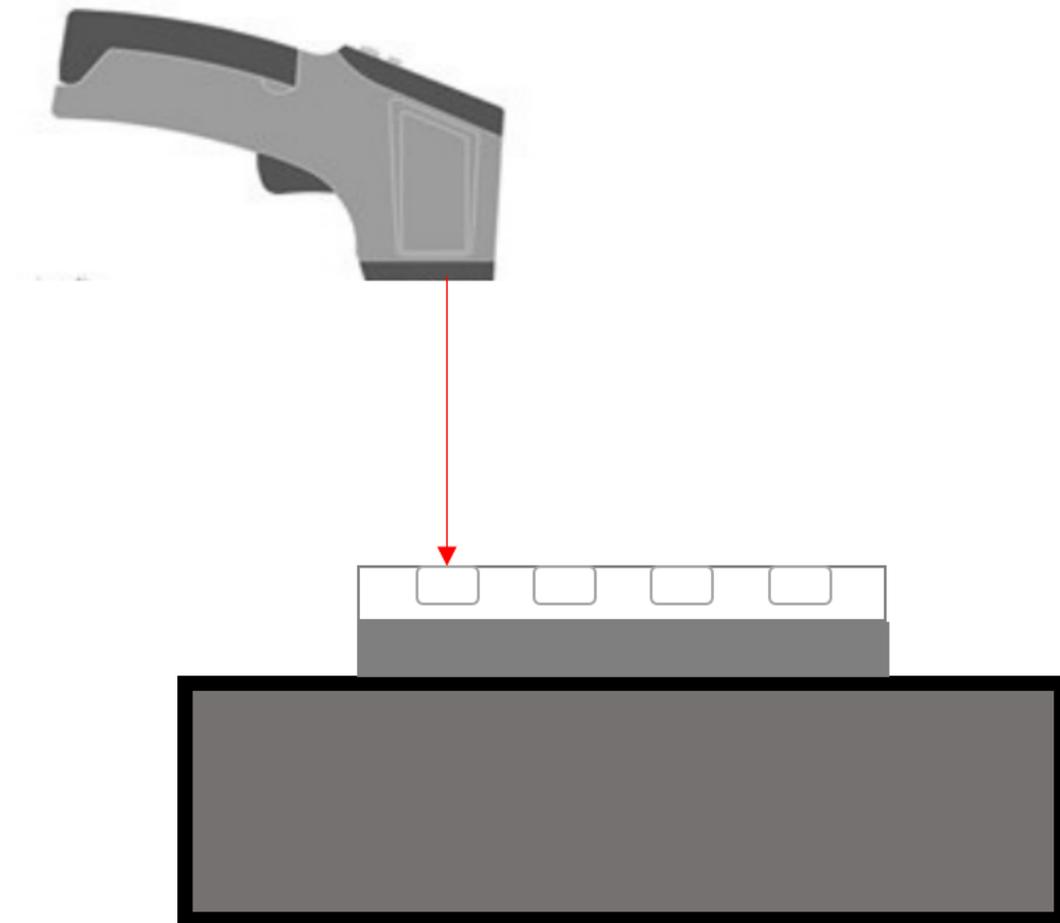


Abbildung 3.2 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Temperaturmessung. Dabei sind von unten nach oben angeordnet: der Thermoheizblock, die Aluminiumplatte, die Well-Platte und das Infrarotthermometer. Die Abbildung wurde von Wegner et al. 2022 adaptiert und modifiziert. [60]

3.8 Proliferationskurve von unbehandelten Keratinozyten

In eine 6-Well-Platte werden pro Well 50 000 Keratinozyten in 1,5 ml Keratinozytenmedium ausplattiert. Zur Adhäsion der Keratinozyten wird die 6-Well-Platte für 24 Stunden bei 37 °C im Brutkasten inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgt die Adhäsionskontrolle am Mikroskop. Darauf wird die Messung der Zellzahl mittels des CellTiter-Blue®-Assays nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Jedes Well der 6-Well-Platte wird für eine Messung zu einem unterschiedlichen Messzeitpunkt genutzt. Die sechs Messzeitpunkte sind nach der 24-stündigen Inkubation 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden. Wie üblich erfolgt alle 24 bis 48 Stunden ein Teilmediumwechsel. Des Weiteren wird die 6-Well-Platte zwischen den Messungen im Brutkasten inkubiert.

3.9 Proliferationskurve von unbehandelten und thermisch geschädigten Keratinozyten

In zwei 24-Well-Platten werden pro Well 50 000 Keratinozyten in 0,5 ml Keratinozytenmedium ausplattiert. Dabei dient eine Platte als Kontroll- und eine als Untersuchungsgruppe. Beide Platten werden zur Zelladhäsion 24 Stunden im Brutkasten bei 37 °C inkubiert. Nach 20 Stunden, somit 4 Stunden vor dem Versuch, werden der Thermoheizblock und die Metallplatte auf eine Betriebstemperatur von jeweils 60 °C, 80 °C und 100 °C erhitzt, abhängig vom Versuchsansatz. Zwei Minuten vor dem Versuch wird neben dem Thermoheizblock das Eisbad errichtet.

Nach 24 Stunden werden die zwei 24-Well-Platten aus dem Brutkasten genommen und die Adhäsion der Keratinozyten wird unter dem Mikroskop kontrolliert. Darauf folgt unter der Arbeitsbank das Absaugen des Keratinozytenmediums in jedem einzelnen Well beider Platten bis auf 0,1 ml Medium. Die 24-Well-Platte der Untersuchungsgruppe wird nun auf die erhitzte Metallplatte des Thermoblocks gelegt. Dabei wird in drei Versuchsansätzen der Thermoheizblock auf je 60 °C, 80 °C und 100 °C erhitzt. Bei 60 °C erfolgt in drei Versuchsreihen eine thermische Schädigung der 24-Well-Platte für je 20, 30 und 40 Sekunden. Bei 80 °C erfolgt in zwei Versuchsansätzen eine thermische Schädigung der 24-Well-Platten für je 10 und 15 Sekunden. Im letzten Versuchsansatz erfolgt bei 100 °C die thermische Schädigung für 10 Sekunden. Des Weiteren wird während der thermischen Schädigung auf den Deckel der 24-Well-Platte ein planes Gewicht von 1,2 kg gelegt, um eine thermische Veränderung und somit eine ungleiche Erhitzung der Platte zu verhindern.

Nach der thermischen Schädigung werden die 24-Well-Platten der Untersuchungsgruppe für 20 Sekunden im Eisbad abgekühlt. Die Zeit wird während der gesamten Versuche mit einer Stoppuhr gemessen, die alle 10 Sekunden ein akustisches Signal ertönen lässt. Es erfolgt im Anschluss die Gabe von 0,4 ml Proliferationsmedium in jedes einzelne Well beider Platten, worauf die Untersuchungs- und die Kontrollplatte wieder bei 37 °C bis zu den jeweiligen Messzeitpunkten inkubiert werden. Es erfolgt wie gewohnt alle 24 bis 48 Stunden ein Teilmediumwechsel. Die Messzeitpunkte sind 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden. Die Auswertung erfolgt mittels CTB.

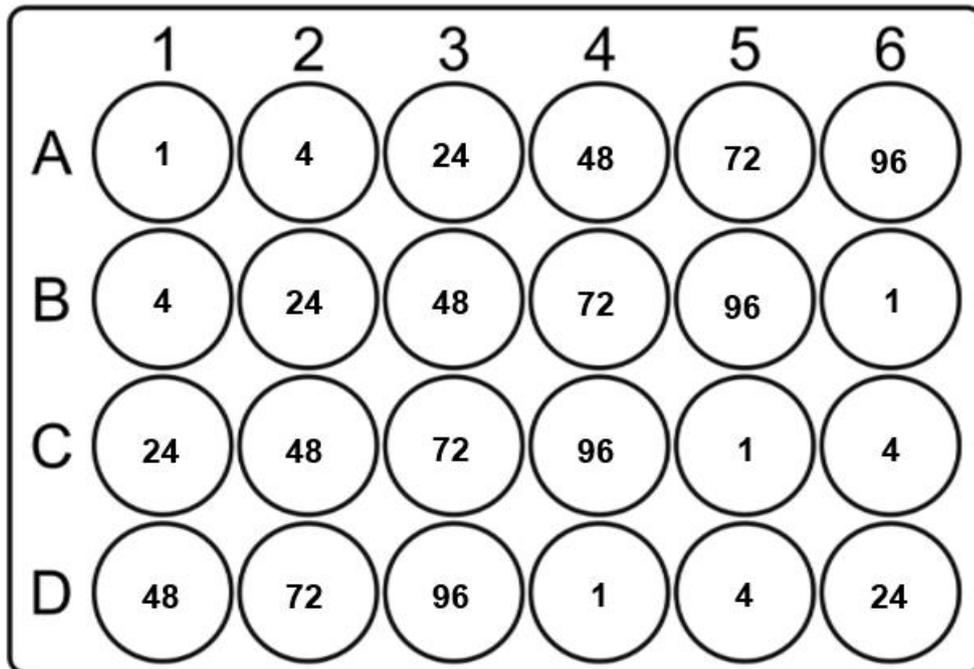


Abbildung 3.3 zeigt eine schematische Darstellung einer 24-Well-Platte, wobei in jedes Well ca. 50 000 Keratinozyten in 0,5 ml Keratinozytenmedium pipettiert werden. Dabei dient jedes Well der Messung eines unterschiedlichen Zeitpunktes, sodass jeder Messzeitpunkt viermal repräsentiert wird.

3.10 Proliferationskurve thermisch geschädigter Keratinozyten mit einem stündlichen Mediumwechsel in den ersten sechs Stunden

In zwei 24-Well-Platten werden pro Well 50 000 Keratinozyten in 0,5 ml Keratinozytenmedium ausplattiert, dabei dient eine Platte als Kontroll- und eine als Untersuchungsgruppe. Beide Platten werden zur Zelladhäsion 24 Stunden im Brutkasten bei 37 °C inkubiert. Nach 20 Stunden, damit 4 Stunden vor dem Versuch, werden der Thermoheizblock und die Metallplatte auf die Betriebstemperatur von 80 °C erhitzt. Zwei Minuten vor dem Versuch wird neben dem Thermoheizblock das Eisbad errichtet. Nach 24 Stunden werden die zwei 24-Well-Platten aus dem Brutkasten genommen und die Adhäsion der Keratinozyten wird unter dem Mikroskop kontrolliert. Darauf folgt in der Arbeitsbank das Absaugen des Keratinozytenmediums in jedem einzelnen Well beider Platten bis auf 0,1 ml Medium. Die 24-Well-Platte der Untersuchungsgruppe wird nun für 10 Sekunden bei 80 °C auf die erhitzte Metallplatte des Thermoheizblocks gelegt. Des Weiteren wird auf den Deckel der 24-Well-Platte ein planes Gewicht von 1200 g gelegt, um eine thermische Veränderung und somit eine ungleiche Erhitzung der Platte zu verhindern. Nach der thermischen Schädigung wird die 24-Well-Platte für 20 Sekunden im Eisbad abgekühlt. Die Zeit wird während des Versuchs mit einer Stoppuhr gemessen, die alle 10 Sekunden ein akustisches Signal ertönen lässt. Nach der thermischen Schädigung erfolgt die Gabe von 0,4 ml Medium in jedes

einzelne Well beider Platten, worauf die Kontroll- und die Untersuchungsplatte wieder bei 37 °C bis zu den jeweiligen Messzeitpunkten inkubiert werden. Es erfolgt wie gewohnt alle 24 bis 48 Stunden ein Teilmediumwechsel. Zusätzlich zu diesem Teilmedienwechsel wird in den ersten 6 Stunden nach der thermischen Schädigung stündlich das Medium der Wells der Untersuchungsplatte gewechselt. Die Messzeitpunkte sind 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des CTB.

3.11 Proliferationskurve einer Keratinozytenpopulation, die mit GDF-5 oder QVD behandelt wurde

In drei 6-Well-Platten werden pro Well 50 000 Keratinozyten in 1,5 ml Keratinozytenmedium ausplattiert. Zur Adhäsion der Keratinozyten werden die 6-Well-Platten für 24 Stunden bei 37 °C im Brutkasten inkubiert. Nach 23 Stunden erfolgt die Gabe von 1 µg/ml GDF-5 in jedes Well einer 6-Well-Platte und von 10 mM/ml QVD in jedes Well der anderen 6-Well-Platte. Dabei dient eine dritte Platte als Kontrolle. Die gewählten Endkonzentrationen der Apoptoseinhibitoren stammen für GDF5 mit einer Dosis von 1 µg/ml von Liu et al.. [52] Die Konzentration der Stammlösung des QVD mit Medium im Verhältnis 1:1000 auf 10 µM wurde nach Wergen et al. verdünnt. [52, 60] Darauf erfolgt die Messung der Zellzahl mittels CTB. Jedes Well der 6-Well-Platte wird für eine Messung zu einem unterschiedlichen Messzeitpunkt genutzt. Die Messzeitpunkte sind nach der 24-stündigen Inkubation 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden. Wie üblich erfolgt alle 24 bis 48 Stunden ein Teilmediumwechsel. Des Weiteren wird zwischen den Messungen die Platte im Brutkasten bei 37 °C inkubiert.

3.12 Proliferationskurve thermisch geschädigter Keratinozyten, die eine Stunde vor thermischer Schädigung mit GDF-5 oder QVD behandelt wurden

Auf zwölf 24-Well-Platten werden 50 000 Keratinozyten in die zentralen sechs Wells in 0,5 ml Keratinozytenmedium ausplattiert. Sechs 24-Well-Platten dienen als Kontroll- und die anderen sechs als Untersuchungsgruppe, wobei je eine Platte einen der sechs Messzeitpunkte (1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden) repräsentiert. Alle Platten werden zur Zelladhäsion bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Nach 20 Stunden, damit 4 Stunden vor dem Versuch, wird der Heizblock auf eine Betriebstemperatur von 80 °C erhitzt. Eine Stunde vor dem Versuch werden die Apoptoseinhibitoren GDF-5 und QVD in je drei Brunnen jeder Testplatte in den oben genannten Dosen (beschrieben in Kapitel 3.11) zugegeben. Nach 24 Stunden Inkubation wird die Zellhaftung kontrolliert. Aus den zentralen sechs Brunnen aller Platten wird alles bis auf 0,1 ml Medium extrahiert und aufgefangen. Anschließend wird der thermische Schaden an den Keratinozyten durch Erhitzen der

Untersuchungsplatten für 10 Sekunden am Heizblock durchgeführt. Auf den Deckel der 24-Well-Platten wird ein planes Gewicht von 1200 g gelegt, um eine thermische Veränderung und somit eine ungleiche Erhitzung der Platte zu verhindern. Unmittelbar danach werden die beheizten Platten im Eisbad für 20 Sekunden gekühlt. In den sechs zentralen Brunnen aller Platten wird 0,4 ml des aufgefangenen Keratinozytenmediums hinzupipettiert. Alle Platten werden bis zu den jeweiligen Messzeitpunkten bei 37 °C inkubiert. Nach 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden wird die Zellzahl jeder Kontroll- und Untersuchungsplatte im Vergleich mittels des CellTiter-Blue®-Assays gemessen. Die Einhaltung der Zeit wird während des Versuchs mit einer Stoppuhr überprüft, die alle 10 Sekunden ein akustisches Signal ertönen lässt.

3.13 Proliferationskurve thermisch geschädigter Keratinozyten, die eine Stunde nach thermischer Schädigung mit GDF-5 oder QVD behandelt wurden

Auf zwölf 24-Well-Platten werden 50 000 Keratinozyten in die zentralen sechs Wells in 0,5 ml Keratinozytenmedium ausplattiert. Sechs 24-Well-Platten dienen als Kontroll- und die anderen sechs als Untersuchungsgruppe, wobei je eine Platte einen der sechs Messzeitpunkte (1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden) repräsentiert. Alle Platten werden zur Zelladhäsion bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Nach 20 Stunden, demnach 4 Stunden vor dem Versuch, wird der Heizblock auf eine Betriebstemperatur von 80 °C erhitzt. Nach 24 Stunden Inkubation wird die Zellhaftung unter dem Mikroskop kontrolliert. Aus den zentralen sechs Brunnen aller Platten wird alles bis auf 0,1 ml Medium extrahiert. Anschließend wird der thermische Schaden an den Keratinozyten durch Erhitzen der Untersuchungsplatten für zehn Sekunden am Heizblock durchgeführt. Auf den Deckel der 24-Well-Platten wird ein planes Gewicht von 1200 g gelegt, um eine thermische Veränderung und somit eine ungleiche Erhitzung der Platte zu verhindern. Unmittelbar danach werden die beheizten Platten im Eisbad für 20 Sekunden gekühlt. In die sechs zentralen Brunnen aller Platten wird 0,4 ml Keratinozytenmedium pipettiert und alle Platten werden für eine weitere Stunde inkubiert. Nach dieser Stunde werden die Apoptoseinhibitoren GDF-5 und QVD in je drei Brunnen jeder Testplatte in den Dosen zugegeben, die bereits in Teil 3.11 erörtert wurden. Nach 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden wird die Zellzahl jeder Prüf- und Kontrollplatte im Vergleich mittels des CellTiter-Blue®-Assays gemessen. Die Einhaltung der Zeit wird während des Versuchs mit einer Stoppuhr überprüft, die alle 10 Sekunden ein akustisches Signal ertönen lässt.

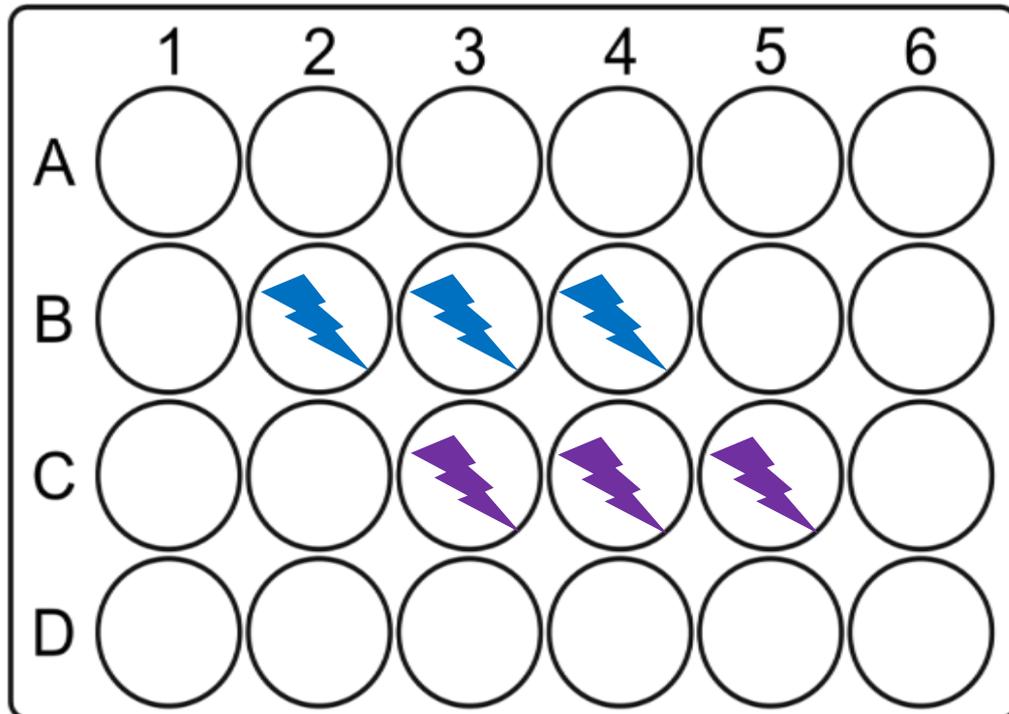


Abbildung 3.4 zeigt eine schematische Darstellung einer 24-Well-Platte der Untersuchungsgruppe, die in den Kapiteln 3.12 und 3.13 genutzt wurde, dabei sind die zentralen sechs Wells mit GDF-5 in Blau und QVD in Lila behandelt.

3.14 Messmethoden

3.14.1 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Der CellTiter-Blue®-Assay basiert auf der Reduktion des blauen Farbstoffs Resazurin in den violetten Farbstoff Resorufin durch lebende Zellen. Das Fluoreszenzmaximum von Resorufin liegt bei 590 nm.

Die zu untersuchenden Zellen werden eine Stunde vor dem jeweiligen Messzeitpunkt mit dem Proliferationsmedium benetzt, das eine Stunde vor dem jeweiligen Messzeitpunkt im Verhältnis 1:20 mit CellTiter-Blue® versetzt wird. Dabei ist zu beachten, dass für jede Versuchsreihe ein Blank mitgeführt werden muss. Zur Inkubation wird die 24-Well-Platte in Alufolie verpackt und für eine Stunde im Brutkasten bebrütet. Danach wird das mit CellTiter-Blue® versetzte Medium in eine 96-Well-Platte überführt, wobei 100 µl/Well in Doppelbestimmung auf die 96-Well-Platte und das jeweilige Blank übertragen werden. Die Messung erfolgt bei 590 nm im Victor (Filter: P540, F590) und wird durch die beiliegende Software digitalisiert. [61]

3.15 Statistik

Zur statistischen Berechnung der Signifikanz der vorangegangenen Versuchsreihen werden a priori eine Nullhypothese und Hypothesen (1, 2 ...) festgelegt. Damit die Nullhypothese verworfen werden kann, muss vor den Versuchen neben den Hypothesen ein sogenanntes Signifikanzniveau, auch Alphaniveau, festgelegt werden:

- $\text{Alpha} \leq 0,01/1\%$ -> hochsignifikant
- $\text{Alpha} \leq 0,05/5\%$ -> signifikant
- $\text{Alpha} > 0,05/5\%$ -> nicht signifikant

Das bedeutet, dass bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ die Nullhypothese verworfen wird. Die Daten wurden mit Hilfe des t-Tests ausgewertet. In den grafischen Darstellungen wird stets das arithmetische Mittel angezeigt, wobei die Fehlerbalken den Standardabweichungen entsprechen.

4 Ergebnisse

4.1 Temperaturverlauf

In der ersten Versuchsreihe soll gezeigt werden, welchen Einfluss die thermische Exposition auf ein repräsentatives Well einer 24-Well-Platte hat und wie sich die Temperaturen im Verlauf entwickeln, sodass anhand dieses Experiments ein erster Eindruck gewonnen werden kann, welchen thermischen Kräften in den Folgeversuchen die Keratinozyten ausgesetzt sind.

Im ersten Teil ist dargestellt, wie die Temperatur innerhalb des repräsentativen Wells von 37,3 °C, bei einer thermischen Exposition von 60 °C in 40 Sekunden, auf 55,9 °C erhöht und im Eisbad innerhalb von 20 Sekunden auf 38,6 °C heruntergekühlt werden kann.

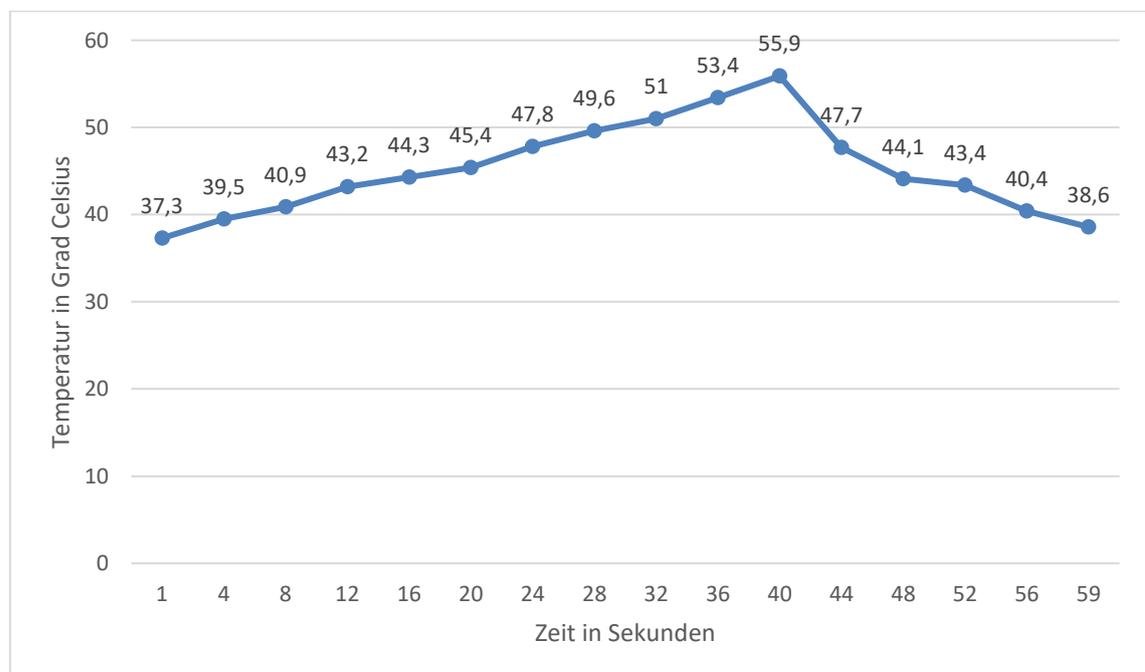


Abbildung 4.1.1 zeigt den durch die Digitalisierungssoftware gemittelten Temperaturverlauf eines repräsentativen Wells nach thermischer Schädigung der Well-Platte bei 60 °C für 40 Sekunden und anschließender Kühlung im Eisbad für 20 Sekunden, wobei der Temperaturverlauf mittels Infrarotkamera gemessen und gegen die Zeit in Sekunden dokumentiert wird (n = 3).

Bei einer thermischen Exposition des repräsentativen Wells von 80 °C für 20 Sekunden erhöht sich die Temperatur auf bis zu 72,2 °C und fällt innerhalb der 20 Sekunden im Eisbad auf 40,4 °C.

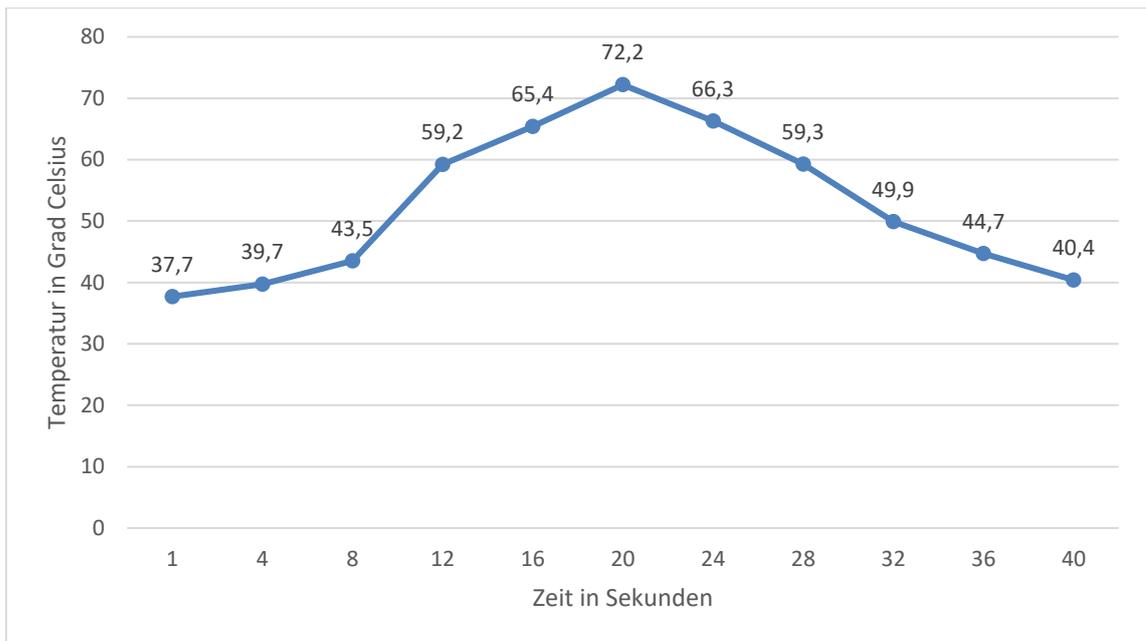


Abbildung 4.1.2 zeigt den durch die Digitalisierungssoftware gemittelten Temperaturverlauf eines repräsentativen Wells nach thermischer Schädigung der Well-Platte bei 80 °C für 20 Sekunden und anschließender Kühlung im Eisbad für 20 Sekunden, wobei der Temperaturverlauf mittels Infrarotkamera gemessen und gegen die Zeit in Sekunden dokumentiert wird (n = 3).

Im letzten Versuch der ersten Versuchsreihe ist die Temperaturentwicklung des repräsentativen Wells bei 100 °C für 15 Sekunden zu sehen. Die Maximaltemperatur, die nach 15 Sekunden erreicht wird, beträgt 82 °C. Nach 20 Sekunden im Eisbad sinkt die Temperatur des repräsentativen Wells auf 43,9 °C.

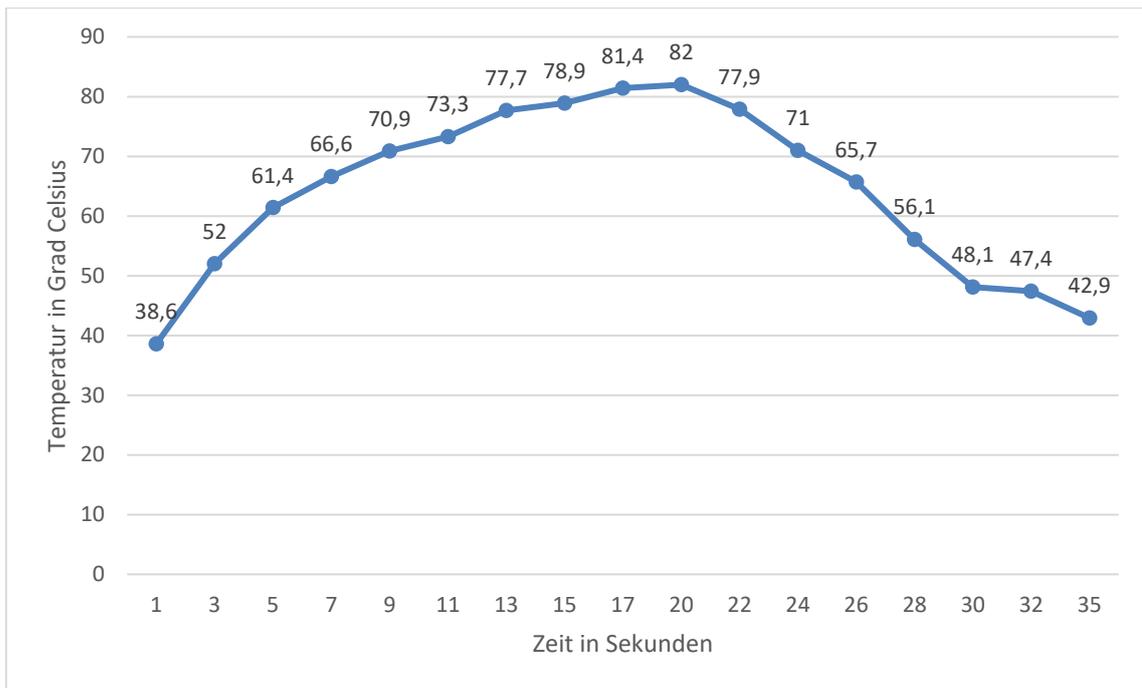


Abbildung 4.1.3 zeigt den durch die Digitalisierungssoftware gemittelten Temperaturverlauf eines repräsentativen Wells nach thermischer Schädigung der Well-Platte bei 100 °C für 15 Sekunden und anschließender Kühlung im Eisbad für 20 Sekunden, wobei der Temperaturverlauf mittels Infrarotkamera gemessen und gegen die Zeit in Sekunden dokumentiert wurde (n = 3).

4.2 Proliferationskurve von unbehandelten Keratinozyten

Im folgenden Versuch wird die Wachstumskurve einer Keratinozytenpopulation ohne thermische Schädigung zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden mittels CellTiter-Blue®-Assays in einer 6-Well-Platte dargestellt.

Die Nullhypothese besagt, dass die Keratinozytenpopulation zu einem unbestimmten Zeitpunkt nicht mehr weiterwächst, da die metabolischen Ressourcen und die Größe des Wells begrenzt sind und somit die weitere Proliferation der Keratinozyten limitieren. Die Alternativhypothese stellt wiederum dar, dass die Keratinozytenpopulation zu den oben genannten Messzeitpunkten keinerlei Limitation durch fehlende Ressourcen oder die Größe des Wells erfährt.

Wie anhand der unten beigefügten Abbildung 4.2 zu erkennen ist, wächst die Keratinozytenpopulation innerhalb des Messzeitraumes kontinuierlich weiter, wobei sich die gemessene Zellzahl in den 96 Stunden fast verdoppelt.

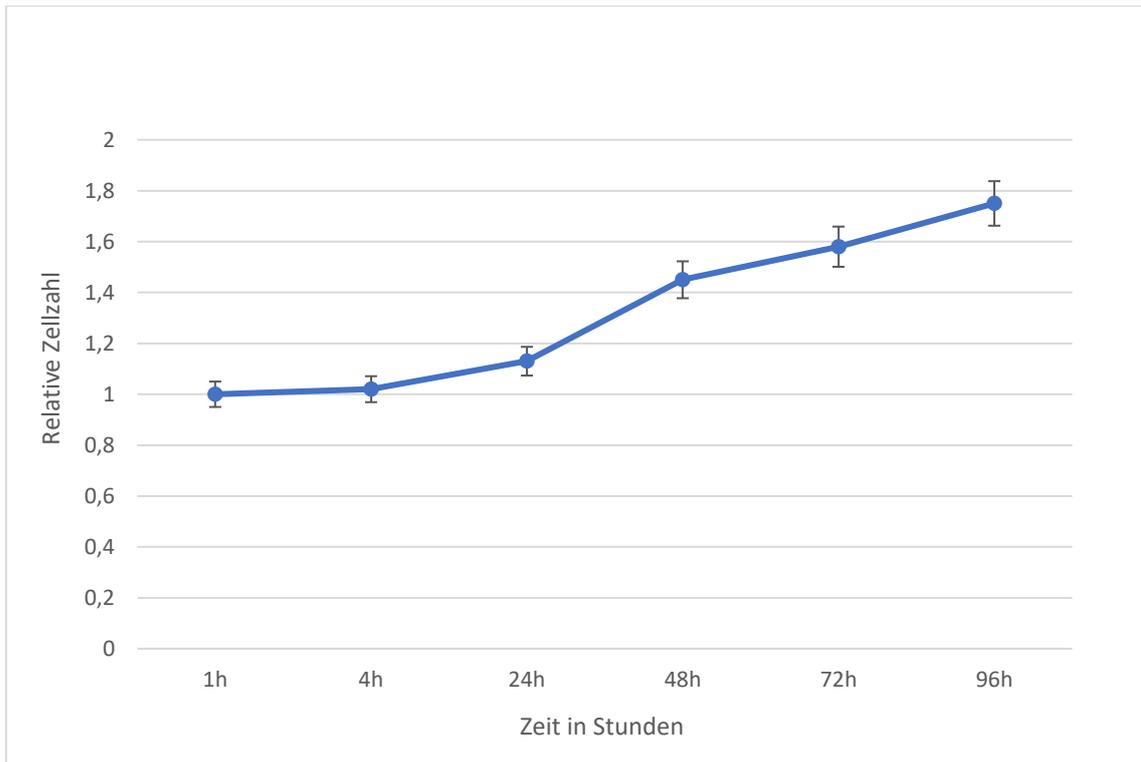


Abbildung 4.2 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene relative Zellzahl von unbehandelten Keratinozyten zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 3).

4.3 Proliferationskurve von Keratinozyten nach thermischer Schädigung

In den folgenden Experimenten wurden die Zellzahlen von unbehandelten Keratinozyten und thermisch geschädigten Keratinozyten zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden gemessen und miteinander verglichen.

Die Nullhypothese dieser Versuchsreihe besagt, dass die Zellzahlen der Kontrollgruppe und der thermisch geschädigten Gruppe im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede in der Zellproliferation zeigen und eine thermische Schädigung somit keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellzahl hat. Die Alternativhypothese ist, dass die Zellzahl der thermisch geschädigten Keratinozyten signifikant niedriger ist.

Im ersten Versuch dieser Versuchsreihe wird die Untersuchungsgruppe für 20 Sekunden mit 60 °C behandelt. In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich kein signifikanter Unterschied nach 1 Stunde ($p = 0,205372$), nach 4 Stunden ($p = 0,12788776$), nach 24 Stunden ($p = 0,30723206$), nach 48 Stunden ($p = 0,2723305$) und nach 72 Stunden ($p = 0,09198893$). Nach 96 Stunden ist ein signifikanter Unterschied zu eruieren ($p = 0,04304794$). Das bedeutet, dass die Alternativhypothese nur für den letzten Messzeitpunkt verifiziert werden kann.

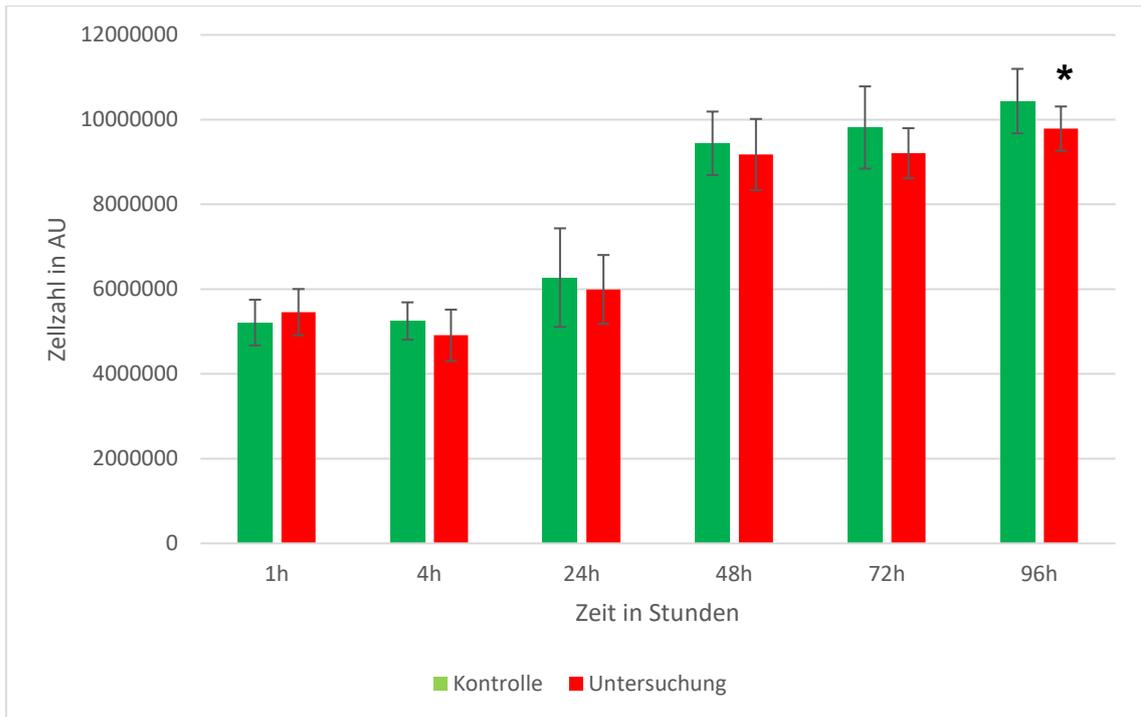


Abbildung 4.3.1 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* von unbehandelten Keratinozyten und thermisch geschädigten Keratinozyten bei 60 °C für 20 Sekunden zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 8). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

Im zweiten Versuch wird die Untersuchungsgruppe für 30 Sekunden mit 60 °C behandelt. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich kein signifikanter Unterschied nach 1 Stunde ($p = 0,485147$), nach 4 Stunden ($p = 0,27276576$), nach 24 Stunden ($p = 0,45155575$), nach 48 Stunden ($p = 0,39019662$), nach 72 Stunden ($p = 0,32600255$) und auch nicht nach 96 Stunden ($p = 0,38774941$). Das bedeutet, dass die Alternativhypothese für diesen gesamten Versuch falsifiziert werden muss.

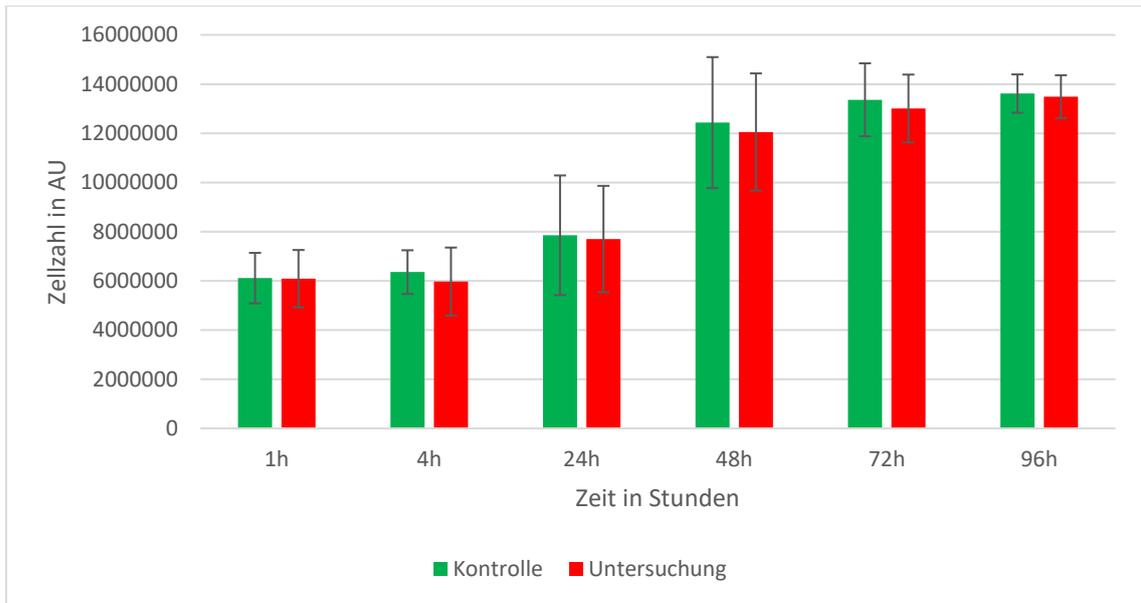


Abbildung 4.3.2 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* von unbehandelten Keratinozyten und thermisch geschädigten Keratinozyten bei 60 °C für 30 Sekunden zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 8). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

Im dritten Experiment dieser Versuchsreihe wird die Untersuchungsgruppe für 40 Sekunden mit 60 °C behandelt. In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich kein signifikanter Unterschied nach 1 Stunde ($p = 0,233642$), nach 4 Stunden ($p = 0,24535113$), nach 24 Stunden ($p = 0,18733303$), nach 48 Stunden ($p = 0,11059255$), nach 72 Stunden ($p = 0,44115711$) und auch nicht nach 96 Stunden ($p = 0,44537556$). Das bedeutet, dass die Alternativhypothese ebenfalls für diese gesamte Versuchsreihe falsifiziert werden muss.

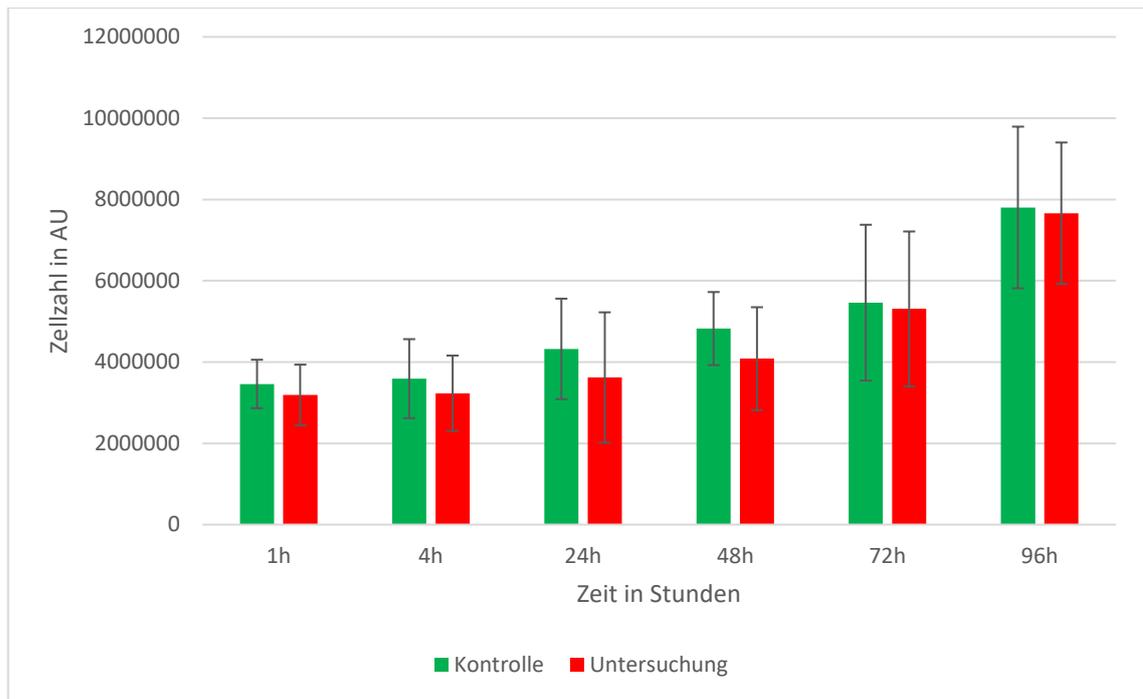


Abbildung 4.3.3 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* von unbehandelten Keratinozyten und thermisch geschädigten Keratinozyten bei 60 °C für 40 Sekunden zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 8). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

Im vierten Versuch wird die Untersuchungsgruppe für 10 Sekunden einer thermischen Exposition von 80 °C ausgesetzt. In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich ein signifikanter bis hochsignifikanter Unterschied nach 1 Stunde ($p = 0,036834$), nach 4 Stunden ($p = 0,0003426$), nach 24 Stunden ($p = 0,00014473$), nach 48 Stunden ($p = 1,82967E-05$), nach 72 Stunden ($p = 0,00073516$) und auch nach 96 Stunden ($p = 0,00025568$). Das bedeutet, dass die Alternativhypothese für alle Messzeitpunkte dieser Versuchsreihe verifiziert werden muss.

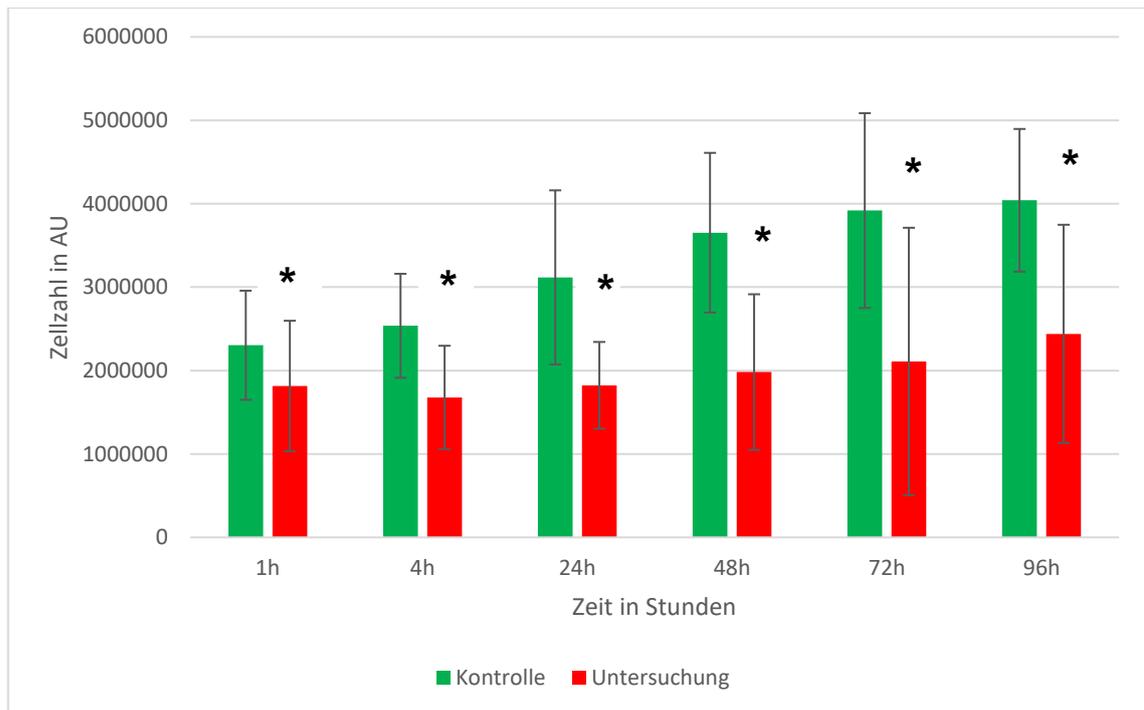


Abbildung 4.3.4 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* von unbehandelten Keratinozyten und thermisch geschädigten Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 16). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

Im fünften Experiment dieser Versuchsreihe wird die Untersuchungsgruppe für 15 Sekunden mit 80 °C behandelt. In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich ein signifikanter bis hochsignifikanter Unterschied nach 1 Stunde ($p = 0,005478$), nach 4 Stunden ($p = 0,00037043$), nach 24 Stunden ($p = 0,03890197$), nach 48 Stunden ($p = 0,05$), nach 72 Stunden ($p = 0,04801471$) und auch nach 96 Stunden ($p = 0,00472389$). Das bedeutet, dass die Alternativhypothese für alle Messzeitpunkte dieser Versuchsreihe verifiziert werden muss.

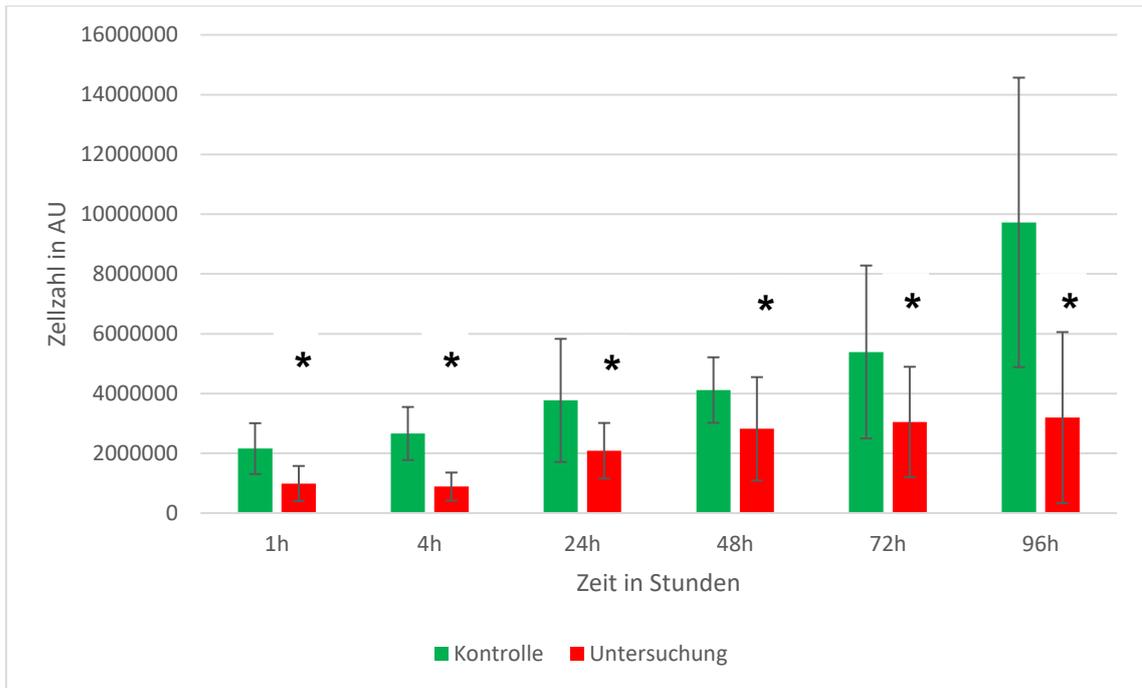


Abbildung 4.3.5 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* von unbehandelten Keratinozyten und thermisch geschädigten Keratinozyten bei 80 °C für 15 Sekunden zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 8). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

In der sechsten Untersuchung dieser Versuchsreihe wird die Untersuchungsgruppe für 10 Sekunden einer thermischen Exposition von 100 °C ausgesetzt. In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich ein signifikanter bis hochsignifikanter Unterschied nach 1 Stunde ($p = 0,001051$), nach 4 Stunden ($p = 0,01499127$), nach 24 Stunden ($p = 6,95989E-06$), nach 48 Stunden ($p = 0,00151558$), nach 72 Stunden ($p = 0,0015235$), jedoch nicht nach 96 Stunden ($p = 0,06774317$). Das bedeutet, dass die Alternativhypothese für alle Messzeitpunkte, ausschließlich des letzten, dieser Versuchsreihe verifiziert werden muss.

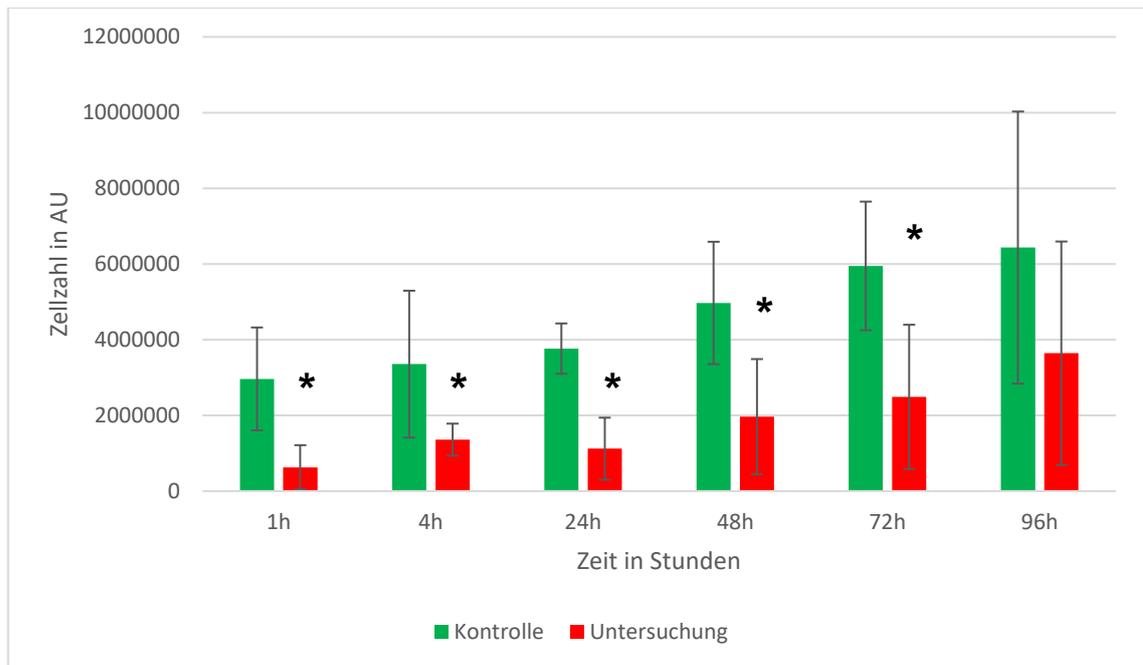


Abbildung 4.3.6 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* von unbehandelten Keratinozyten und thermisch geschädigten Keratinozyten bei 100 °C für 10 Sekunden zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 8). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

4.4 Proliferationskurve von Keratinozyten nach thermischer Schädigung mit einem stündlichen Mediumwechsel in den ersten sechs Stunden

In diesem Experiment sollen die Ergebnisse für die Zellzahl von unbehandelten Keratinozyten und thermisch geschädigten Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden dargestellt und miteinander verglichen werden, wobei in den ersten sechs Stunden nach thermischer Exposition ein stündlicher Teilmediumwechsel stattfindet.

Die Prämisse durch den stündlichen Teilmediumwechsel in den ersten sechs Stunden ist, dass dadurch Mediatoren, die die Apoptose und die Nekrose einleiten, aus dem Medium entfernt werden und den Keratinozyten frische Nährstoffe zur Verfügung gestellt werden, sodass vermutlich ein positiver Einfluss auf die Proliferation entsteht.

Die Nullhypothese dieser Versuchsreihe ist somit, dass die Zellzahlen der Kontrollgruppe und der thermisch geschädigten Untersuchungsgruppe im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zeigen. Die Alternativhypothese besagt hingegen, dass die Zellzahl der thermisch geschädigten Keratinozyten signifikant niedriger ist.

In der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich kein signifikanter Unterschied nach 1 Stunde ($p = 0,11698$), nach 48 Stunden ($p = 0,08329854$), nach 72 Stunden ($p = 0,32805244$) und nach 96 Stunden ($p = 0,1397999$). Jedoch konnte ein signifikanter Unterschied der Zellzahl nach 4 Stunden ($p = 0,0037514$) und nach 24 Stunden ($p = 0,01849553$) eruiert werden. Das bedeutet, dass die Alternativhypothese für die Messzeitpunkte 4 und 24 Stunden verifiziert wird. Für die restlichen Messzeitpunkte gilt die Nullhypothese.

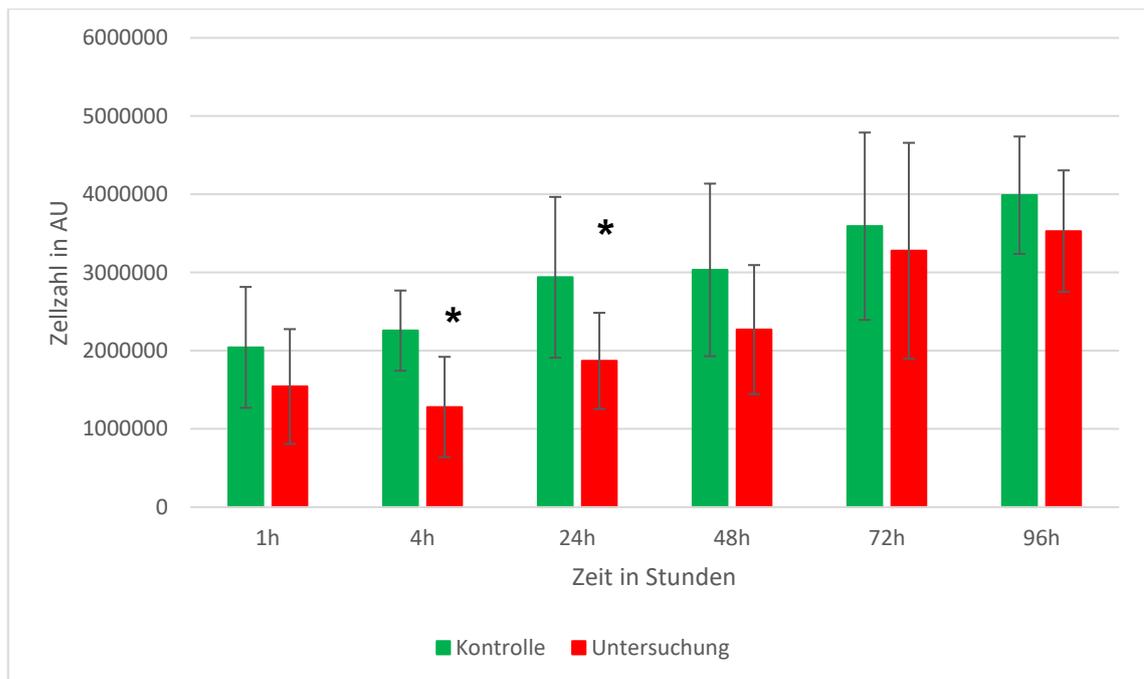


Abbildung 4.4 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* von unbehandelten Keratinozyten und thermisch geschädigten Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden bei einem stündlichen Teilmediumwechsel in den ersten 6 Stunden nach Behandlung zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung ($n = 8$). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

4.5 Proliferationskurve von Keratinozyten, die mit QVD und GDF-5 behandelt werden

In diesem Versuchsansatz wird zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden das Wachstum der Zellzahl unbehandelter, thermisch nicht geschädigter Keratinozyten untersucht, die entweder mit GDF-5 oder mit QVD behandelt werden.

Die Nullhypothese dieser Versuchsreihe sagt aus, dass die Zellzahlen aller Gruppen im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zeigen. Die aufgestellte Alternativhypothese ist hingegen, dass die Zellzahl der Untersuchungsgruppe signifikant höher ist, da die Apoptoseinhibitoren

gegebenenfalls einen positiven Effekt auf die natürliche Sterberate der Keratinozyten haben.

In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Zellzahl der Kontrollgruppe und der mit GDF-5 behandelten Untersuchungsgruppe [nach 1 Stunde ($p = 0,103405391$), nach 4 Stunden ($p = 0,38443636$), nach 24 Stunden ($p = 0,29447012$), nach 48 Stunden ($p = 0,11414673$), nach 72 Stunden ($p = 0,06412739$) und nach 96 Stunden ($p = 0,14054799$)].

In der Evaluierung der Ergebnisse der Kontrollgruppe und der mit QVD behandelten Untersuchungsgruppe kann ein signifikanter Unterschied der Zellzahl nach 1 Stunde ($p = 0,01944288$), nach 4 Stunden ($p = 0,0327212$), nach 24 Stunden ($p = 0,02598721$), nach 48 Stunden ($p = 0,00206085$), nach 72 Stunden ($p = 0,000127521$) und nach 96 Stunden ($p = 0,0004392$) festgestellt werden, sodass eine signifikant höhere Zellzahl der Kontrollgruppe zu allen Messzeitpunkten konstatiert werden kann. Das bedeutet, dass QVD nicht nur keinen positiven Einfluss auf die Zellzahl der Keratinozyten hat, sondern diese auch negativ beeinflusst.

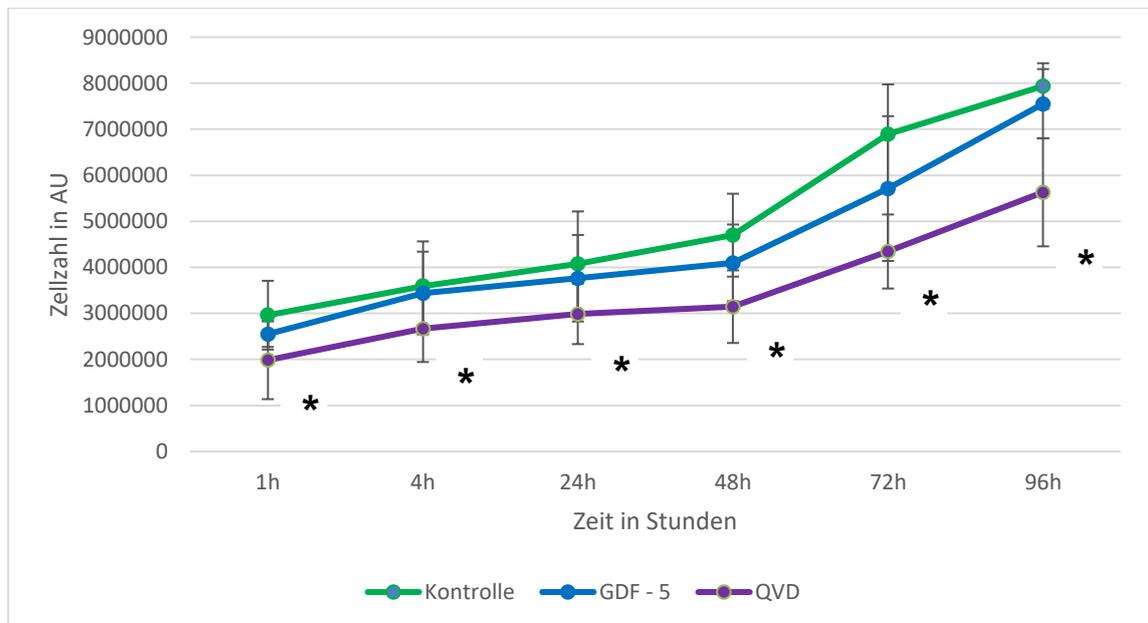


Abbildung 4.5 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* von unbehandelten Keratinozyten und Keratinozyten, denen ohne thermische Schädigung die Apoptoseinhibitoren GDF-5 und QVD hinzugegeben wurden, zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung ($n = 8$). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

4.6 Proliferationskurve thermisch geschädigter Keratinozyten, die eine Stunde vor thermischer Exposition mit GDF-5 oder QVD behandelt werden

In dieser Testreihe soll die Zellzahl von thermisch geschädigten Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden miteinander verglichen werden, wobei die thermisch geschädigten Keratinozyten eine Stunde vor thermischer Exposition entweder mit dem Apoptoseinhibitor GDF-5 oder QVD behandelt werden.

Die grundsätzliche Fragestellung ist, ob einer der Apoptoseinhibitoren nach thermischer Exposition zu einem Überlebensvorteil und somit zu einer höheren Zellzahl führt.

Die Nullhypothese dieser Versuchsreihe ist demnach, dass die Zellzahlen beider Untersuchungsgruppen im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zeigen. Die Alternativhypothese sagt aus, dass die Zellzahl einer Gruppe signifikant höher ist.

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich kein signifikanter Unterschied nach 1 Stunde ($p = 0,434718$), nach 4 Stunden ($p = 0,16839998$), nach 24 Stunden ($p = 0,19861193$), nach 48 Stunden ($p = 0,26185345$), nach 72 Stunden ($p = 0,47396795$) und auch nicht nach 96 Stunden ($p = 0,43570802$). Das bedeutet, dass die Alternativhypothese für alle Messzeitpunkte falsifiziert werden muss, wobei insgesamt eine tendenziell höhere Zellzahl der Gruppe zu eruieren ist, die mit GDF-5 behandelt wird.

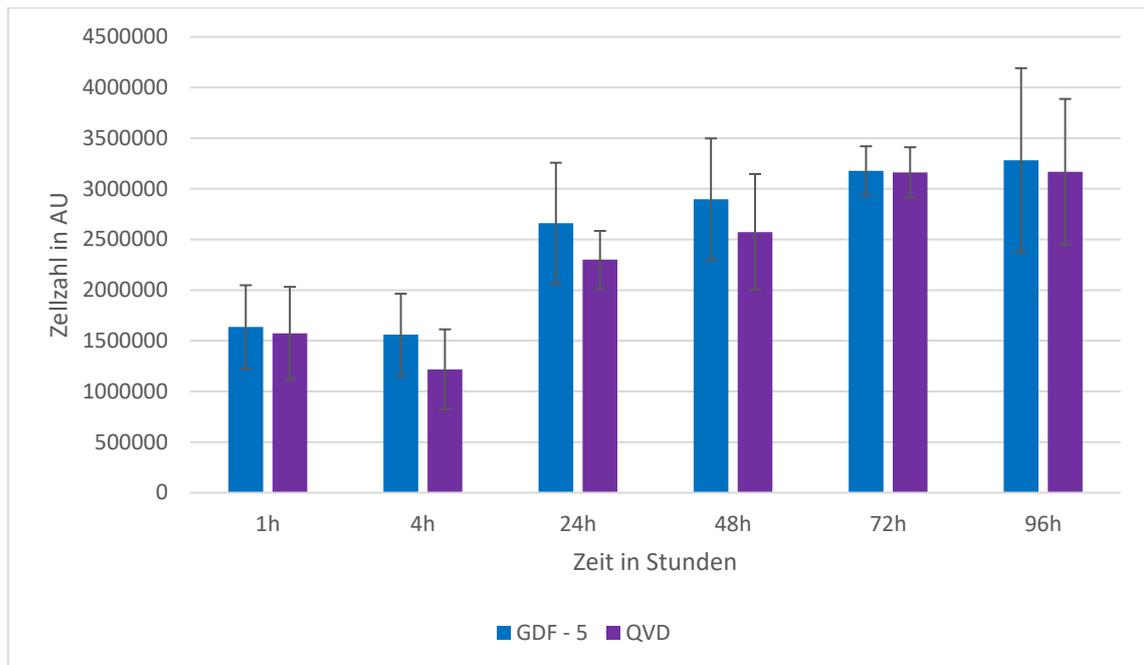


Abbildung 4.6.1 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* von thermisch geschädigten Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden, wobei eine Untersuchungsgruppe eine Stunde vor thermischer Schädigung mit GDF-5 und die andere Untersuchungsgruppe mit QVD behandelt wird, zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 4). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

Anschließend erfolgte die Untersuchung der Zellzahl nicht geschädigter Keratinozyten und thermisch geschädigter Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden, wobei die thermisch exponierten Keratinozyten eine Stunde vor thermischer Schädigung mit dem Apoptoseinhibitor GDF-5 behandelt werden.

Die Nullhypothese dieser Versuchsreihe ist, dass die Zellzahlen beider Gruppen im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zeigen. Die Alternativhypothese sagt hingegen aus, dass die Zellzahl der Kontrollgruppe signifikant höher ist.

In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Zellzahl nach 1 Stunden ($p = 0,052048$), nach 4 Stunden ($p = 0,09817602$), nach 24 Stunden ($p = 0,08177161$), nach 48 Stunden ($p = 0,06885875$) und nach 72 Stunden ($p = 0,07076728$). Nach 96 Stunden ($p = 0,04192183$) kann eine signifikant höhere Zellzahl der Kontrollgruppe festgestellt werden.

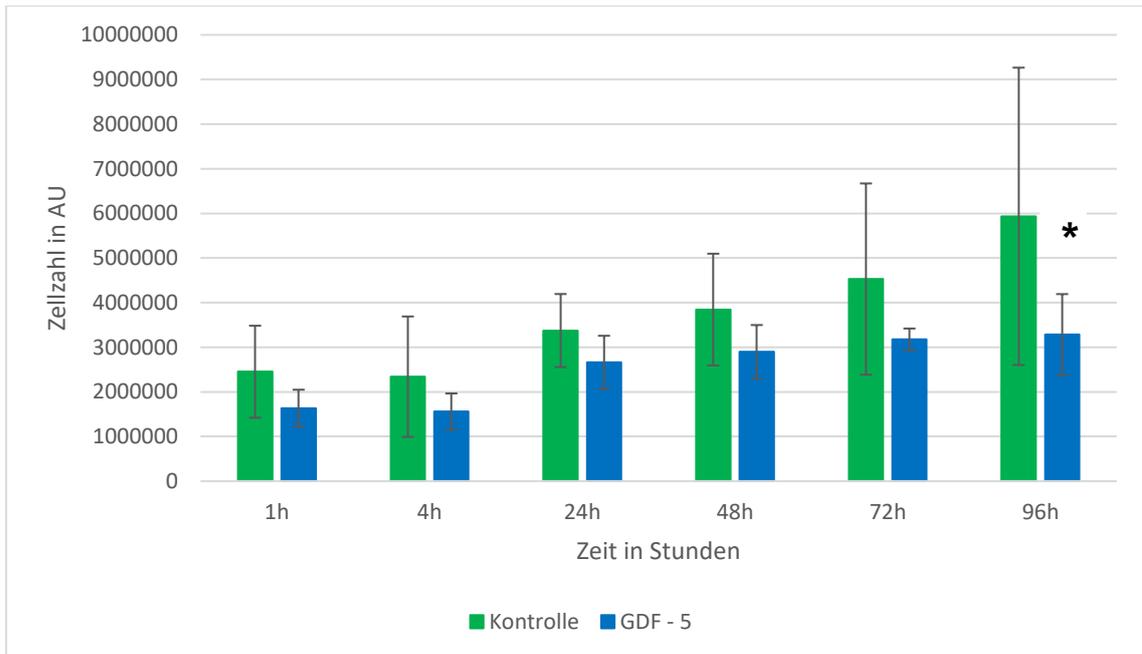


Abbildung 4.6.2 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* un behandelter Keratinozyten und thermisch geschädigter Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden, wobei die Untersuchungsgruppe eine Stunde vor thermischer Schädigung mit GDF-5 behandelt wird, zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 4). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

Anschließend erfolgt die Untersuchung der Zellzahl nicht geschädigter Keratinozyten und thermisch geschädigter Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden, wobei die thermisch geschädigten Keratinozyten eine Stunde vor thermischer Schädigung mit dem Apoptoseinhibitor QVD behandelt werden.

Die Nullhypothese dieser Versuchsreihe ist, dass die Zellzahlen beider Gruppen im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zeigen. Die Alternativhypothese ist, dass die Zellzahl der Kontrollgruppe signifikant höher ist.

In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Zellzahl nach 1 Stunden ($p = 0,045903$), nach 4 Stunden ($p = 0,03734735$), nach 24 Stunden ($p = 0,00619728$), nach 48 Stunden ($p = 0,02613498$) und nach 96 Stunden ($p = 0,03452317$), sodass zu diesen Messzeitpunkten eine signifikant höhere Zellzahl der Kontrollgruppe festgestellt werden kann. Nach 72 Stunden ($p = 0,06910034$) kann kein signifikanter Unterschied der Zellzahl festgestellt werden.

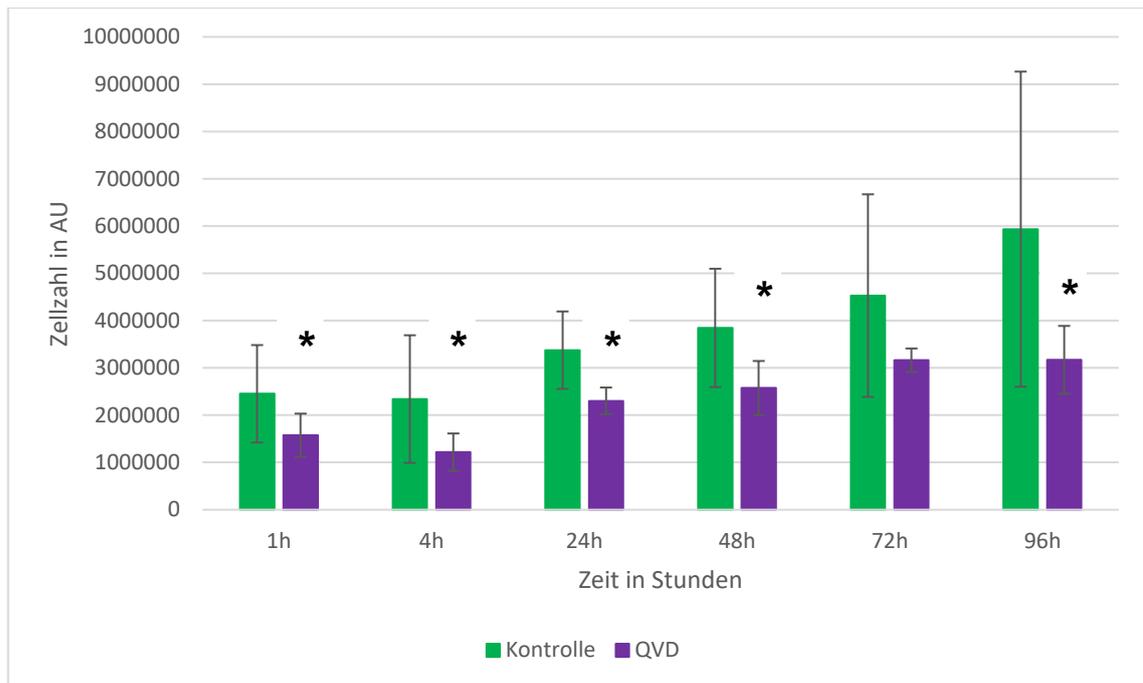


Abbildung 4.6.3 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* unbehandelter Keratinozyten und thermisch geschädigter Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden, wobei die Untersuchungsgruppe eine Stunde vor thermischer Schädigung mit QVD behandelt wird, zu den Messzeitpunkten 1, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 4). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

4.7 Proliferationskurve thermisch geschädigter Keratinozyten, die eine Stunde nach thermischer Exposition mit GDF-5 oder QVD behandelt werden

In diesem Versuch soll die Zellzahl nicht behandelter und thermisch geschädigter Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden zu den Messzeitpunkten 2, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden miteinander verglichen werden, wobei die thermisch geschädigten Keratinozyten eine Stunde nach thermischer Exposition entweder mit dem Apoptoseinhibitor GDF-5 oder QVD behandelt werden.

Die Nullhypothese dieser Versuchsreihe sagt aus, dass die Zellzahlen beider Untersuchungsgruppen im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zeigen. Die Alternativhypothese ist, dass die Zellzahl einer Gruppe signifikant höher ist.

In der Auswertung des ersten Versuchsteils der Ergebnisse zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Zellzahl der thermisch exponierten Keratinozyten nach 2 Stunden ($p = 0,323948$). Nach 4 Stunden ($p = 0,0281887$), nach 24 Stunden ($p = 0,02366788$), nach 48 Stunden ($p = 0,04913496$), nach 72 Stunden ($p = 0,0466135$) und nach 96 Stunden ($p = 0,01467524$) kann eine signifikant höhere Zellzahl der mit

GDF-5 behandelten Untersuchungsgruppe im Vergleich zu der mit QVD behandelten Vergleichsgruppe festgestellt werden.

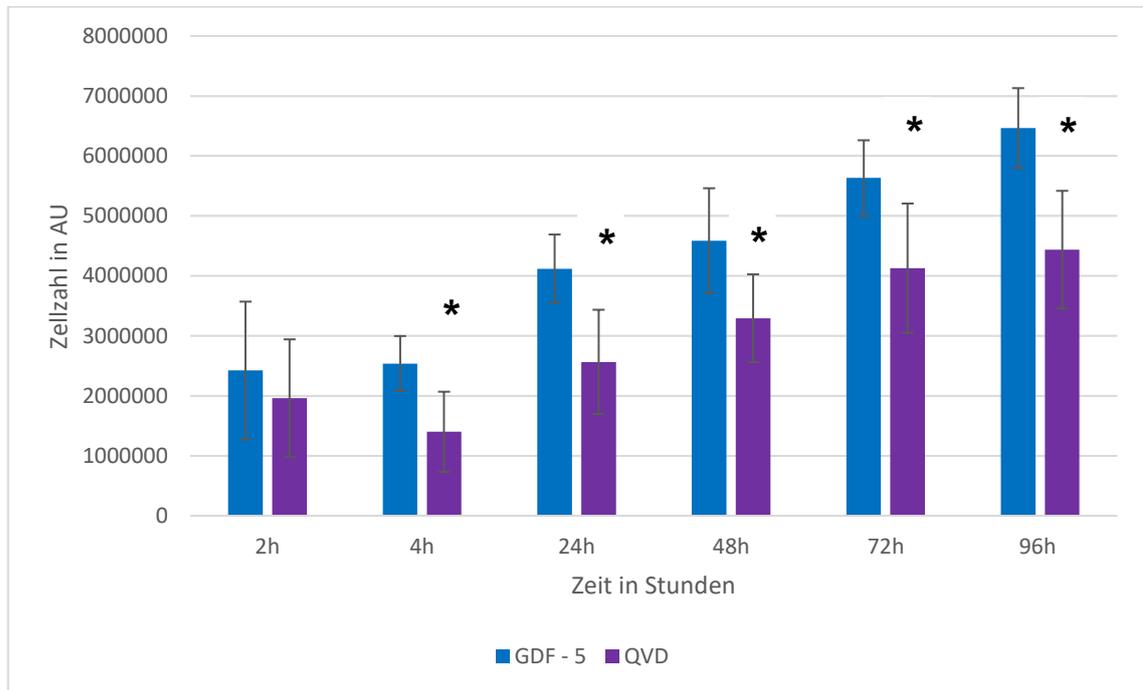


Abbildung 4.7.1 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* von thermisch geschädigten Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden, wobei eine Untersuchungsgruppe eine Stunde nach thermischer Schädigung mit GDF-5 und die andere Untersuchungsgruppe mit QVD behandelt wird, zu den Messzeitpunkten 2, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 4). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

Anschließend erfolgte die Untersuchung der Zellzahl nicht geschädigter Keratinozyten und thermisch geschädigter Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden zu den Messzeitpunkten 2, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden, wobei die thermisch exponierten Keratinozyten eine Stunde nach thermischer Schädigung mit dem Apoptoseinhibitor GDF-5 behandelt werden.

Die Nullhypothese dieser Versuchsreihe ist, dass die Zellzahlen beider Gruppen im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zeigen. Die Alternativhypothese sagt hingegen aus, dass die Zellzahl der Kontrollgruppe signifikant höher ist.

In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Zellzahl nach 2 Stunden ($p = 0,069064$), nach 24 Stunden ($p = 0,40416786$), nach 48 Stunden ($p = 0,15072262$), nach 72 Stunden ($p = 0,31998271$) und nach 96 Stunden ($p = 0,42412418$). Nach 4 Stunden ($p = 0,00259402$) kann eine signifikant höhere Zellzahl der Kontrollgruppe festgestellt werden.

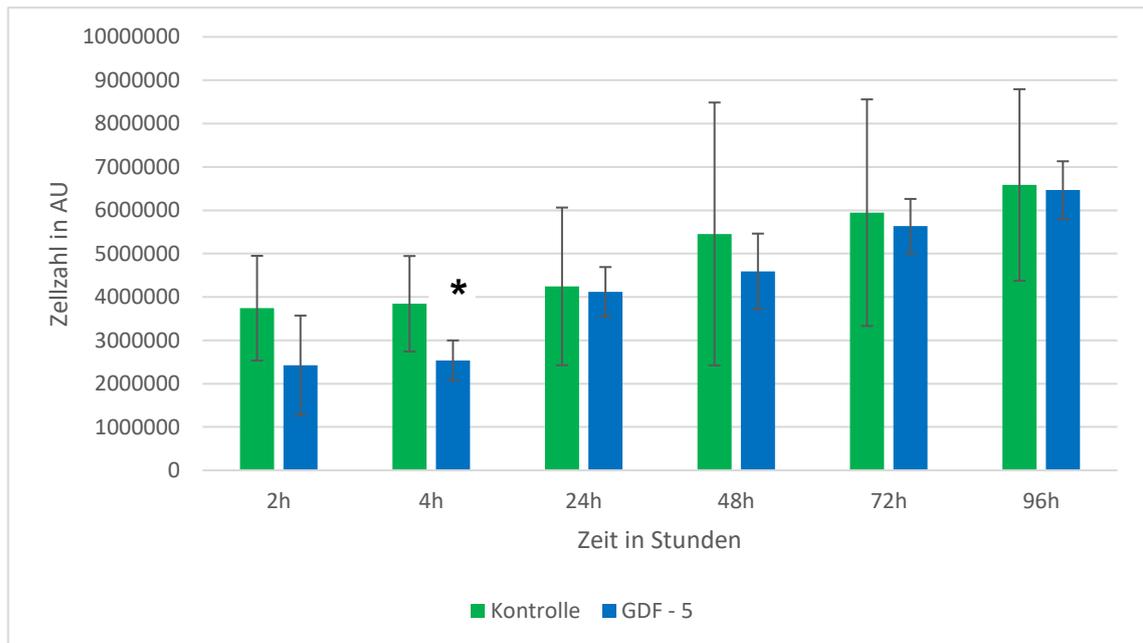


Abbildung 4.7.2 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* un behandelter Keratinozyten und thermisch geschädigter Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden, wobei die Untersuchungsgruppe eine Stunde nach thermischer Schädigung mit GDF-5 behandelt wird, zu den Messzeitpunkten 2, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 4). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

Anschließend erfolgt die Untersuchung der Zellzahl nicht geschädigter Keratinozyten und thermisch geschädigter Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden zu den Messzeitpunkten 2, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden, wobei die thermisch geschädigten Keratinozyten eine Stunde nach thermischer Schädigung mit dem Apoptoseinhibitor QVD behandelt werden.

Die Nullhypothese dieser Versuchsreihe ist, dass die Zellzahlen beider Gruppen im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zeigen. Die Alternativhypothese ist, dass die Zellzahl der Kontrollgruppe signifikant höher ist.

In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Zellzahl nach 2 Stunden ($p = 0,038346$), nach 4 Stunden ($p = 0,00111323$), nach 24 Stunden ($p = 0,01585427$), nach 48 Stunden ($p = 0,00523812$), nach 72 Stunden ($p = 0,0284498$) und nach 96 Stunden ($p = 0,00959509$), sodass eine signifikant höhere Zellzahl der Kontrollgruppe festgestellt werden kann.

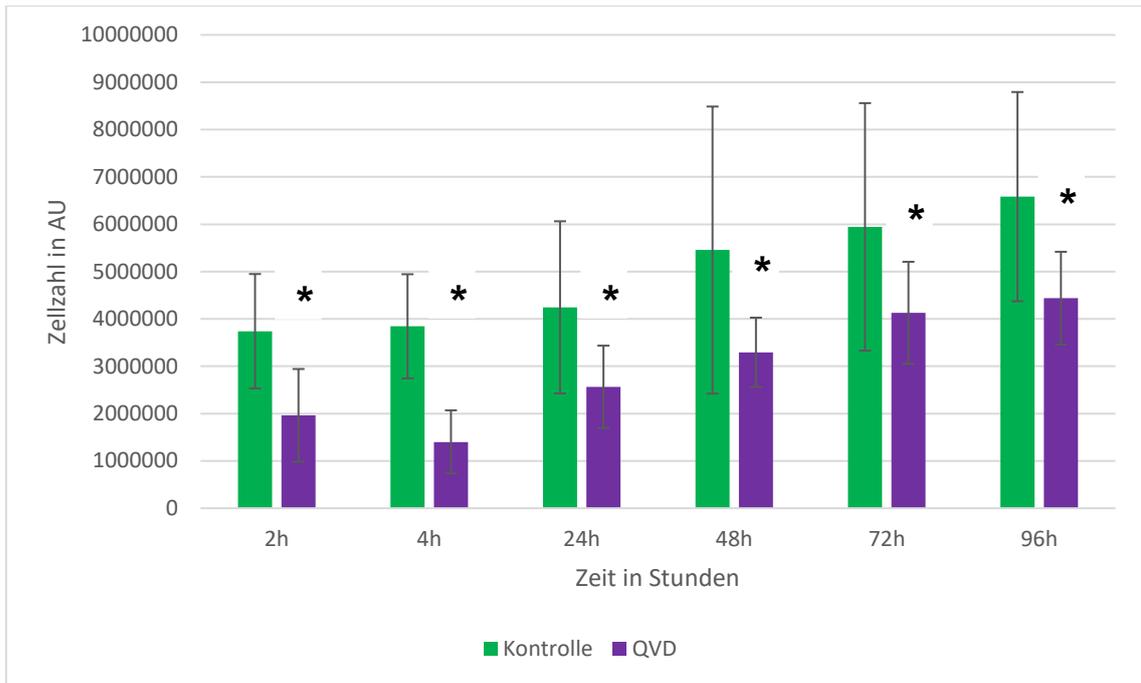


Abbildung 4.7.3 zeigt die mittels CellTiter-Blue® gemessene Zellzahl in *Arbitrary Unit* un behandelter Keratinozyten und thermisch geschädigter Keratinozyten bei 80 °C für 10 Sekunden, wobei die Untersuchungsgruppe eine Stunde nach thermischer Schädigung mit QVD behandelt wird, zu den Messzeitpunkten 2, 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden unter Darstellung des arithmetischen Mittels +/- der Standardabweichung (n = 4). Die Kennzeichnung der Signifikanz der Kontroll- im Vergleich zur Untersuchungsgruppe des gleichen Messzeitpunktes von $p < 0,05$ erfolgte mittels *.

5 Diskussion

In der Einleitung wurde bereits der aktuelle Forschungsstand zu Verbrennungen der Haut vorgestellt. Die Haut ist ein komplexes Gebilde, das unterschiedliche Aufgaben durch unterschiedliche Zelltypen bewältigt. [8-10, 13]

Durch Verbrennungsverletzungen der Haut sterben jedes Jahr weltweit rund 300 000 Menschen. Die Zahl derjenigen, die nach Brandverletzungen unter den diversen Traumafolgen leiden, übersteigt die Millionen. [1]

Die Behandlung dieser Verletzungen ist komplex, häufig kostspielig, geht mit langen Hospitalisierungen einher und erreicht noch immer nicht die angestrebten Ziele, so dass Forschende ständig auf neue Behandlungskonzepte hinarbeiten. [3, 4]

Zur Ausarbeitung dieser dienen unterschiedliche In-vitro- und In-vivo-Verbrennungsmodelle. Auf zellulärer Ebene kann eine Verbrennung nach Jackson in drei konzentrische Zonen eingeteilt werden, die den Grad der thermischen Schädigung widerspiegeln. Die Koagulationszone ist der zentrale Lokus mit der höchsten thermischen Schädigung, in der die Zellen nekrotisch werden. [5] Die intermediäre Stasezone enthält vitale und avitale Zellen, wobei der Metabolismus in dieser Zone eingeschränkt ist und die Zellen vom Absterben bedroht sind. [5] Der sogenannte Nachbrenneffekt ist definiert durch das Absterben vital gefährdeter Zellen in der Stasezone Stunden bis Tage nach der primären Verbrennungsverletzung. Die zellulären Prozesse in diesem zeitlichen Zusammenhang sind weiterhin Gegenstand aktueller Forschung, da nicht abschließend geklärt ist, ob der Zelluntergang in einer Nekrose, einer Apoptose oder in einer Mischform begründet ist. [62, 63] Die äußerste Zone ist die der Hyperämie. In dieser Zone ist die thermische Schädigung am geringsten und der Metabolismus wie auch die Zirkulation sind am höchsten, sodass diese einen protektiven Effekt auf die vitalen Zellen der Stasezone hat. [5]

Bei einer optimalen Untersuchung von protektiven Faktoren nach Verbrennungstraumata würden all diese Variablen – von der komplexen Zusammensetzung der Haut bis zu den unterschiedlichen zellulären Prozessen einer Verbrennung – einkalkuliert. Doch trotz intensiver Forschung besteht weiterhin kein ausreichendes Konzept zur Behandlung der primär thermisch geschädigten Haut und vor allem nicht der vom Untergang bedrohten Zellen im Rahmen des sekundären Wundprogresses.

Eine der am häufigsten genutzten experimentellen Möglichkeiten, die menschliche Haut in wissenschaftlichen Untersuchungen zu imitieren, sind Tiermodelle. Dabei wird am häufigsten auf Ratten zurückgegriffen. [64] Jedoch sind auch die Arbeit an Tiermodellen und die Übertragbarkeit auf den Menschen limitiert, da der Aufbau der Haut, die metabolischen Prozesse mit physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen unterschiedlich sind. [65, 66] Zusätzlich ist die häufig geringe Anzahl an genutzten Tiermodellen in Untersuchungen ein restriktiver Faktor, sodass die statistische Kraft und die Randomisierbarkeit hierunter leiden. [67]

Die Alternative zu In-vivo-Verbrennungsmodellen sind In-vitro-Modelle auf unterschiedlicher zellulärer Basis. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die thermische Schädigung auf die Haut im Rahmen eines Verbrennungsmodells zu imitieren und protektive Faktoren nach Verbrennungstraumata zu identifizieren. Die Nachteile eines In-vivo-Modells wurden bereits oben beschrieben, sodass die Entscheidung auf ein In-vitro-Verbrennungsmodell fiel. Die zu klärenden Variablen sind nun die Art der Exposition und die genutzte Zellbasis.

Die Epidermis besteht zu 90 % aus Keratinozyten. Im Rahmen einer Verbrennung der Haut erfolgt der erste Kontakt mit der äußersten Schicht – der Epidermis. Um eine möglichst realistische Simulation zu schaffen, erfolgte aus diesem Grund die Nutzung von Keratinozyten. [10] Dabei ist auch die Nutzung primärer Zellkulturen von Keratinozyten kritisch zu bewerten, da diese unterschiedlich auf eine thermische Schädigung reagieren und zu fluktuierenden Ergebnissen der Zellzahl führen.

Die offensichtlichste Möglichkeit eines zellbasierten In-vitro-Verbrennungsmodells wäre die Arbeit an einer offenen Flamme. Dies geht jedoch mit Gefahren für den Anwender einher, da ein hohes Selbstverletzungsrisiko existiert. Zusätzlich besteht die Problematik der Reproduzierbarkeit, denn die thermische Wirkung an einer offenen Flamme ist schwer standardisierbar.

Eine andere Option zur Etablierung eines Verbrennungsmodells wäre die Nutzung eines Verbrühungsmodells, wie das nach Matylevitch. Hierbei wurden Keratinozyten auf Deckgläsern kultiviert und folgend in heißes Wasser getaucht. [68] Bereits Wergen konnte an diesem Verbrühungsmodell Schwächen aufzeigen. So ist die Hitzeschädigung abhängig von der manuellen Eintauch- und Abtropfgeschwindigkeit, die schwer zu standardisieren ist und somit Volatilität unterliegt. Dabei können bereits kleinste Temperaturfluktuationen zu großen Unstetigkeiten in der thermischen Schädigung führen. [60]

Die Alternative zur Nutzung einer offenen Flamme oder des Verbrühungsmodells ist ein In-vitro-Kontaktverbrennungsmodell, das durch Wergen etabliert und im Rahmen dieser Arbeit modifiziert wurde. [60] Es erfolgte die Organisation dieses zellbasierten In-vitro-Kontaktverbrennungsmodells, das es ermöglicht, auf zellulärer Ebene ein Verbrennungstrauma zu implementieren. Dieses Modell ist, wie gewünscht, flexibel mit Blick auf die genutzte Zellkultur und variabel in Bezug auf die thermisch induzierte Schädigung, sodass Parameter wie Expositionsdauer und -stärke nach Wunsch verändert werden können. Damit konnte die thermische Schädigung auf die Haut durch Hitzeexposition imitiert werden und es wurden für alle durchgeführten Versuche repräsentative Rahmenbedingungen geschaffen. Durch die Nutzung des Thermoheizblockes gelingt es, die zu exprimierende Temperatur genau zu deklarieren und zu reproduzieren. Des Weiteren stellt sich ein eindeutiger Nutzeffekt dar, da durch eine stärkere Exposition, dementsprechend eine erhöhte Temperatur, die Expositionsdauer reduziert wird und umgekehrt. [60]

Im Rahmen des Versuchs 4.1 stellt sich dar, welche thermische Wirkung durch den Heizblock an den Well-Platten generiert wird und wie stark und lange die thermische Exposition mindestens sein muss, damit eine ausreichende Hitzeentwicklung in den

Well-Platten entsteht, sodass es zu einer thermischen Schädigung der Keratinozyten kommt. Eine thermische Schädigung bei 80 °C für 10 Sekunden erscheint am realisierbarsten, da zum einen die zur Apoptose benötigte Hitzeentwicklung schnell erreicht und zum anderen diese im Eisbad ohne massive zeitliche Expositionsdauer beendet werden kann. Trotz des manuellen Auflegens der Well-Platten besteht eine höhere Reliabilität im Vergleich zum Verbrühungsmodell, da eine Expositionsdauer von 10 Sekunden im Kontaktverbrennungsmodell weniger anfällig für zeitliche Fluktuationen ist als die Expositionsdauer von 1 Sekunde im Verbrühungsmodell nach Matylevitch. [60, 68] Kritisch wiederum muss bewertet werden, dass im Rahmen des hier genutzten Kontaktverbrennungsmodells die Messungen mittels Infrarotkamera erfolgen, wobei der Abstand zur Well-Platte zwar nach Herstellerangaben erfolgt, jedoch manuell gewährleistet wird und somit Schwankungen unterliegt. Diese Abstandsschwankungen können zu falsch gemessenen Temperaturen in den Wells führen, die folgend in einer eingeschränkten Auswertung und Interpretation der Ergebnisse resultieren können. Des Weiteren unterliegt die Well-Platte auf Grund ihrer Morphologie topografisch unterschiedlichen Hitzeentwicklungen in den einzelnen Wells. Um diese thermische Entwicklung so gleichmäßig als möglich zu induzieren, erfolgt die Nutzung einer Aluminiumplatte zur Wärmeübertragung und eines Gewichtes auf der Well-Platte, um eine hitzeinduzierte Verformung zu verhindern.

Um so viele andere zellzahlreduzierende Faktoren als möglich auszuschließen, erfolgt die Darstellung der Zellzahl von nicht behandelten Keratinozyten im zeitlichen Verlauf von bis zu 96 Stunden. Wie in den Ergebnissen unter Kapitel 4.2 zu sehen ist, wächst die Zellzahl der Keratinozyten kontinuierlich, ohne dass eine fallende Proliferation verzeichnet werden kann. Daher haben mögliche restriktive Faktoren – wie die Habitatgröße, die der Wellgröße entspricht, oder Nährstoffdefizite, die durch die Teilmedienwechsel verhindert werden – bei unbehandelten Keratinozyten keine Auswirkung, sodass eine direkte Kausalität zwischen der sinkenden Zellzahl und einer Hitzeschädigung in der Untersuchungsgruppe hergestellt werden kann.

Die Entscheidung für die Expositionsbedingungen am Heizblock von 80 °C für 10 Sekunden erfolgt anhand der Untersuchungen des Versuches 4.3. Diese sind so gewählt, dass die Zellzahl nach 24 Stunden um circa 50 % reduziert ist, sodass Behandlungserfolge oder -misserfolge durch die Apoptoseinhibitoren oder Teilmedienwechsel deutlich dargestellt werden können.

Nachdem ein In-vitro-Verbrennungsmodell etabliert, die Expositionsbedingungen eruiert und so viele zellzahlreduzierende Faktoren als möglich ausgeschlossen wurden, erfolgt die Charakterisierung der Proliferation und der Zellzahl von thermisch geschädigten Keratinozyten. Hierbei ist primär die Zellzahl im zeitlichen Zusammenhang mit Blick auf den sogenannten Nachbrenneffekt von besonderem Interesse, sodass vor allem diese in den ersten 96 Stunden nach der thermischen Schädigung überwacht werden sollte. [5, 24]

Der bereits im Jahr 1953 von Jackson beschriebene Nachbrenneffekt, der durch den Untergang vital gefährdeter Zellen in der Stasezone definiert ist, kann in Untersuchungen des Versuches 4.3 bei einer ausreichenden thermischen

Schädigung beobachtet werden, da es vor allem bei erhöhter Temperaturexposition zu einem deutlichen sekundären Abfall der Zellzahl nach 4 und 24 Stunden sowie zu einer verlangsamten Reproliferation der geschädigten Keratinozyten gekommen ist. Dies lässt auf einen sekundären Wundprogress schließen. Je schwächer die initiale thermische Schädigung ist, desto geringer ist auch die Stärke des Nachbrenneffektes, sodass festgestellt werden kann, dass zwischen der primären thermischen Schädigung und dem sekundären Nachbrenneffekt ein linearer Zusammenhang besteht. Das zeigt, dass der multifaktorielle Nachbrenneffekt nicht nur in In-vivo-Versuchen dargestellt werden kann [69], sondern auch auf In-vitro-Versuche mit Keratinozyten übertragbar ist. Ungeklärt bleibt weiterhin, ob es sich bei diesem sekundären Zelltod um eine Nekrose, eine Apoptose oder eine Mischform handelt.

Falls die Apoptose vor allem für den sekundären Zelltod im Rahmen des Nachbrenneffektes verantwortlich ist, sind Inhibitoren dieser eine Möglichkeit zur Rettung der vom Zelltod bedrohten Zellen.

Apoptoseinhibitoren sind, wie bereits erläutert, Proteine einer Familie, die an unterschiedlichen Punkten des Apoptoseapparats angreifen und physiologischerweise den programmierten Zelltod verhindern. [51] Der Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5 gehört zur Familie der knochenmorphogenetischen Proteine. GDF-5 stimuliert die Interaktion zwischen BMPR-2 und XIAP, sodass die Stabilität des XIAPS steigt und Caspasen inaktiviert werden. [52] In der Vergangenheit konnte bereits eruiert werden, dass GDF-5 neben einem proangiogenen Effekt auch positive Auswirkungen auf Zellproliferation, Regeneration, Viabilität, Migration und Differenzierung hat. [6, 7] Der Apoptoseinhibitor QVD ist ein Pancaspaseinhibitor und zeigt schon bei geringer Dosierung einen hohen antiapoptotischen Effekt. [70]

Die Ergebnisse des Versuches 4.5 zeigen, dass sich bei der Zellzahl von unbehandelten Keratinozyten und jenen, die mit GDF-5 ohne thermische Schädigung behandelt wurden, keine signifikanten Unterschiede darstellen. Das wiederum lässt darauf schließen, dass GDF-5 keine negativen Effekte auf die Proliferation von unbehandelten Keratinozyten hat. Keratinozyten, deren Zellzahl mit denen von Keratinozyten verglichen wird, die mit QVD behandelt wurden, zeigen eine signifikant höhere Zellzahl, sodass zu vermuten ist, dass QVD nicht nur keinen protektiven Effekt auf Keratinozyten hat, sondern auch die Zellzahl reduziert. Die Ursache hierfür bleibt jedoch ungeklärt und benötigt weiterer Forschung.

Die Ergebnisse des Versuches 4.6 beziehen sich auf die Zellzahl von thermisch geschädigten Keratinozyten, die eine Stunde vor thermischer Schädigung mit den Apoptoseinhibitoren GDF-5 oder QVD behandelt wurden. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass es zu keinem der sechs Messzeitpunkte einen signifikanten Unterschied in der Zellzahl der Keratinozyten gibt. Das bedeutet, dass es bei einer thermischen Schädigung von Keratinozyten, die mit einem der beiden genannten Apoptoseinhibitoren behandelt wurden, keine signifikanten Überlebensvorteile gibt. Jedoch ist insgesamt eine Tendenz in den Ergebnissen zu erkennen. Es zeigte sich, dass zu allen Messzeitpunkten die Zellzahl der mit GDF-5 behandelten

Keratinocyten höher war. Eine sekundäre Vergleichsuntersuchung mit einer Kontrollgruppe, die keine Hitzeschädigung erfahren hat, zeigt, dass es erst nach 96 Stunden einen signifikanten Unterschied in der Zellzahl von thermisch nicht geschädigten Keratinocyten und thermisch geschädigten Keratinocyten gibt, die eine Stunde vor Hitzeexposition mit GDF-5 behandelt wurden, und diesem vor allem in der ersten posttraumatischen Phase eine protektive Wirkung zugesprochen werden kann. Die Keratinocyten, die mit QVD eine Stunde vor der thermischen Schädigung behandelt wurden, zeigen an fünf Messzeitpunkten eine signifikant niedrigere Zellzahl als die Kontrollgruppe.

Abschließend kann im Versuch 4.7 dargestellt werden, dass die Zellzahl von thermisch geschädigten Keratinocyten, die eine Stunde nach der Hitzeschädigung mittels des Apoptoseinhibitors GDF-5 behandelt wurden, ab der Vier-Stunden-Messung signifikant höher ist als bei der Vergleichsgruppe, die mit QVD behandelt wurde. Das bedeutet, dass die Ergebnisse so zu interpretieren sind, dass im direkten Vergleich von GDF-5 und QVD der Apoptoseinhibitor GDF-5 dazu führt, dass eine sekundäre Apoptose auf Grund des Nachbrenneffektes deutlich reduziert wird und/oder die mit GDF-5 behandelten Keratinocyten eine deutlich höhere sekundäre Proliferation besitzen. Im zweiten Teil wurde die Zellzahl der nicht behandelten Keratinocyten mit jenen verglichen, die eine Stunde nach thermischer Schädigung mittels GDF-5 oder QVD behandelt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten eine signifikant höhere Zellzahl besitzt – im Gegensatz zur Untersuchungsgruppe, die eine Stunde nach thermischer Exposition mit QVD behandelt wurde. Das bedeutet, dass QVD nicht nur als protektiver Faktor nach Verbrennungstraumata GDF-5 unterlegen ist, sondern auch zu keinem signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur Kontrollgruppe führt. Im Gegensatz dazu ergibt die Vergleichsuntersuchung der nicht behandelten Keratinocyten und der eine Stunde nach thermischer Schädigung mittels Apoptoseinhibitor GDF-5 behandelten Keratinocyten, dass bei der Zellzahl an fünf von sechs Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede bestehen. Lediglich zum Messzeitpunkt von vier Stunden nach Hitzeschädigung hat die Kontrollgruppe eine signifikant höhere Zellzahl. Das bedeutet, dass die Behandlung mit GDF-5 ein potenzieller protektiver Faktor nach Verbrennungstraumata sein kann, zu einer Rettung vor dem Zelltod führt und somit einen klaren Überlebensvorteil darstellt.

Die endgültige Ursache der oben beschriebenen Ergebnisse bleibt weiterhin klärungsbedürftig, jedoch kann diese im Untergangsprozess der Keratinocyten begründet sein. Bei den untersuchten protektiven Faktoren handelt es sich um Apoptoseinhibitoren, die an unterschiedlichen Punkten im Apoptoseapparat angreifen. [52, 70] Ob der sekundäre Wundprogress eine Form der Nekrose, eine Apoptose oder eine Mischform darstellt, bleibt ungeklärt, wobei genau diese die nicht gewünschten Ergebnisse, vor allem des QVD, erklären könnten.

Bevor die protektive Wirkung von Apoptoseinhibitoren auf thermisch geschädigte Keratinocyten charakterisiert wurde, erfolgte im Versuch 4.4 die Eruiierung eines schützenden Effektes auf hitzegeschädigte Keratinocyten durch Teilmedienwechsel in der kritischen Phase des Nachbrenneffektes. Die Zellzahl der Kontrollgruppe und der thermisch geschädigten Keratinocyten durch eine Exposition von 80 °C für

10 Sekunden mit einem stündlichen Teilmediumwechsel in den ersten 6 Stunden zeigt, dass es zu vier Messzeitpunkten (1, 48, 72 und 96 Stunden) keinen signifikanten Unterschied der Zellzahl gibt. Lediglich nach 4 und 24 Stunden zeigt die Kontrollgruppe eine signifikant höhere Zellzahl. Anhand dieser Auswertung ist zu schlussfolgern, dass ein stündlicher Teilmediumwechsel in den ersten 6 Stunden zu einem Überlebensvorteil der hitzegeschädigten Keratinozyten führt, da Keratinozyten nach thermischer Schädigung ohne stündlichen Teilmediumwechsel eine signifikant niedrigere Zellzahl haben als die Vergleichsgruppe. Der signifikante Zellzahlabfall nach 4 und 24 Stunden in der Untersuchungsgruppe kann im sogenannten Nachbrenneffekt begründet sein, der durch die Teilmediumwechsel nicht oder nur gering affektiert wird. Die Ursache des nicht signifikanten Unterschiedes in beiden Gruppen wird im stündlichen Teilmediumwechsel in der kritischen Phase der Verbrennung begründet sein. Dieser führt dazu, dass durch die Keratinozyten ausgeschüttete toxische Mediatoren aus dem Medium entfernt werden und sich die geschädigten Keratinozyten in einem Milieu befinden, das anabole Rahmenbedingungen stellt und somit eine Apoptose oder Nekrose der Keratinozyten verhindert. In diesem In-vitro-Kontaktverbrennungsmodell imitiert dieser Teilmediumwechsel die komplexe Aufgabe der Hyperämiezone in einem Gewebe nach Jackson. [5]

Zusammenfassend zeigt sich, dass der Apoptoseinhibitor QVD als protektiver Faktor nach Verbrennungstraumata in dieser Konstellation von Zelltyp und thermischer Schädigung ungeeignet ist, da eine Behandlung der Keratinozyten weder eine Stunde vor noch eine Stunde nach thermischer Schädigung zu einem Überlebensvorteil führt. Der Apoptoseinhibitor GDF-5 wiederum zeigt im Rahmen dieses Promotionsvorhabens einen protektiven Effekt vor dem Zelluntergang auf hitzegeschädigte Keratinozyten. Zum einen reduziert er den Nachbrenneffekt, zum anderen erhöht er die Reproliferation der thermisch geschädigten Keratinozyten. Dieser Effekt ist unabhängig davon zu beobachten, ob die Keratinozyten eine Stunde vor oder nach thermischer Schädigung mit GDF-5 behandelt werden. Neben dem Apoptoseinhibitor GDF-5 zeigte ein stündlicher Teilwechsel des Keratinozytenmediums ebenfalls eine protektive Wirkung in Bezug auf die Mortalitätsrate von thermisch geschädigten Keratinozyten, wobei die genaue Kausalität hier ungeklärt bleibt.

5.1 Ausblick

Der Apoptoseinhibitor GDF-5 zeigt den gewünschten Effekt als Protektor vor dem Zelltod der Keratinozyten in diesem Zellverbrennungsmodell. Dieser scheint ein vielversprechender protektiver und regenerativer Faktor nach Verbrennungstraumata zu sein, der womöglich neue Ansätze in aktuellen Behandlungskonzepten etablieren kann. Weitere Prüfung an anderen Zelltypen, der humanen Dermis oder an Patient/-innen mit Verbrennungsverletzungen ist in Zukunft jedoch erforderlich.

Der Apoptoseinhibitor QVD wiederum zeigt keinen dieser gewünschten Effekte auf Keratinozyten in diesem Zellverbrennungsmodell.

Nach weiterer intensiver Forschung bestünde in Zukunft die Möglichkeit, den Apoptoseinhibitor GDF-5 weltweit in der klinisch relevanten Verbrennungsbehandlung zu etablieren, denn primäre Ziele jeder Behandlung sind die Erhaltung von vitalem Gewebe sowie eine schnelle und stabile Wundregeneration, sodass vor allem bei großflächigen Verbrennungen die Überlebenschancen gesteigert werden können. Des Weiteren könnte dadurch die gesamte Nachbehandlung positiv beeinflusst werden, indem zum einen Behandlungskosten gesenkt werden und zum anderen das Auftreten von funktionell und ästhetisch einschränkenden Narben reduziert wird.

Eine effizientere Verbrennungsbehandlung, eine geringere Mortalität, reduzierte Behandlungskosten und weniger Komplikationen würden letztlich den Menschen helfen, die nach Brandverletzungen unter somatischen, psychologischen, sozialen und wirtschaftlichen Einschränkungen leiden.

Zusätzlich ist weitere Forschung bezüglich der Wechselwirkung von GDF-5 und des Nachbrenneffektes nötig, da weiterhin die Frage besteht, ob der Apoptoseinhibitor GDF-5 eine abschwächende Auswirkung auf den Nachbrenneffekt hat oder nach Hitzeschädigung die Proliferation der nicht untergegangenen Keratinozyten fördert.

Auch sollte die Wirkung von GDF-5 auf die Differenzierung und Migration von Keratinozyten untersucht werden.

Abschließend bleibt einerseits der genaue Mechanismus des Zelluntergangs im sekundären Wundprogress zu klären, da nicht bekannt ist, ob es sich hierbei um eine Nekrose, eine Apoptose oder um eine Mischform handelt. Andererseits ist die Wirkung weiterer Apoptoseinhibitoren auf diesen Prozess zu eruieren.

In Zukunft wäre auch eine Betrachtung von Mimetika interessant, da GDF-5 ein Naturstoff ist und laborchemisch entwickelte Mimetika gegebenenfalls spezifischere und vor allem auch wirksamere Überlebensvorteile bieten und somit auch einen effizienteren Schutz vor dem Zelltod.

6 Literaturverzeichnis

1. Peck M, Molnar J, Swart D. A global plan for burn prevention and care. *Bull World Health Organ.* 2009 Oct;87(10):802-3. doi: 10.2471/blt.08.059733. PMID: 19876549; PMCID: PMC2755313.
2. Silver AG, Dunford GM, Zamboni WA, Baynosa RC. Acute pavement burns: a unique subset of burn injuries: a five-year review of resource use and cost impact. *J Burn Care Res.* 2015 Jan-Feb;36(1):e7-e11. doi: 10.1097/BCR.000000000000162. PMID: 25207798.
3. Benson A, Dickson WA, Boyce DE. Burns. *BMJ.* 2006 Mar 18;332(7542):649-52. doi: 10.1136/bmj.332.7542.649. Erratum in: *BMJ.* 2006 Apr 1;332(7544):755. PMID: 16543335; PMCID: PMC1403274.
4. Petersen W, Rahmanian-Schwarz A, Werner JO, Schiefer J, Rothenberger J, Hübner G, Schaller HE, Held M. The use of collagen-based matrices in the treatment of full-thickness wounds. *Burns.* 2016 Sep;42(6):1257-64. doi: 10.1016/j.burns.2016.03.017. Epub 2016 Jun 11. PMID: 27297940.
5. Jackson DM. [The diagnosis of the depth of burning]. *Br J Surg.* 1953 May;40(164):588-96. Undetermined Language. doi: 10.1002/bjs.18004016413. PMID: 13059343.
6. Schiefer JL, Held M, Fuchs PC, Demir E, Plöger F, Schaller HE, Rahmanian-Schwarz A. Growth Differentiation Factor 5 Accelerates Wound Closure and Improves Skin Quality During Repair of Full-Thickness Skin Defects. *Adv Skin Wound Care.* 2017 May;30(5):223-229. doi: 10.1097/01.ASW.0000515078.69041.3c. PMID: 28426571.
7. James R, Kumbar SG, Laurencin CT, Balian G, Chhabra AB. Tendon tissue engineering: adipose-derived stem cell and GDF-5 mediated regeneration using electrospun matrix systems. *Biomed Mater.* 2011 Apr;6(2):025011. doi: 10.1088/1748-6041/6/2/025011. Epub 2011 Mar 24. PMID: 21436509; PMCID: PMC3206634.
8. Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D et al. *Haut in Duale Reihe Anatomie.* p. 1265-1273. Hrsg. 4., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017. doi:10.1055/b-005-143674
9. Fritsch P, Stary A, Trenkwalder B, Zangerle R. (1998). *Aufbau und Funktionen der Haut.* In: *Dermatologie und Venerologie.* Springer Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-21771-9_1
10. Bruckner-Tuderman L, Bruckner P. (2014). *Haut.* In: Heinrich, P., Müller, M., Graeve, L. (eds) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.* Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_73
11. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002 Jul-Aug;12(4):390-9; quiz 400-1. PMID: 12095893.
12. Schallreuter KU, Wood JM. The human epidermis. *Proc Nutr Soc.* 1995 Mar;54(1):191-5. doi: 10.1079/pns19950048. PMID: 7568253.
13. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol.* 2012 May-Jun;30(3):257-62. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007. PMID: 22507037.
14. Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* 2014 Jan-Feb;32(1):3-13. doi: 10.1016/j.clindermatol.2013.05.021. PMID: 24314373.
15. Thulabandu V, Chen D, Atit RP. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2018 Mar;7(2):10.1002/wdev.307. doi: 10.1002/wdev.307. Epub 2017 Dec 15. PMID: 29244903; PMCID: PMC5814349.
16. Betts, G., P. Desaix, and E. Johnson. *Skin.* Jun 19, 2013. 02.02.2023 [cited 2023 02.02.2023]; Available from: File:501 Structure of the skin.jpg - Wikimedia Commons. Lizenz: CC BY 3.0
17. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 20;21(22):8790. doi: 10.3390/ijms21228790. PMID: 33233704; PMCID: PMC7699912.
18. Rennekampff HO, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AMWF) - Ständige Kommission Leitlinien. *Behandlung thermischer*

- Verletzungen des Erwachsenen. 2018 08/2018 [cited 2019 14/12/2019]; Available from: https://www.verbrennungsmedizin.de/files/dgv_files/pdf/leitlinien/044-001l_s2k_Thermische__Verletzungen_Erwachsene_2018-10.pdf.
19. Arturson G. Pathophysiology of the burn wound. *Ann Chir Gynaecol.* 1980;69(5):178-90. PMID: 6162412.
 20. Derkenne C, Ronchi L, Prunet B. Management of Burns. *N Engl J Med.* 2019 Sep 19;381(12):1188. doi: 10.1056/NEJMc1909342. PMID: 31532984.
 21. Amboss. Verbrennung. [WebPage] 2022, September 12 12.09.2022 [cited 2023 09.01.2023]; Available from: <https://www.amboss.com/de/wissen/Verbrennung>.
 22. Peck MD. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. *Burns.* 2011 Nov;37(7):1087-100. doi: 10.1016/j.burns.2011.06.005. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21802856.
 23. Kai-Yang L, Zhao-Fan X, Luo-Man Z, Yi-Tao J, Tao T, Wei W, Bing M, Jie X, Yu W, Yu S. Epidemiology of pediatric burns requiring hospitalization in China: a literature review of retrospective studies. *Pediatrics.* 2008 Jul;122(1):132-42. doi: 10.1542/peds.2007-1567. PMID: 18595996.
 24. Wappler F, Spilker G. (Hg.) *Verbrennungsmedizin.* 2008, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. Lizenz: CC BY NC ND
 25. Daigeler A, Kapalschinski N, Lehnhardt M. Therapie von Brandverletzungen [Therapy of burns]. *Chirurg.* 2015 Apr;86(4):389-401. German. doi: 10.1007/s00104-014-2919-3. PMID: 25894015.
 26. Bergmann PA, Siemers F. *Verbrennungswunden in Verbrennungschirurgie*, M. Lehnhardt, B. Hartmann and B. Reichert, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 37-44.
 27. Fakin RM, et al. *Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit in Verbrennungschirurgie*, M. Lehnhardt, B. Hartmann and B. Reichert, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 45-52.
 28. Gal PP. Burn Degree Diagram. 2007 [cited 2023 01.02.2023]; Available from: https://de.wikipedia.org/wiki/Verbrennung_%28Medizin%29#/media/Datei:Burn_Degree_Diagram-de.png. Lizenz: CC BY-SA 3.0
 29. Müller M, *Chirurgie für Studium und Praxis.* Vol. 11. Auflage. 2014/15: Medizinische Verlags- und Informationsdienste 2011.
 30. Siemers F, Bergmann PA. Stationäre Aufnahme, Prognose, verbrannte Körperoberfläche in *Verbrennungschirurgie*. M. Lehnhardt, B. Hartmann and B. Reichert, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 77-86.
 31. Sogorski A, Lehnhardt M. Initiales klinisches Management des Brandverletzten. *Notfall + Rettungsmedizin*, 2019. 22(4): p. 302-312.
 32. OpenStax College. *Anatomy & Physiology.* C. Wallace rule of nines. 2013 [cited 2023 02.02.2023]; Available from: File:513 Degree of burns.jpg - Wikimedia Commons Lizenz: CC BY 3.0
 33. Fuchs PC, Thamm OC. *Lokaltherapie in Verbrennungschirurgie*, M. Lehnhardt, B. Hartmann and B. Reichert, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 87-98.
 34. Sander F, Rosenberg L. Enzymatisches Débridement der Verbrennungswunde in *Verbrennungschirurgie*, M. Lehnhardt, B. Hartmann and B. Reichert, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 99-104.
 35. Zahn PK, Wolf BM, Hohn A. *Intensivmedizin in Verbrennungschirurgie*, M. Lehnhardt, B. Hartmann and B. Reichert, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 105-114.
 36. Martens D. *Inhalationstrauma in Verbrennungschirurgie*, M. Lehnhardt, B. Hartmann, and B. Reichert, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 115-121.
 37. Netzker R. Einführung (Apoptose) in *Duale Reihe Biochemie*, J. Rassow, et al. Editors. 2016, Georg Thieme Verlag KG. p. 533

38. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PMID: 17562483; PMCID: PMC2117903.
39. Netzker R. Auslösung der Apoptose in Duale Reihe *Biochemie*, J. Rassow, et al. Editors. 2016, Georg Thieme Verlag KG. p. 535
40. Netzker R. Bedeutung der Apoptose in Duale Reihe *Biochemie*, J. Rassow, et al. Editors. 2016, Georg Thieme Verlag KG. p. 533
41. Fleisher TA. Apoptosis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997 Mar;78(3):245-9; quiz 249-50. doi: 10.1016/S1081-1206(10)63176-6. PMID: 9087147.
42. Netzker R. Komponenten des Apoptose-Apparates in Duale Reihe *Biochemie*, J. Rassow, et al., Editors. 2016, Georg Thieme Verlag KG. p. 534-535
43. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016 Apr;8(4):603-19. doi: 10.18632/aging.100934. PMID: 27019364; PMCID: PMC4925817.
44. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005 Nov;37(11):719-27. doi: 10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x. PMID: 16270150.
45. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16. doi: 10.1042/bj3260001. PMID: 9337844; PMCID: PMC1218630.
46. Kumar S. Regulation of caspase activation in apoptosis: implications in pathogenesis and treatment of disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999 Apr;26(4):295-303. doi: 10.1046/j.1440-1681.1999.03031.x. PMID: 10225139.
47. Harrington HA, Ho KL, Ghosh S, Tung KC. Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theor Biol Med Model.* 2008 Dec 10;5:26. doi: 10.1186/1742-4682-5-26. PMID: 19077196; PMCID: PMC2672941.]; Available from: File:Extrinsic and intrinsic pathways to caspase-3 activation.jpg - Wikimedia Commons Lizenz: CC BY 2.5
48. Königshoff M, Brandenburger T. Die Nekrose in *Kurzlehrbuch Biochemie*, M. Königshoff and T. Brandenburger, Editors. 2018, Georg Thieme Verlag KG.
49. Ackermann H, et al. Nekrose in *AllEx - Alles fürs Examen*, H. Ackermann et al., Editors. 2014, Georg Thieme Verlag KG.
50. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:150845. doi: 10.1155/2014/150845. Epub 2014 Jun 12. Retraction in: *Biomed Res Int.* 2020 Aug 28;2020:2451249. PMID: 25013758; PMCID: PMC4075070.
51. Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol.* 1994 Apr;68(4):2521-8. doi: 10.1128/JVI.68.4.2521-2528.1994. PMID: 8139034; PMCID: PMC236730.
52. Liu Z, Shen J, Pu K, Katus HA, Plöger F, Tiefenbacher CP, Chen X, Braun T. GDF5 and BMP2 inhibit apoptosis via activation of BMPR2 and subsequent stabilization of XIAP. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1793(12):1819-27. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.012. Epub 2009 Sep 24. PMID: 19782107.
53. O'Keefe GW, Dockery P, Sullivan AM. Effects of growth/differentiation factor 5 on the survival and morphology of embryonic rat midbrain dopaminergic neurones in vitro. *J Neurocytol.* 2004 Sep;33(5):479-88. doi: 10.1007/s11068-004-0511-y. PMID: 15906156.
54. Wikipedia contributors. GDF – 5 on Wikipedia, The Free Encyclopedia. 2023 [cited 2023 21.01.2023]; Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/GDF5>. Page Version ID: 1136392767
55. Yamashita H, Shimizu A, Kato M, Nishitoh H, Ichijo H, Hanyu A, Morita I, Kimura M, Makishima F, Miyazono K. Growth/differentiation factor-5 induces angiogenesis in vivo. *Exp Cell Res.* 1997 Aug 25;235(1):218-26. doi: 10.1006/excr.1997.3664. PMID: 9281371.

56. Schiefer J. Charakterisierung der zytoprotektiven und wundheilungsfördernden Wirkung des Growth/Differentiation Factor 5 (GDF-5) in einem in vitro Zellkulturmodell sowie ex vivo in einem Verbrennungsmodell der menschlichen Haut. 2017, Merheim Kliniken Köln: Cologne.
57. Sahlender B. Einfluss von oxidativem Stress auf das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen. 2018 Düsseldorf. 32 - 35.
58. Rasmussen C, Thomas-Virnic C, Allen-Hoffmann BL. Classical human epidermal keratinocyte cell culture. *Methods Mol Biol.* 2013;945:161-75. doi: 10.1007/978-1-62703-125-7_11. PMID: 23097107.
59. Gstraunthaler G, Lindl T. (2013). Stammzellen und Tissue Engineering. In: Zell- und Gewebekultur. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35997-2_21
60. Wergen N. Entwicklung eines in-vitro-Modells zur Untersuchung des sekundären Wundprogresses in der Stase-Zone von Verbrennungsverletzungen, K.f.O.u. Unfallchirurgie, Editor. 2022: Düsseldorf. p. 28-29.
61. Promega. CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. 2020 [cited 2019 14.12.2019]; Available from: <https://www.promega.de/resources/protocols/automated-protocols/0/celltiter-blue-cell-viability-assay-automated-protocol/>.
62. Tan JQ, Zhang HH, Lei ZJ, Ren P, Deng C, Li XY, Chen SZ. The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats. *Burns.* 2013 Dec;39(8):1551-6. doi: 10.1016/j.burns.2013.04.018. Epub 2013 Jun 14. PMID: 23751274.
63. Singer AJ, McClain SA, Taira BR, Guerriero JL, Zong W. Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns. *Acad Emerg Med.* 2008 Jun;15(6):549-54. doi: 10.1111/j.1553-2712.2008.00115.x. PMID: 18616442.
64. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Sep;71(17):3241-55. doi: 10.1007/s00018-014-1612-5. Epub 2014 Apr 9. PMID: 24714880; PMCID: PMC4134422.
65. Bracken MB. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *J R Soc Med.* 2009 Mar;102(3):120-2. doi: 10.1258/jrsm.2008.08k033. PMID: 19297654; PMCID: PMC2746847.
66. Vogt L, Reichlin TS, Nathues C, Würbel H. Authorization of Animal Experiments Is Based on Confidence Rather than Evidence of Scientific Rigor. *PLoS Biol.* 2016 Dec 2;14(12):e2000598. doi: 10.1371/journal.pbio.2000598. PMID: 27911892; PMCID: PMC5135031.
67. Bebarta V, Luyten D, Heard K. Emergency medicine animal research: does use of randomization and blinding affect the results? *Acad Emerg Med.* 2003 Jun;10(6):684-7. doi: 10.1111/j.1553-2712.2003.tb00056.x. Erratum in: *Acad Emerg Med.* 2003 Dec;10(12):1410. PMID: 12782533.
68. Matylevitch NP, Schuschereba ST, Mata JR, Gilligan GR, Lawlor DF, Goodwin CW, Bowman PD. Apoptosis and accidental cell death in cultured human keratinocytes after thermal injury. *Am J Pathol.* 1998 Aug;153(2):567-77. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65599-X. PMID: 9708816; PMCID: PMC1852967.
69. Lanier ST, McClain SA, Lin F, Singer AJ, Clark RA. Spatiotemporal progression of cell death in the zone of ischemia surrounding burns. *Wound Repair Regen.* 2011 Sep-Oct;19(5):622-32. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00725.x. PMID: 22092800; PMCID: PMC3664279.
70. Chen-Deutsch X, Kutner A, Harrison JS, Studzinski GP. The pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh has anti-leukemia effects and can interact with vitamin D analogs to increase HPK1 signaling in AML cells. *Leuk Res.* 2012 Jul;36(7):884-8. doi: 10.1016/j.leukres.2012.03.023. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22541691; PMCID: PMC3361643.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. J. Windolf für die Möglichkeit, diese Dissertation im Forschungslabor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie anfertigen zu können.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med P. Fuchs und bei Frau Priv. Doz. Dr. med. J. Schiefer für die Cobetreuung im Rahmen des gesamten Prozesses.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Suschek und dem gesamten Team des Forschungslabors der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, die mir in allen Phasen durch fachliche Expertise, freundliche Hilfe und besonders durch eine warme und herzliche Arbeitsatmosphäre geholfen haben.

Ein besonderer Dank gilt Rebecca Stasch und meiner Familie, die mich jederzeit durch einen uneingeschränkten Rückhalt unterstützten.