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

MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER CO₂ MEDIIERTEN INHIBITION DER TGF-β INDUZIERTEN FIBROBLASTENDIFFERENZIERUNG

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Maxine Fleckner 2024

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek Zweitgutacher/in: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Meinen Eltern Antonie und Rui

in Liebe und Dankbarkeit

Zusammenfassung

Nach einer Verletzung der Haut werden Signalwege zur Wundheilung aktiviert, dabei können Fibroblasten durch die Einwirkung von TGF-ß und mechanischem Zug in Myofibroblasten differenzieren. Diese Zellen zeichnen sich durch eine bedeutende kontraktile Aktivität aus, welche durch die Präsenz von Myosin und α-SMA ermöglicht wird. Störungen in diesem Prozess, verursacht durch Kollagen, TGF-ß und unkontrollierter Proliferation können zur Bildung von Keloiden und hypertrophen Narben führen. Frühere Arbeiten deuten auf eine Beeinflussung der Differenzierung durch Kohlenstoffdioxid (CO₂) hin, der Wirkmechanismus ist jedoch unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, in einem in-vitro-Ansatz mit humanen Fibroblasten-Zellkulturen die molekularen Wirkmechanismen CO₂, von insbesondere unter Hypoxie und im Glukosemetabolismus zu untersuchen. Wir haben Zellkulturen mit humanen Hautfibroblasten etabliert und in einer Überdruckkammer einer CO₂- oder Stickstoff(N₂)-Atmosphäre ausgesetzt. Zusätzlich wurden zum Zwecke der Induktion der Myofibrogenese bestimmte Kulturen mit TGF-β inkubiert. Die CO₂-Behandlung reduzierte die Myofibrogenese im Gegensatz zur N2-Behandlung, was einen reinen hypoxischen Effekt ausschließt. Durchgeführte Enzym-Aktivitätsassay deuten darauf hin, dass CO₂ die Isocitratdehydrogenase (IDH) und die α-Ketoglutarat-Dehydrogenase (α-KG-DH) im Citratzyklus hemmt und so den Zellzyklus verlangsamt oder pausiert. Unsere Untersuchungen fokussierten auch auf das mitochondriale Regulatorprotein SIRT3, das wahrscheinlich durch Hemmung der Myofibroblastentransformation die Fibrose hemmt. Gleiches gilt für den Transkriptionsfaktor HIF-1a, der bei Hypoxie stabilisiert antimyofibrotische Signalwege stimuliert. Dies wird und würde einer Myofibrogenese effektiv entgegenwirken. Unsere Ergebnisse unterstreichen die Tatsache, dass die Verwendung von CO₂ eine effektive, spezifische und vielversprechende Therapieoption in der Behandlung und Prävention von Keloiden und hypertrophen Narben darstellt. Durch unsere Untersuchungen konnten wir Einblicke in die molekularen Wirkmechanismen dieser Therapieoption gewinnen. Es muss jedoch festgehalten werden, dass weitere Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl erforderlich sind, um diese Erkenntnisse zu festigen und potenzielle Anwendungsmöglichkeiten zu erweitern, die eine vollständige und rezidivfreie Heilung erzielen können.

Summary

After an injury to the skin, many signaling pathways are activated for wound healing. Fibroblasts differentiate into myofibroblasts through TGF- β and mechanical traction. These have a high contractile force due to myosin and α -SMA, which is essential for wound edge closure. However, disturbances in this process due to too much collagen, overproduction of TGF- β , uncontrolled proliferation/regulation and reduced apoptosis rate can lead to the formation of keloids, hypertrophic scars, or sclerotic diseases. Previous work suggests that carbon dioxide (CO₂) influences differentiation, but there is no understanding of the underlying mechanisms.

The objective of this work was therefore to investigate the molecular mechanisms of CO₂, particularly under hypoxia and in the TCA cycle, in an in vitro approach using human fibroblast cell cultures. We established cell cultures with human skin fibroblasts and exposed them to a CO_2 or nitrogen (N₂) atmosphere in a hyperbaric chamber. In addition, certain cultures were incubated with TGF-B to induce myofibrogenesis. CO₂ treatment reduced myofibrogenesis (measured by α-SMA) in contrast to N₂ treatment, ruling out a pure hypoxic effect. Our studies also focused on the mitochondrial regulatory protein SIRT3, which probably inhibits fibrosis by inhibiting myofibroblast transformation. The same applies to the transcription factor HIF-1 α , which is stabilized in hypoxia and thus stimulates antimyofibrotic signaling pathways. A CO₂-induced increase in SIRT3 and the stabilization of HIF-1a would thus effectively counteract TGF- β -induced myofibrogenesis. Such an effect would also be further supported by a CO₂-specific disruption/ pause or slowing down of the TCA cycle, as shown in the form of the reduction of isocitrate dehydrogenase (IDH) and α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KG-DH) activity. Our results underline the already known fact that the use of CO₂ is an effective, specific, and promising therapeutic option in the treatment and prevention of keloids, hypertrophic scars, and other fibrotic skin diseases. Through our investigations, however, we were able to make significant progress by gaining initial insights into the molecular mechanisms of action of this therapeutic option, for the first time also at the level of the TCA cycle. Nevertheless, it must be noted that further studies with a larger number of cases are required to consolidate these findings and expand potential applications that can achieve a complete and relapse-free cure.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Α	Ampere
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
Aqua dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
АТР	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
Cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
СоА	Coenzym A
СТВ	CellTiterBlue Assay
CTS	Carpal- Tunnel- Syndrom
d	Тад
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii (lat. = und andere)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
н	Wasserstoff
h	Stunde

Н	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCI	Chlorwasserstoff
HE	Hämalaun und Eosin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-ethansulfonsäure
HIF-1α	Hypoxie- induzierbarer Faktor 1 Alpha
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IDH	Isocitratdehydrogenase
in vitro	Experimente außerhalb des lebendigen Organismus
J	Joule
kDa	Kilo Dalton
α- KG-DH	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase
КО	Kontrolle
М	Molare Masse
MD	Morbus Dupuytren
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MW	Mittelwert
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH-DH	NADH- Dehydrogenase
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ND	Nicotinamidadenindinukleotid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH Oxidase
0	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-Buffer-Solution (engl. Puffer Lösung)
PDGF	Plateler Derived Growth Factor

pg	Pikogramm
рН	Potentia Hydrogenii
PP	Polypropylen
PVC	Polyvinylchlorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRT3	Sirtuin 3
Std.	Stunde
TBS	Tris.gepufferte Salzlösung
TBS/T	TBS mit Tween20
TF	Tissue factor
TGF-β	Transforming Growth Factor- β
TIMPs	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
U/min	Umdrehungen pro Minute
u.a.	Unter anderem
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
α	alpha
α- SMA	alpha-Smooth Muscle Aktin
β	beta
μ	Mikro
hð	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μΜ	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

Zusamn	nenfassung	I
Summa	ry	
Abkürzu	Ingsverzeichnis	III
1 Einle	eitung	1
1.1	Aufbau der Haut	1
1.1.1	Epidermis	2
1.1.2	2 Dermis	2
1.1.3	Subkutis	3
1.2	Wundheilung	3
1.2.1	Phasen der Wundheilung	4
1.2.2	Pibroblasten und Myofibroblasten	6
1.3	Wachstumsfaktoren in der kutanen Wundheilung	8
1.3.1	Transforming Growth factor- TGF-β	8
1.3.2	2 Sirtuin 3	9
1.4	Pathologische Wundheilung	9
1.5	Überblick der bisherigen Therapieformen	12
1.6	Kohlenstoffdioxid	15
1.6.1	CO2 in der medizinischen Anwendung	15
1.6.2	Effekte von CO2 auf zelluläre Prozesse der Haut	15
1.7	Effekte einer Hypoxie	16
1.8	Citratzyklus	16
1.9	Zielsetzung	18
2 Mate	erial	19
2.1	Verbrauchsmaterial	19
2.2	Geräte	22
2.3	Substanzen und Lösungen (Chemikalien und Reagenzien)	26
2.4	Medien und Puffer	28
2.5	Antikörper und Marker	30
2.6	Kit Systeme	30
2.7	Software	31
2.8	Spender	31
3 Meth	noden	33

3.1	Überblick	33
3.2	Zellkultur / Allgemeine Anmerkungen	33
3.2.1	Isolierung der Fibroblasten aus Hautplastiken	34
3.2.2	Subkultivierung der Fibroblasten	35
3.2.3	Kryokonservierung und Auftauen von Fibroblasten	35
3.2.4	Ermittlung der Zellzahl	36
3.3	Druckkammer Gas-Versuch	37
3.3.1	Aufbau und Eigenschaften der Druckkammer	37
3.3.2	Versuchsdesign	38
3.3.3	Ausplattieren der Zellen für die Versuche	38
3.3.4	Versuchsdurchführung	40
3.4	Ernte der Proben	41
3.5	Prinzip des CellTiterBlue-Assay	41
3.6	Prinzip der Hoechst- und Propidiumiodid-Färbung	42
3.7	Image J Zellzahl- Bestimmung	42
3.8	Immunzytochemische Anfärbung (α-SMA)	43
3.9	Sonifizierung	45
3.10	Proteinbestimmung	45
3.11	Western Blot- Analyse	46
3.11.	1 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese	46
3.11.	2 Blotting	47
3.11.	3 Blocken und Antikörpermarkierung	48
3.11.	4 Detektion	48
3.11.	5 Auswertung	48
3.12	Enzym-Aktivität Assay	49
3.13	Statistik	50
Erge	bnisse	51
4.1	Einfluss der Überdruckbehandlung auf die Zellvitalität	51
4.1.1	CellTiterBlue	51
4.1.2	PJ/ Hoechst	52
4.2	Einfluss der Überdruckbehandlung auf die Myofibrogense	55
4.2.1	Immunfärbung α-SMA	55
4.2.2	Westernblot	58
4.3	Einfluss der Überdruckbehandlung auf den Citratzyklus	64
4.3.1	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase	64
4.3.2	Isocitrat Dehydrogenase II	65
	3.1 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.4 3.4 3.5 3.6 3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.11. 3.12. 3.13. 4.3.1 4.3.1	3.1 Überblick

5	Disk	ussion	67
	5.1	Die Rolle von CO ₂ auf die Myofibrogenese	68
	5.1.1	Allgemein	68
	5.1.2	Spezifische Wirkung	69
	5.1.3	Zelluläre Effekte	69
	5.1.4	Antifibrotische Effekte	70
	5.1.5	HIF-1α	72
	5.1.6	Sirtuin 3	73
	5.1.7	Citratzyklus	75
	5.1.8	Vergleich zur Radiotherapie/ Brachytherapie	78
	5.2	Wirkung von Stickstoff	79
	5.3	Kritische Betrachtung und mögliche Schwächen der Arbeit	79
	5.4	Ausblick und therapeutische Perspektive	81
6	Abbi	ldungsverzeichnis	84
7	Tabe	llenverzeichnis	85
8	Litera	atur- und Quellenverzeichnis	86

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut gilt mit einer Fläche von bis zu 2 m² und einem Gewicht von 10-20 kg als das größte und schwerste Organ des Menschen. Sie umzieht den gesamten Körper und besteht dabei aus mehreren Komponenten. Gemäß der anatomischen Nomenklatur setzt sich die Haut aus zwei Hauptschichten zusammen: der Epidermis, auch als Oberhaut bekannt, und der Dermis, auch als Lederhaut bezeichnet. Diese beiden Schichten arbeiten zusammen, um die Kutis, also die gesamte Haut, zu bilden.. Die darunterliegende Schicht bezeichnet man als Subkutis (Unterhaut). Kutis und Subkutis lassen sich zusammenfassen als Hautdecke (Integumentum commune). Zusätzlich gehören Haare, Nägel und Drüsen ebenfalls als Anhangsgebilde zur Haut. Als größtes Organ werden der Haut vielfältige Aufgaben zuteil. Diese umfassen vor allem Schutz und Barriere vor mechanischen, thermischen, mikrobiellen sowie chemisch-toxischen Schäden als auch eine Barriere gegen Austrocknung und Absorption von Strahlung. Zudem ist die mitverantwortlich für Temperaturregulation Haut die sowie Sinneswahrnehmung. 1-3



Abbildung 1: Aufbau der Haut

(Quelle: Goebler, Hamm, 2017, Basiswissen Dermatologie, S.5, mit Genehmigung des Springer Verlags)

1.1.1 Epidermis

In der gefäßlosen Epidermis bestehend aus mehrschichtigem, verhornenden Plattenepithel, befinden sich zu 90 % Keratinozyten. Sie bildet mit mehreren Schichten die Oberfläche des Körpers und variiert in ihrer Dicke abhängig von Hautregion sowie Alter und Geschlecht zwischen 30 und 300 μ m.²

Es handelt sich hierbei um ein Proliferationsgewebe, welches einer ständigen Erneuerung unterliegt. Es erfolgt dabei eine stetige Umwandlung von kernhaltigen Zellen in tote, kernlose Korneozyten, die nach 4 Wochen als Hornschuppen abgeschilfert werden.

Das Stratum basale, die unterste Schicht, ist dabei für die Neubildung von Keratinozyten verantwortlich. Dort finden sich Basalzellen, welche sich in eine Stammzelle und eine Zelle teilen, die später zum Keratinozyten ausdifferenziert. Je weiter die Zellen an die Oberfläche gelangen, desto mehr nimmt die Verhornung zu. Es folgt das Stratum spinosum, welches auch wegen der anteilig hohen Zahl an Desmosomen als Stachelschicht bezeichnet wird. Darüber liegt das Stratum mit Körnerzellen, die granulosum seinen vorwiegend basophile Keratinhyalingranula enthalten. Das Stratum corneum bildet die äußerste Schicht mit flachen, fest gepackten kernlosen Korneozyten. Diese Verhornung bildet eine stabile und impermeable Barriere. ^{1,2,4}

1.1.2 Dermis

Die Dermis ist der durchblutete, bindegewebige Teil der Kutis und befindet sich direkt unter der Epidermis. Ihre Dicke variiert je nach Lokalisation zwischen 2- 4 mm. Der hohe Bindegewebsanteil verleiht der Haut ihre Festigkeit und Elastizität und schützt vor Verletzungen, zudem dient sie als Wasserspeicher. Sie setzt sich aus zwei Schichten zusammen, dem Stratum papillare außen, welches die Verbindung zur Epidermis darstellt sowie dem Stratum reticulare innen, mit einem hohen Anteil an Kollagen und elastischen Fasern. Hauptsächlich die Kollagenfasern ermöglichen die mechanische Stabilität und Dehnbarkeit der Dermis. In der Dermis vorkommende Kollagentypen sind das Kollagen Typ I, III, IV, V, VI und VII. Sowohl deren Synthese als auch deren Abbau unterliegen einer komplexen Regulierung. Neben den kollagenen Fasern bilden die elastischen Fasern einen großen Anteil der dermalen Fasern, sie geben der Haut ihre Elastizität und Festigkeit. ^{1,3}

Fibroblasten bzw. ihre inaktive Form, die Fibrozyten, bilden die dominierenden Zellen der Dermis und weisen eine spindelförmige Form mit langen Fortsätzen auf. Diese Zellen synthetisieren alle Fasern, vor allem Kollagen, sowie die Grundsubstanz, auch extrazelluläre Matrix genannt. Diese dient als Gerüst der Dermis, in welche Zellen und Fasern eingebettet sind. Ihr Gerüst besteht aus vielen Anteilen, vorwiegend Proteoglykanen wie Hyaloronsäure und Dernatansulfat sowie Glykosaminoglykane und Glykoproteine. Es sei hier erwähnt, dass Fibroblasten jedoch kein Desmin und α -SMA synthetisieren ⁵. Weitere Zellen der Dermis bilden die Histiozyten und deren aktive Form, die Makrophagen. Sie dienen der Phagozytose und zudem der Speicherung von Fetten, Zellresten und Proteinen. Zudem interagieren sie während immunologischer Reaktionen. Zudem sind Mastzellen über die gesamte Dermis hinweg zu finden, sie spielen eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen und anderen Entzündungsvorgängen. Zudem enthalten sie Wachstumsfaktoren. ^{1–3}

1.1.3 Subkutis

Die Subkutis, das Unterhautfettgewebe, bildet die unterste Schicht der Haut und besteht vorwiegend aus läppchenartig aufgebautem Fettgewebe und lockerem Bindegewebe, in welchem die makroskopisch sichtbaren Nerven und Gefäße in Septen verlaufen. Funktionell besteht die Aufgabe der Subkutis in der Energiespeicherung sowie Schutz vor Hypothermie mittels Wärmeisolation. Außerdem dient die Subkutis als Druckpolster und ermöglicht über die in ihr liegenden Vater- Pacini-Lamellenkörperchen die Wahrnehmung von Druck und Vibrationen.^{2,3,6}

1.2 Wundheilung

Die Hauptaufgabe der Haut liegt in der Barriere- und Schutzfunktion des Organismus gegenüber äußeren Einflüssen. Aus diesem Grund ist es essenziell, dass eine Verletzung dieser Barriere schnell und effizient repariert und eine Narbe gebildet wird. ^{7–9} Die Wundheilung ist ein komplexer biologischer Prozess, an dem viele verschiedene zelluläre Bestandteile wie Immunzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten sowie extrazelluläre Komponenten beteiligt sind. Sie setzt sich zusammen aus drei sich zeitlich überlappenden Phasen: Zuerst erfolgt die exsudative Phase, in der es nach einer Verletzung zu einer physiologischen Entzündung kommt, anschließend bildet sich Granulationsgewebe in der

exsudativen Phase aus. Die letzte Phase besteht in der Reparation, in der eine vermehrte Kollagensynthese mit Gewebemodellierung zu beobachten ist ^{9,10}. Die meisten Verletzungen führen so zu einem Funktionsverlust des Gewebes, was als Narbe bezeichnet wird.

Die erfolgreiche Regeneration von Gewebe ohne Beeinträchtigung der Funktion wurde bisher nur bei einer begrenzten Anzahl von Organismen sowie während der fetalen Entwicklung des Menschen beobachtet. Weshalb diese Fähigkeit jedoch im späteren Leben verloren geht, ist noch unklar. ^{7,11,12} Es könnte sein, dass eine verminderte Menge an Transforming Growth factor beta (TGF-β) dafür verantwortlich ist. ¹³

1.2.1 Phasen der Wundheilung

Die Wundheilung beginnt unmittelbar nach einer Gewebsverletzung. Das primäre Ziel ist hierbei, den Blutverlust schnellstmöglich zu stoppen. Dies erfolgt mittels Hämostase durch Thrombozytenaggregation. Freigelegtes Kollagen an den verletzten Gefäßwänden sorgt bei Kontakt für eine Aktivierung der Thrombozyten mit anschließender Aggregation und Vasokonstriktion und dadurch schnellerer Blutstillung. Dies markiert den Auftakt einer Reihe von von Ereignissen, die zu der Bildung eines vorläufigen Fibrin Verschlusses mittels Fibrin Pfropfen führt, gleichzeitig dient Fibrin als Matrix für die spätere zelluläre Migration.¹⁰

Die Thrombozyten selbst sorgen mit der Freisetzung von PDGF und TGF-β für die Initiierung des Wundheilungsprozesses, da diese beiden Mediatoren eines der wichtigsten Signale hierfür darstellen. Sie fördern die Wundheilung unter anderem durch Aktivierung von Makrophagen und stimulieren die Proliferation von Fibroblasten⁹. Durch die Thrombozyten erfolgt zudem die Freisetzung von TGF-β, welches ebenfalls eine wichtige Aufgabe in der Wundheilung besitzt. Es sorgt als Wachstumsfaktor für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die für den Wundverschluss verantwortlich sind. Gleichzeitig ermöglicht die Freisetzung verschiedener anderer Zytokine die Anlockung (Chemotaxis) weiterer Immunzellen wie Monozyten und neutrophile Granulozyten zum Ort der Wunde¹⁴. Neutrophile Granulozyten sind dafür verantwortlich, die Wunde von fremdem Material, möglichen Bakterien und funktionslosen Zellen zu säubern. Zudem können sie Zytokine ausschütten, um Fibroblasten zu aktivieren. Sie werden nach ein paar Tagen, wenn sie nicht mehr benötigt werden, von Makrophagen phagozytiert. ⁸ Bei Makrophagen handelt es sich um die aktivierte Form der zuvor eingewanderten Monozyten, dies geschieht circa 48 Stunden nach der Verletzung. Sobald Makrophagen aktiviert sind, liegt ihre Aufgabe in der Phagozytose von noch vorhandenen Bakterien und pathogener Organismen sowie anderer Zellen, wie mit Bakterien gefüllte Neutrophile und Matrix Debris. Gleichzeitig synthetisieren sie ebenfalls eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Die Zytokine dienen dabei der Anlockung weiterer Neutrophile, Monozyten sowie Leukozyten in das Wundareal. Die Wachstumsfaktoren ziehen zudem Fibroblasten und glatte Muskelzellen an. ⁹

Auf die exsudative Phase folgt ab dem 4. Tag die regenerative Phase, in der der Wundgrund bereits mit Granulationsgewebe ausgefüllt wird. Dieses besteht vorwiegend aus einem faserreichen Netz aus Fibronektin und Kollagen. Diese Phase zeichnet sich aus durch Zellproliferation und Migration. Die erste stattfindende Aktion ist die Migration von Keratinozyten ins Wundgebiet. Diese Epithelzellen werden angelockt und beginnen am Wundrand mit der Reepithelialisierung. Startsignal für die Migration und Proliferation ist wahrscheinlich der dabei fehlende Kontakt zur Nachbarzelle. ^{9,10} Durch deren Einwanderung kann eine Barrierefunktion des Epithels widerhergestellt werden. ⁷

Gleichzeitig migrieren Fibroblasten in das Wundgebiet, angelockt durch Makrophagen und deren Zytokine, und beginnen mit der Synthese von extrazellulärer Matrix. Dabei wird die zuvor gebildete provisorische Matrix durch eine Matrix aus Kollagen, vorwiegend von Typ 3, ersetzt. Hauptinduktoren für dessen Synthese sind TGF-β und IL1.^{9,10}

Bei der Reepithelialisierung würde es sich um einen selbstlimitierenden Prozess ohne einhergehende Angiogenese handeln. Die Gefäßneubildung ist für eine funktionierende Wundheilung essenziell, da sie das neue Granulationsgewebe versorgt. ¹⁰ Sie beruht hauptsächlich auf Chemotaxis und Wachstumsfaktoren, unter anderem fibroblast growth factor 2 (FGF2) und vascular endothelial growth factor (VEGF), die am Wundrand freigesetzt werden. FGF2 wird dabei von geschädigten Endothelzellen sowie Makrophagen sezerniert. VEGF wird von Keratinozyten und Makrophagen ausgeschüttet ⁸. Gleichzeitig stimulieren Faktoren wie ein geringer pH-Wert, ein erhöhter Laktatwert sowie ein geringer Sauerstoffpartialdruck aufgrund der erhöhten metabolischen Aktivität im Wundgewebe die Freisetzung dieser Mediatoren ¹⁴. Auslöser für das Ende der

5

Angiogenese und die Apoptose einiger Gefäße bildet die Wunde selber, sobald ausreichend Granulationsgewebe vorhanden ist. Dieser programmierte Zelltod beruht wahrscheinlich auf einem Zusammenspiel verschiedener Matrixmoleuküle, allen voran Trombospondin 1 und 2 sowie Antiangiogenesefaktoren.⁹

Daran schließt sich die reparartieve Phase an, welche nach circa zwei bis drei Wochen nach Verletzungsbeginn eintritt. In dieser Phase kommt es zur Degradierung des Granulationsgewebes. Zudem kontrahieren sich die Wundränder und die extrazelluläre Matrix wird neu gebildet, sodass eine finale Narbe gebildet wird. ⁹

Fibroblasten beginnen, stimuliert durch TGF-β sowie mechanischen Zug, sich zu Myofibroblasten umzuwandeln. Myofibroblasten besitzen die Fähigkeit zur Expression von alpha-Smooth Muscle Actin (α-SMA), einem Zytoskelettprotein, welches normalerweise in glatter Muskulatur vorkommt. Dadurch formen die Myofibroblasten kontraktile Bündel. Sie enthalten Aktin Mikrofilamente, welche für eine Kontraktion und schlussendlich Verschluss der Wunde sorgen. ^{8,15,16} Auf diesen Prozess der Differenzierung wird in späteren Teilen der Arbeit näher eingegangen.

Die nun kollagenhaltige Matrix sendet Signale an die Fibroblasten, die Kollagensynthese zu stoppen und stattdessen das vorhandene Kollagen zu remodellieren. Diese Matrix wird in den folgenden Monaten noch weiter moduliert und das Kollagen Typ 3 wird durch Kollagen Typ 1 ersetzt. Der notwendige Abbau des Typ 3 Kollagens erfolgt dabei durch Metalloproteasen, die von verschiedenen Zelltypen synthetisiert werden. ⁹

Die meisten der in der Wunde enthaltenen Zellen gehen in Apoptose oder verlassen die Wunde, sobald der Vorgang der Kontraktion abgeschlossen und die Wunde verschlossen ist. Zurück bleibt eine vorwiegend zell-lose Masse, die hauptsächlich aus Kollagen sowie extrazellulärer Matrixproteine besteht. Trotzdem erhält eine Narbe nie ihre volle Kraft und Funktion zurück, die die unverletzte Haut zuvor hatte. ^{7,9}

1.2.2 Fibroblasten und Myofibroblasten

Die Fibroblastendifferenzierung sowie Myofibrogenese spielen entscheidende Faktoren in der pathologischen Wundheilung und Narbenentstehung und haben daher einen großen Stellenwert in der hier angefertigten Arbeit. Fibroblasten, die einen mesenchymalen Ursprung haben, sind Hauptbestandteil des Bindegewebes und kommen dementsprechend nahezu im gesamten Organismus vor. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie für den Auf- Um- und Abbau der EZM hauptverantwortlich sind, da sie die Synthese und den Abbau verschiedener Strukturproteine wie Kollagene, Proteoglykane oder Proteasen regulieren. ^{5,17}

Bereits 1971 zeigte die Forschungsgruppe Majno et al., dass sich einige Fibroblasten während der Wundheilung zu Myofibroblasten differenzieren.¹⁸

Myofibroblasten zeichnen sich aus durch fokale Adhäsionen sowie Stressfasern, die a-SMA enthalten und durch ihren Aktinmyosin Gehalt große kontraktile Kräfte erzeugen können. Diese Kräfte werden dazu benötigt, die neue EZM zu remodellieren und so die Wundränder zusammenzuziehen. ¹⁹

Zudem bilden die Myofibroblasten Zell- Zell- Verbindungen aus. Mit diesen können sie intrazelluläres Aktin mit den extrazellulär vorkommendem Fibronektin Domänen verbinden. Dies ist die Grundlage, die es ermöglicht, dass die Kraft, die durch die Stressfasern erzeugt wird, mittels mechanischer Transduktion an die umliegende EZM übertragen wird. Dies wiederum löst eine Kontraktion aus. Sie wird verstärkt durch die Synthese von Kollagen, vorwiegend Typ III, welches die EZM rigider macht. ^{16,20}

Die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten wurde in vielen Studien untersucht. Bislang geht man davon aus, dass bei einer Verletzung Veränderungen in der Umgebung zu mechanischem Stress führen und sich der Fibroblast zunächst zum Protomyofibroblast differenziert. Dies geschieht meist 2-4 Tage nach einer Verletzung. Protomyofibroblasten zeichnen sich dadurch aus, dass sie zytoplasmatisches Aktin enthalten und Fibronektin, sowie unter anderem auch ED-A Fibronektin exprimieren. Die Transition zwischen Protomyofibroblast und Myofibroblast wird daraufhin durch die ED-A *splice* Variante des Fibronektins und TGF- β ausgelöst. ED-A Fibronektin bildet dabei ein multifunktionelles Glykoprotein der EZM. ²¹

TGF- β wird dabei von phagozytierenden Zellen sowie Protomyofibroblasten synthetisiert. Wie bereits erwähnt, stimuliert TGF- β außerdem die Kollagenproduktion sowie die Synthese des für Myofibroblasten charakterisierende α -SMA. ^{15,20}

7

Nach abgeschlossener Wundheilung sterben die Myofibroblasten via Apoptose, jedoch wird auch über eine mögliche Redifferenzierung zu Fibroblasten diskutiert. 5,22

Während einer pathologischen Wundheilung hingegen persistiert die Aktivität der Myofibroblasten, was zu hypertrophen Narben, Keloiden, Fibrose und auch Morbus Dupuytren führen kann. Außerdem können auch Organe betroffen sein wie Leber, Herz, Lunge oder Nieren. ^{15,16,20}



Abbildung 2: Darstellung der Differenzierung von Fibroblast zu Myofibroblast Die Differenzierung erfolgt vom Fibroblasten über den Proto- Myofibroblasten zum Myofibroblasten. Als Trigger der Differenzierung dient mechanischer Stress. Myofibroblasten zeichnen sich dabei aus durch fokale Adhäsionen und α-SMA.

1.3 Wachstumsfaktoren in der kutanen Wundheilung

1.3.1 Transforming Growth factor- TGF-β

Einen entscheidenden Einfluss auf die Wundheilung hat das Zytokin TGF-β. Es wird im Rahmen dieser u.a. von Makrophagen und Fibroblasten gebildet, kann aber auch aus der beschädigten Extrazellulärmatrix freigesetzt werden. Unter anderem sorgt TGF-β dabei für eine gesteigerte Angiogenese sowie die Umdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die den Wundverschluss fördern. Eine exzessive TGF-β Aktivität, allen voran die Unterform TGF-β 1, kann jedoch fibrosesteigernd und zu der Bildung hypertropher Narben führen. ^{23–25} Fibroblasten reagieren unter Ausschüttung von TGF- β 1 mit einer Expression und Umwandlung zu Myofibroblasten und den darin befindlichem α -SMA. Die Induktion dieses Phänotyps ist dabei mit der Ausschüttung weiterer profibrotischer Faktoren und Zytokinen assoziiert, die die Gewebeveränderung und Fibrose vorantreiben. ²⁶

1.3.2 Sirtuin 3

Sirtuin 3 gehört zu den Deacetylasen, welche in den Mitochondrien lokalisiert sind und eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen wie Wachstum, Apoptose, Metabolismus sowie Detoxifikation und der Kontrolle der ROS-Level spielen. Des Weiteren deacetyliert es die für den Citratzyklus wichtige IDH2, welche ein NADPH Lieferant darstellt, genauso wie HIF-1 α . Zudem werden durch SIRT3 verschiedenste DNA-Reparaturmechanismen aktiviert. Durch die starke Beteiligung von SIRT3 an diesen Reparaturmechanismen wird davon ausgegangen, dass Änderungen in der SIRT3 Expression, unter anderem hervorgerufen durch die Anwesenheit von TGF- β , zu einer veränderten Reaktion auf Verletzungen führen können. ^{26–28}

1.4 Pathologische Wundheilung

Die Wundheilung der Haut stellt ein System aus komplexen Prozessen und Interaktionen dar. Durch einen koordinierten Ablauf zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix wird eine fehlerfreie Gewebereparatur gewährleistet. Alle beteiligten Faktoren sind dabei exakt aufeinander abgestimmt und die ablaufenden Prozesse unterliegen einer ständigen Kontrolle durch Feedback Mechanismen.¹⁰

Eine dysfunktionale Wundheilung durch Störungen im Gleichgewicht dieser Faktoren und Abläufe und damit folgende gesundheitliche Folgen stellen dabei nicht nur für die betroffene Person eine große Einschränkung dar, sondern verursachen auch große Kosten für das Gesundheitssystem. Nicht selten bedeutet dies eine lebenslange Einschränkung in der Arbeitsfähigkeit und hat so einen enormen persönlichen, aber auch ökonomischen Einfluss.⁷

Es kann zu fibrotischen Erkrankungen kommen, die den gesamten Organismus betreffen. Eine dermatologische Form davon stellen Keloide und hypertrophe Narben dar. Diese Narbentypen zeichnen sich aus durch einen Überschuss an extrazellulärer kollagenhaltiger Matrix sowie erhöhter Vaskularisation und Zellproliferation.⁷

Vor allem in der Kopf- und Nackenregion verursachen sie Probleme. Oft sind die Beschwerden eher kosmetischer Natur, es kann jedoch auch zu Juckreiz, Schmerzen oder Druckgefühl kommen. Speziell Keloiden können oft schmerzhaft sein.²⁹

Die erste Schwierigkeit bei Behandlung von abnormalen Narben besteht zunächst in der Identifikation und richtigen Diagnose. Bislang besteht nach wie vor ein Bedarf an Leitlinien für die Diagnose und Behandlung. Um die klinische Definition zu vereinfachen, hat der *Japan Scar Workshop* (JSW) ein Tool erstellt, mit welchem objektiv Keloide und Narben diagnostiziert werden können. Dieses Tool trägt den Namen *"the JSW Scar Scale* (JSS)". Dabei werden Risikofaktoren der Patienten sowie Charakteristika der Läsionen aufgenommen. ^{30,31}

Hypertrophe Narben sind rötlich, treten kurz nach der vorrausgegangenen Verletzung, meist nach Verbrennungen, auf und gehen nicht über die ursprünglichen Wundränder hinaus. Zudem können sie nach einiger Zeit wieder von selbst verschwinden.²⁹

Im Gegensatz dazu können Keloide auch noch Jahre nach einer Verletzung auftreten und neigen dazu, auch das umliegende, gesunde Gewebe zu infiltrieren. Zudem besteht die Besonderheit bei Keloiden darin, dass sie gehäuft bei Menschen mit dunkler Hautfarbe oder asiatischer Herkunft auftreten³², eine genetische Disposition ist also naheliegend. Keloide gelten außerdem als unheilbar, auch nach chirurgischer Exzision besteht eine hohe Rezidivrate.²⁹

Neben der klinischen Symptomatik macht man sich mittlerweile auch die histologischen Eigenschaften der Narbentypen zur Differenzierung zunutze.

Unversehrte Haut besitzt Kollagenbündel, die parallel zum Epitheloberfläche verlaufen. In hypertrophen Narben, welche hauptsächlich flaches Typ 3 Kollagen enthalten, sind dessen Bündel wellenförmig angeordnet, trotzdem aber weitestgehend parallel zum Epithel verlaufend. Zusätzlich enthalten hypertrophe Narben noduläre Strukturen, in denen α -SMA exprimierende Myofibroblasten, kleine Gefäße und Kollagenbündel enthalten sind. ³³

In Keloiden hingegen kann man kaum Kollagenbündel ausmachen, die Kollagenfasern (Typ I und III) verlaufen in ungeordneten Schichten ohne richtige

Orientierung unter dem Epithel. Auffallend ist hier außerdem die erhöhte Kollagenproduktion, die um das 20-fache gesteigert ist gegenüber narbenloser Haut sowie dreifach gesteigert gegenüber hypertrophen Narben. ³⁴ Neben der erhöhten Kollagensynthese konnte außerdem ein gesteigertes Vorkommen von Fibronektin festgestellt werden. ^{35,36} Im Unterschied zu hypertrophen Narben finden sich jedoch keine Noduli mit Myofibroblasten. ³³

Der genaue Pathomechanismus hinter dieser Dysregulation ist weitestgehend unbekannt, es gibt aber einige Hinweise. So tragen patientenabhängige Faktoren (Genetik, Herkunft, hormonelle Dysregulation, Alter, Schwangerschaft, Bluthochdruck), Faktoren bezüglich Lokalisation der Wunde und dortige Hautgegebenheiten sowie Umweltfaktoren (Trauma, Verbrennung, Entzündung, Operation, Spannung) zu einer abnormalen zellulären Antwort bei. ^{37–41}

Einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der beiden Krankheitsbilder besitzen die gesteigerte Produktion und verminderte Downregulation einiger Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β , VEGF). Eine erhöhte Fibroblastenrekrutierung, Kollagen- und Fibronektinsynthese, Neovaskularisation und Myofibroblastendifferenzierung sind zu beobachten. ^{9,34,42} Darüber hinaus konnten weitere Arbeitsgruppen eine erhöhte Rezeptor-Rate für TGF- β in Keloidfibroblasten feststellen. ⁴³

Daneben sind die MMPs, verantwortlich für den Umbau der EZM, sowie deren Gegenspieler, die TIMPs, in der Ursachenforschung nicht zu vernachlässigen. Es wird vermutet, dass ein Missverhältnis in der Expression der beiden Gegenspieler ebenfalls zur Entstehung dieser Krankheitsbilder, vermutlich durch verminderten Abbau von Kollagen, beitragen kann. ³⁴

Zusätzlich werden gestörte Apoptose Mechanismen in der Entstehung hypertropher Narben und Keloide diskutiert. Es wurde festgestellt, dass Fibroblasten und Myofibroblasten nach der eigentlich abgeschlossenen Wundheilung nicht wie üblich in Apoptose gehen. ^{34,44}

Es existiert eine weitere fibrotische Krankheit, Morbus Dupuytren, bei der fibrotische Mechanismen an der Palmaraponeurise zu einer Krümmung der Finger führen. Hier kann ebenfalls eine gestörte Apoptoseregulation der Myofibroblasten beobachtet werden. ¹⁵

1.5 Überblick der bisherigen Therapieformen

Die Behandlung von Keloiden und hypertrophen Narben ist eine Herausforderung und gestaltet sich des Öfteren als sehr frustran. Es gibt eine Vielzahl an Behandlungsmöglichkeiten, jedoch wurde bisher keine optimale Therapiemethode als Goldstandard etabliert. Es hat sich aber gezeigt, dass eine Kombination verschiedener Therapien das maximale Potential einer erfolgreichen Behandlung verspricht.⁴⁵ Die AWMF-S2k-Leitlinie "Therapie pathologischer Narben (hypertrophe Narben und Keloide) von 2020 sieht einen Therapiealgorithmus vor, abhängig vom Narbentyp. Dieser orientiert sich an den internationalen *Guidelines*, die vom *International Advisary on Scar Management* veröffentlicht wurden. ^{45,46}

Zunächst ist es wichtig hervorzuheben, dass die Prävention pathologischer Narben einen großen Stellenwert einnimmt, denn es ist einfacher, ihre Entstehung zu verhindern, als bereits entstandene pathologische Narben zu behandeln, besonders bei Patienten mit auffälliger Anamnese. ⁴⁷ Hierbei ist es wichtig, auf eine gutes Wundmanagement und die Reduktion von Zugkräften zu achten. Bei notwendigen chirurgischen Eingriffen sollte atraumatisch, mit zugentlastenden Nahttechniken und geeigneten Materialien gearbeitet werden. Bei hohem Risiko sollte postoperativ außerdem über die Anwendung von Silikongelen sowie Kompression nachgedacht werden.⁴⁸

Im Falle einer hypertrophen Narbe wird nach Grad der Beeinträchtigung eine Therapieoption ausgewählt. Handelt es sich um eine hypertrophe Narbe ohne Kontrakturzeichen, so sollte die Narbe mit einer oder mehreren der bestehenden nicht- invasiven Therapieoptionen behandelt werden. Besteht eine Kontraktur und ist die hypertrophe Narbe auf Zugspannung, so ist Therapie der Wahl die chirurgische Exzision. Eine Kombination mit adjuvanten Möglichkeiten wie Silikongelen, Steroiden und Drucktherapie wird dabei empfohlen.

In den 1970er Jahren wurde die "*pressure garment therapy*" (PGT) bekannt und war lange Therapie der Wahl.

Diese vermuten, dass Druck die Kollagensynthese einschänken könnte. Eine weitere Hypothese ist, dass der Druck zur einer Einschränkung der Oxygenierung und Zufuhr von Nährstoffen im Gewebe führt, was eine verminderte Kollagensynthese zur Folge hat.⁴⁹

Der therapeutische Effekt von Silikongelen beruht auf mehreren Faktoren. Einerseits haben auch hier der Druck auf die Narbe sowie die verbesserte Hydratation einen Einfluss. Andererseits wird ein antifibrotischer Effekt vermutet, der zu einer verminderten Ausschüttung von Cytokinen wie TGF-β führt.

Das bisher am besten wirksame intraläsionale Kortikosteroid ist Triamcinolon (TMC). Es hat einen antiinflammatorischen Effekt, inhibiert die Fibroblastenproliferation und reduziert die Kollagensynthese. Außerdem konnten vorherige Arbeiten zeigen, dass TMC ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die Expression des wichtigen Wachstumsfaktors TGF- β hat. Die Kombination von Kortikosteroiden mit anderen Verfahren wie chirurgischer Entfernung oder auch Lasertherapie bietet eine vielversprechende Option. ^{29,50}

Bei Keloiden gestaltet sich die Therapie als weitaus schwieriger. Bei einer chirurgischen Entfernung kommt es meist schon nach kurzer Zeit, in 70-100 % der Fälle, zu einem Wiederauftreten der Keloide, meist sogar mit Ausdehnung der Läsion und Stimulation der Kollagensythese, sodass von einer alleinigen Exzision abgesehen werden sollte. ^{34,51} Daher ist Therapie der Wahl die alleinige Injektion mit Kortikosteroiden. Sollte diese erfolglos sein, kann eine Kombination mit 5-Fluoruracil (5-FU) abgewogen werden. 5-FU hemmt dabei die Bindung von DNA Strängen, was wiederum Wachstum und Proliferation stoppen kann. Danach würde man über eine Lasertherapie nachdenken. Sollte auch dies erfolglos sein, kann eine Kombination aus Exzision mit anderen Verfahren wie der Lasertherapie, Silikongelen, Injektionen mit Kortikosteroiden, Radiotherapie sowie anderer antimitotischer Medikamente erwogen werden.

Antimitotische Medikamente zielen hauptsächlich auf die Fibroblasten und deren Aktivierung und exzessive Kollagenproduktion im Narbengewebe ab. Sie sollen als intraläsionale Injektionen sowohl präventiv als auch zur Behandlung eingesetzt werden. Die momentan gängigen Medikamente sind Kortikosteroide, 5- Fluoruracil, Bleomycin, Mitomycin C und Retinsäure. Sie wirken sich inhibierend auf die Fibroblastenproliferation, Synthese von Cytokinen, insbesondere TGF-β, sowie Kollagenproduktion aus.^{29,52} Diese Therapiemöglichkeiten werden ebenfalls gerne mit einer Lasertherapie kombiniert.

Die Verwendung von Lasern begann mit der Einführung in den 1980er Jahren durch Apfelberg et al. und Castro und diente der Zerstörung des Narbengewebes. ^{47,52} Nachfolgende Studien zeigten jedoch keine guten Langzeitergebnisse und hohe Rezidivraten. ^{52,53} Die aktuell verwendeten *Pulse dye lasers* (PDL) erzielten Erfolge bezüglich Narbengewebe, Rötungen, Umfang der Narben und auch durch präventives Nutzen. ^{50,54} Dieser Laser nutzt thermische Energie, was zu einer Nekrose führt. Dies steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit dadurch verursachten mikrovaskulären Schäden, die die Kollagenproduktion schädigt und so die Narbenbildung reduziert. ⁵⁵

Der Erfolg maximiert sich noch einmal in Kombination mit anderen Therapieoptionen wie Kortikosteroiden ^{52,56}. Kuo *et al.* konnten in verschiedenen Studien zeigen, dass auch hier eine durch die Behandlung verringerte TGF- β Expression für eine verringerte Proliferation und Kollagenproduktion sorgt. ^{57–59}

Die Radiotherapie bzw. Brachytherapie sind ebenfalls eine vielversprechende adjuvante Therapieoption, denn das Wiederauftreten von Keloiden und hypertrophen Narben nach einer Kombination aus Exzision und Bestrahlung ist sehr gering. ³⁰

Man geht davon aus, dass Gene, die in die Zellproliferation involviert sind, *down*reguliert werden, während Apoptose-Gene überreguliert werden. Es scheint, dass es zu einer Hemmung der Fibroblastenproliferation sowie zu einem Zellzyklus Arrest kommt. ^{60,61}

Eine weitere Methode stellt die Kryotherapie dar. Dieses Verfahren beruht auf dem Einfrieren der Zellen mit flüssigem Stickstoff und verursacht so eine Zellschädigung und Nekrose des pathologischen Narbengewebes. ²⁹ Shepher und Dawber führten 1982 dieses Verfahren als Monotherapie ein, konnten jedoch keine langfristigen Erfolge erzielen.⁶² Die danach begonnenen repetitive Wiederholung der Behandlung sowie die Kombination mit Triamcinoloninjektionen lieferten jedoch die Grundlagen einer wirkungsvollen, Behandlungsmöglichkeit. ^{52,63}

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Therapie als schwierig erweist und bisher keine optimale Behandlung gefunden wurde. Eine Kombination aus den bisher bestehenden Therapiemöglichkeiten erzielt jedoch einen besseren Outcome als eine Monotherapie. ⁴⁸

1.6 Kohlenstoffdioxid

1.6.1 CO₂ in der medizinischen Anwendung

Der Beginn einer CO₂- basierten Therapie geht bereits auf 1932 zurück.

Die Verwendung von CO₂ in der Medizin hat sich seither auf verschiedenste Bereiche ausgeweitet, darunter die Behandlung von Hautproblemen wie Narben und Keloiden. ⁶⁴

Eine der häufigsten Anwendungen von CO₂ in der Hauttherapie ist die Verwendung von CO₂-Lasern zur Reduktion von Narben. CO₂-Laser arbeiten, indem sie hochenergetisches Licht abgeben, das Wasser in den Zellen verdampft und so kontrollierte Verletzungen in der Haut erzeugt. Hierbei konnten gute Ergebnisse erzielt werden, jedoch ist über den Wirkmechanismus bislang sehr wenig bekannt. ^{24,48,65,66}

Jedoch gewinnt zusätzlich die Carboxytherapie, welche auf intradermaler oder subkutaner Anwendung bzw. Injektion kontrollierter Dosen CO₂ basiert, immer mehr an Bedeutung. ^{64,67}

1.6.2 Effekte von CO₂ auf zelluläre Prozesse der Haut

Die Auswirkungen von CO₂ auf zelluläre Prozesse der Haut und die Myofibrogenese sind ein wichtiges Forschungsgebiet, das mit verschiedenen Aspekten der Wundheilung, der Hautregeneration und der Pathophysiologie von Hauterkrankungen verbunden ist.

Einige Studien haben zeigen können, dass CO₂ Auswirkungen auf die Kollagensynthese, Fibroblastenproliferation sowie Mikrozirkulation und Sauerstoffversorgung des Gewebes haben kann. ^{68–70} Zudem konnten andere Arbeiten einen Effekt von CO₂ auf die Myofibrogenese nachweisen, indem es sich auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten auswirkt und so die Narbenbildung modulieren und sogar verringern kann. ^{71–73} Andere Studieren konnten ebenfalls eine Wirkung von CO₂ auf das Mitochondrium bzw. den Citratzyklus nachweisen. ^{74,75} Es ist jedoch festzuhalten, dass all diese Effekte von CO₂ kontrovers diskutiert werden.

1.7 Effekte einer Hypoxie

Hypoxie bezeichnet einen Zustand der Minderversorgung mit Sauerstoff. Dies kann auf unterschiedliche Weise geschehen, zum einen durch eine verminderte Aufnahme durch die Lunge, einer unzureichenden Sauerstoffversorgung des Blutes oder aber auch, experimentell durchgeführt wie in unseren Versuchen, in hypoxischen Verhältnissen in einer Druckkammer.

Sauerstoff ist für das Überleben der meisten eukaryotischen Organismen essenziell und unabdingbar für zelluläre Prozesse, allen voran im Citratzyklus bzw. der ATP-Produktion, wie in Abschnitt 1.7. näher erläutert wird. Transkriptionsfaktoren spielen bei reduziertem Sauerstoffgehalt eine wichtige Rolle, auch genannt *hypoxia-inducible facotors* (HIFs).⁷⁶

Der Transkriptionsfaktor HIF besteht aus den Untereinheiten alpha und beta, wobei dessen Aktivität durch Hydroxylierung reguliert wird. HIF-1α ist dabei das kennzeichnende Protein, da es durch Hypoxie stabilisiert wird und nicht wie, während der Normoxie, durch eine Reihe molekularer Mechanismen abgebaut wird. Es kann in stabilisierter Form während der Hypoxie in den Nukleus transloziert werden und dort entsprechende Gene regulieren ⁷⁶, die die Angiogenese, die glykolytische Energieproduktion, die Zellproliferation und andere Prozesse kontrollieren.⁷⁷

In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass Hypoxie die Myofibroblasten Differenzierung herabsetzen kann, genaue Wirkmechanismen sind jedoch bisher nicht bekannt.^{64,78,79}

1.8 Citratzyklus

Der Citratzyklus, auch Tricarbonsäurezyklus genannt, ist die Hauptquelle der zellulären Energie. Er ist eine biochemische Reaktion, die eine Schlüsselrolle einnimmt in der Verstoffwechselung von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen. Erstmalig entdeckt und beschrieben wurde er 1937 von Sir Hans Adolf Krebs.⁸⁰

Die Reaktion findet in den Mitochondrien eukaryotischer Zellen des lebenden Organismus statt. Sie dient der oxidativen Verstoffwechselung von Acetyl-CoA, welches bei vielen katabolen Stoffwechselvorgängen gebildet wird. Der Zyklus dient dabei als Drehscheibe zwischen Substratabbau und Phosphorylierung, in welchem Citrat oxidiert und decarboxyliert wird.⁸¹ Die im Citratzyklus erzeugten Reduktionsäquivalente werden in der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen, wodurch das energiereiche ATP gewonnen wird.

Einzelne Reaktionen des Zyklus werden dabei durch verschiedene Enzyme katalysiert, wobei deren katalytische Aktivität unverzichtbar für einen reibungslosen Ablauf dieses Prozesses ist. ^{81–83}

Der Citratzyklus ist somit von essenzieller Bedeutung für den Energiestoffwechsel und -produktion der Zelle, die Verfügbarkeit von Vorläufermolekülen für die Biosynthese verschiedenster Stoffe sowie zur Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichtes.⁸³

Die Aktivität des Citratzyklus wird vornehmlich über die Konzentrationen an ADP, ATP, NAD+ und NADH reguliert. Dabei werden die einzelnen Enzyme durch das Vorhandensein der einzelnen Moleküle teilweise stimuliert oder gehemmt. ^{81,83} In Abbildung 3 ist der Zyklus schematisch abgebildet.



Abbildung 3: Reaktionsfolge des Citratzyklus Quelle: Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Springer, Berlin, Heidelberg, 2014)mit Genehmigung des Springer Verlages.

1.9 Zielsetzung

Die Dissertation zielt darauf ab, die noch unklaren molekularen Wirkmechanismen der CO₂-Therapie zu untersuchen, die trotz ihrer breiten medizinischen Anwendung noch nicht ausreichend erforscht sind. Übergeordnet soll das Ziel sein, die vorhandenen Lücken zu schließen, um zur Entwicklung effektiverer Ansätze zur Wundheilung beizutragen und eine vollständige rezidivfreie Regeneration von Hautgewebe zu erreichen.

Insbesondere sollen im in vitro-Modell folgende Fragen beantwortet werden:

- Beeinflussen hypoxische Bedingungen und CO₂-reiche Luft das Überleben und das Proliferationsverhalten von dermalen Fibroblasten und Myofibroblasten?
- Sind die beobachteten Effekte rein auf Hypoxie zurückzuführen oder gibt es spezifische Mechanismen von CO₂?
- Kann Stickstoff ebenfalls die Fibroblastendifferenzierung beeinflussen?
- Wird die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch Hypoxie verhindert?
- Kann eine CO₂-reiche Umgebung diese Differenzierung ebenfalls hemmen?
 Und wenn ja, wie?
- Spielt Sirtuin 3 eine Rolle und wenn ja, welche?
- Gibt es eine Veränderung der Fibroblastendifferenzierung durch CO₂ aufgrund möglicher Hemmung wichtiger Enzyme im Citratzyklus?
- Wie kann CO₂ in der Prophylaxe und Therapie von Fibroblasten-abhängigen Erkrankungen wie hypertrophen Narben und Keloiden noch spezifischer klinisch genutzt werden?

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
24-Well-Platte	24 well plate, cell culture treated, with lid, lid with condensation ring, sterile	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-Platte	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
Aluminiumständer zur kühlen Probenlagerung	Rotilabo-Alu.Rack 1.5	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Aqua ad iniectabilia	Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi France, Sèvres, FR
Autoklavier- Indikatorband	Comply™ Steam Indicator Tape, Class 1	3M Deutschland GmbH, Neuss, DE
Bechergläser	DURAN Becher niedrige Form und Ausguss	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, DE
Blotting- Membran	Nitrocellulose Blotting- Membran (Porengröße 0,2 µm)	VWR International, LLC., Radnor, US
Blotting- Papier	Blotting Filter Papers, 2.5 mm thickness, 7.5 cm x 8.4 cm	Invitrogen, Carlsbad, USA
Blotting- Papier	Blot Absorbent Filter Paper	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Desinfektionsmittel Wärme-Bad	Thermoklar	BIOMED Labordiagnostik GmbH, Oberschleissheim, DE

Einfrierröhrchen	Cryo.s™ 2 ml, Typ: 122	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Einweg-Wägeschalen	diamond weighing boats, white, antistatic	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Eiswanne zur kühlen Probenlagerung	neoLab Eisbad klein aus PS, innen 210 x 140 x 80 mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Entsorgungsbeutel	Sekuroka®- Entsorungsbeutel, PP, Folienstärke 100 µm, 700 x 1100 mm, 110 l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, 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
Fertiggel	Mini-Protean TGX Stain- Free-4-20 %	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Flächen- desinfektionsmittel	Incidin™ Rapid - Viruzid, sporizid gegen C. difficile, formaldehydfrei	Ecolab GmbH & Co. OHG, Düsseldorf, DE
Folie	Adhesive Film for Microplates	VWR International, LLC., Radnor, US
Folie	Microtiter Sealing Tape	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Fusselarme Papiertücher	KIMTECH SCIENCE* Präzisionstücher weiß/klein	Kimberly-Clark Global Sales Inc., Roswell, USA
Gas-Detektorröhrchen	MRCO2 (700 ~ 1300 mg/l)	GASTEC Corp., Ayase, JP
Gasflamme	Fuego SCS basic	WLD-Tec, Göttingen, DE
Glaspipette	Pasteurpipette, Natron-Kalk- Glas, Lang ausgezogene, feine Spitze, 225 mm	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
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
Mikroreationsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	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-Großverbraucher- spezialisten eG, Friedewald, DE
Petri-Schale	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Pipetten (0,5-10µl, 2-20µl, 10- 100µl, 20-200µl, 100- 1000µl)	Eppendorf research/research plus/reference	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipetten (0,5-10µl, 5-50µl, 20- 200µl)	Finnpipette	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Pipetten (2-20µl, 50-200µl, 200- 1000µl)	pipetman classic	Gilson S.A.S., Villiers-le- Bel, FR
Pipettenspitzen	10/20 μl XL Graduated Tip, 200 μl Bevelled Tip, 1000 μl Graduated Tip	STARLAB International GmbH, Hamburg, DE
Pipettenspitzen	5 ml, 10 ml, 25 ml Costar® Stripette® Serological Pipet	Corning Inc., Corning, US
Pipettierhilfe	Omega Pipettor	Argos Technologies Inc., Vernon Hills, USA
Präzisionswischtücher	Kimtech™ Science, Präzisionswischtücher, weiß	KIMBERLY-CLARK GmbH, Koblenz, DE
PVDF-Membran	PVDF Western Blotting Membrane 0,2 µm (30 cm x 3 m)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Safe-Lock TubesTM 1,5 ml	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Reaktionsgefäße 2 ml	Safe-Lock TubesTM 2 ml	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland

Skalpell	Feather® Disposable Scalpel	FEATHER Safety Razor Co, Ltd., Osaka, JP
Spritzflasche	Nalgene belüftete Unitary LDPE- Sicherheitsspritzflaschen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Sterilfilter	Millex®-GS, Sterile Filter Unit with MF-Millipore MCE Membrane, 0,22 µm	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Sterilisationsbeutel	Steriking® 1, 50 x 250 mm	Wipak Walsrode GmbH & Co. KG, Bomlitz, DE
Verschlussfolie	Parafilm® M All-Purpose Laboratory Film	Bemis Company Inc., Neenah, US
Zellkulturflasche	Zellkulturflasche 250 ml, 75 cm2, Poly-D-Lysin CELLCOAT®, Filter- Schraubverschluss	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturflasche	cell culture flasks, 650 ml, 175 cm2, PS, red filter screw cap, TC, clear, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellschaber	Cell Lifter, Polyethylene, sterile	Corning Inc., Corning, USA
Zellsieb	EASYstrainer™ 100 µm, steril, für 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zentrifugenröhrchen 15ml	15 ml tubes, sterile, graduation and writing area	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT
Zentrifungenröhrchen 50ml	50 ml tubes, sterile, graduation and writing area	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT

2.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung	Produzent
Absaugvorrichtung	LABOPORT® Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Abzug	Laborsystem mc6® - TA 1500 x 900 - 900	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, DE

Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, DE
Autoklav	Systec DX-90 Tischautoklav	Systec GmbH, Linden, DE
Bildgebungsgerät	ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Blotting Gerät	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Brutschrank (37 °C; 5 % CO ₂)	Heracell™ 150i CO₂- Inkubator (37 °C, 5 % CO₂)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Brutschrank (37 °C)	Heraeus B 6060	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
CO ₂ -Gerät	CARBOTHERA™ K104	Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, JP
Druckkammer	Haux Testcom 200/2 (Fabriknummer 200832)	HAUX LIFE SUPPORT GmbH, Karlsbad
Eismaschine	Scotsman AF 80 Ice Flaker	Scotsman Ice Systems, Ipswich, GB
Elektrophorese Kit	Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell, 4-gel, for 1.0 mm thick handcast gels	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Elektrophorese Spannungsquelle	PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Elektrophorese- Netzgerät	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Gefrierbehälter	Cryo 1 °C "Mr. Frosty" Freezing Container	Nalge Nunc International Corp., Rochester, US
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 -80 °C	HERAfreeze™ HFU T Serie -86 °C Ultratiefkühlschrank	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Gehörschutz	Peltor™ Optime™ I Kapselgehörschutz H510A	3M Deutschland GmbH, Neuss, DE
Heizblock	Fisherbrand™ Single Block Dry Bath FB15101	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Kontaminations- abfalltonne	WIVA™ medical waste container	Mauser Werke GmbH, Brühl, DE

Kühlschrank 4 °C	KUw 1740	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Kühlschrank 4 °C	NUNC-Kühlschrank mit Glastür	Nalge Nunc International Corp., Rochester, US
Kühlschrank 4 °C mit Glastür	QCR2304U14	Queue Systems Inc., Asheville, USA
Magnetrührgerät	620 Standard	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Mehrfachdispenser	Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Messzylinder	Borosilikatglas 3.3, Klasse B	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Mikroskop	Axio Vert.A1 - inverses Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Mikrotiterplatte	Microplate, 96 well, PS, F- Bottom, Clear	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
pH-Meter	HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments Inc., Woonsocket, USA
Photometer	multilabel plate reader Victor3	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
Photometer PC	Optiplex GX620	Dell Inc., Round Rock, USA
Photometer Software	WorkOut 2.0	DAZDAQ LTD., Brighton, UK
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Plattenlesegerät	Victor3	PerkinElmer Inc., Waltham, US
Proteintransfer- Gerät	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Rüttelplatte	Kleinschüttler KM-2	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, DE
Schlauch	PVC-Schlauch m. Gewebe 9 x 15 mm	welabo GmbH, Nettetal, DE
Sicherheitswerkbank	Herasafe™ KS 18	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Sicherheitswerkbank mit Abzug	TA 1500 x 900 - 900 (Laborsystem mc6)	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, DE

Sonifizierer	UP50H (Cycle 0,5; Amplitude 80 %) mit Sonotrode MS1	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, DE
Taumel- Rollenmischer	RM 5	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Ballrechten- Dottingen, DE
Taumel- Rollenmischer	RM 10 W	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Ballrechten- Dottingen, DE
Thermostat für Wasserbad	Thermomix BU	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DE
Vortexer	IKA MS3 basic (3000 U/min)	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, DE
Vortexer	L46 Power Mixer	Labinco BV, Breda, NL
Vortexmischer	Reax top - Standardmodell	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Waage (d=0,1mg)	ABJ 220-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Waage (d=10mg)	Adventurer Pro AV412	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Wärmeschrank 37 °C	kelvitron® t, Typ: B 6060	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Wasserbad	Aqualine AL 12 (25 °C bis 95 °C)	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, DE
Western Blot Imaging Instrument	ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Zählkammer	System: Neubauer, Kammertiefe: 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
Zentrifuge (groß)	Heraeus™ Megafuge™ 16R	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Zentrifuge (klein)	Heraeus™ Fresco™ Pico 17	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
2.3 Substanzen und Lösungen (Chemikalien und Reagenzien)

Tabelle 3: Substanzen und Lösu	ngen
--------------------------------	------

Substanz/ Lösung	Produktbezeichnung	Produzent	
Acrylamid (30 %)	30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid "Rotiphorese Gel 30"	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	
Albumin	Albumin Fraktion V, ≥98%, pulv., für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	
APS (10 %)	Ammonium persulfate, for molecular biology, for electrophoresis, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, US	
Aqua destillata	Demineralisiertes Wasser techn. 10 I	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, DE	
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz für die Elektrophorese, Farbstoff zur Laufmarkierung in der Gelelektrophorese. Indikator pH 3,0-4,6	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	
BSA	Albumin Fraktion V ≥ 98 %, pulv., für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	
CO ₂ -Gas	Kohlendioxid UN 1013	Linde AG, Geschäftsbereich Linde Gas, Pullach im Isartal, DE	
Dispase	Dispase® II (neutral protease, grade II); from Bacillus polymyxa; 0,9 U/mg Iyo.	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE	
Dispase Typ II	Dispase II (neutral protease, grade II); from Bacillus polymyxa, lyophilizate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE	
DMEM	gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: [+] 4,5 g/l D- Glucose, L-Glutamine; [-] Pyruvate	Life Technologies Ltd., Paisley, UK	

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
FCS	Sera Plus special processed FBS; 0.2 µm sterile filtered	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Glycerol	Glycerin ROTIPURAN ≥99,5 %, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Glycin	Glycin PUFFERAN ≥99 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
HEPES	HEPES solution, 1M, pH 7.0- 7.6, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Kollagenase Typ I	Collagenase Type I, CLS I, 355 U/mg, from Clostridium histolyticum (not sterile)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol, for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Methanol	Methanol Rotipuran ≥ 99,9 %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
NaCl	Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, modified w/o CaCl2 & MgCl2	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, US
Penicillin & Streptomycin Mischung	Penicillin-Streptomycin; 10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, sterile filtered, for cell culture	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Protein Assay Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
SDS	SDS ≥99,5%, Blotting-Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Stickstoff- Gas	Stickstoff 5.0	Linde AG, Geschäftsbereich Linde Gas, Pullach im Isartal, DE
TGF-β1	Recombinant Human TGF- β1 (HEK293 derived)	PeproTech Inc., Rocky Hill, US

Trypsin	Trypsin-EDTA 10X; sterile filtered	Biowest, Nuaillé, FR
Tween	Tween 20 for molecular biology, viscous liquid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

2.4 Medien und Puffer

Tabelle 4: Medien und Puffer

Medium/ Puffer	Zusammensetzung		
Blottingpuffer	40 50 auf 500	ml ml ml Aqua	25x Transferpuffer Methanol dest. auffüllen
Dispase-Lösung (gelöst in Aqua dest.)	0,1 5 2,5	% % ml	PBS Dispase Typ II Hepes <i>CellTiterBlue</i> ® Reagent
Einfrier-Medium	50 5	ml ml	FCS DMSO
Fibroblasten- Zellkultur- Medium	500 10 1 1	ml % % %	Dubleccos MEM (GibcoTM) FCS Penicillin / Streptomycin Hepes
Kollagenaselösung	0,001 0,005 0,1 0,12 0,05 0,2 1,5	M M M M % %	CaCl Glucose HEPES NaCl2 KCl Kollagenase Typ I BSA

Laemmli-Puffer (gelöst in Aqua dest.)	252	mM	Tris- HCI
gelagert bei 4 °C	40	%	Glycerol
	8	%	SDS
	0,01	%	Bromphenolblau
	(vor Gei zusetze	brauch 2 n)	20% β-Mercaptoethanol
Laufpuffer (gelöst in Aqua dest.)	25 192 0,1	mM mM %	Tris pH 8,3-8,8 Glycin SDS
RIPA- Puffer für Proteinlysate			
nach Abcam	50	mМ	Tris pH=8
(gelöst in Aqua dest.)	150	mМ	NaCl
	1	%	NP-40
	0,5	%	Na-deoxycholat
	0,1	%	SDS
	Vor Gebrauch werden dem Puffer Phopataseinhibitor und Proteinaseinhibitor zugesetzt		
TBS(/T)	7,7	mМ	Tris pH 7,5
	150	mМ	NaCl
	0,1	%	Tween (bei TBST)
TGF-β Medium	10	ml	Fibroblasten-Medium
	20	μl	TGF-β1 (1 μg/ml)
Transferpuffer (gelöst in Aqua dest.)	12 96	mM mM	Tris Base pH 8,0- 10,5 Glycin

2.5 Antikörper und Marker

Tabelle 5: Antikörper und Marker

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
HIF-1α- Antikörper	HIF-1α (D2U3T) Rabbit mAb #14179	Cell Signaling Technology Europe, B.V., Frankfurt, DE
Positivkontrolle HIF-1α	HeLa Hypoxic/ Normoxic Cell Lysate NBP2- 36452	Novus Biologicals Europe, United Kingdom
SIRT3- Antikörper	SirT3 (D22A3) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology Europe, B.V., Frankfurt, DE
Western-Marker	Roti®-Mark WESTERN Marker	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Western-Marker- Antikörper	Roti®-Mark WESTERN HRP- Konjugat, anti-WESTERN Marker Antikörper (Kaninchen)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Western-Substrat	Immobilon® Forte Western HRP-Substrate	Millipore Corporation, Billerica, US
Ziegen Anti-Kaninchen- Antikörper	Polyklonale Ziegen Anti- Kaninchen Immunoglobuline/ HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Ziegen Anti-Maus- Antikörper	Polyklonale Ziegen Anti- Maus Immunoglobuline/ HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
α-SMA-Antikörper	Anti-alpha smooth muscle Actin antibody [1A4]	Abcam PLC., Cambridge, UK

2.6 Kit Systeme

Tabelle 6: Kit Systeme

Produkt	Produktbezeichnung	Produzent
IDH Aktivitätsassay	Isocitrate Dehydrogenase Activity Assay Kit (MAK062)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
α-KG-DH Aktivitätsassay	α-Ketoglutarate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland

2.7 Software

Anwendung	Software
Bildanalyse-Software	Image Lab™ (Version 6.0.1)
Image J	Image J Version 2.0.0.
Erstellen mikroskopischer Bilder	Axiovision Rel. 4.8
Statistik Software	GraphPad Prism 8 (Version 8.4.1.)
Tabellenkalkulationssoftware	Microsoft Office Excel 2016 (Version 16.30)
Textverarbeitungsprogramm	Microsoft Office Word 2016 (Version 16.30)

2.8 Spender

Vitalität

Tabelle	8:	Spender	Vitalitätsversuche
rasono	0.	oponidor	vitalitatov or odorio

Probanden ID	Geschlecht	Alter	Passage
190904	W	64	3
180322	w	43	3
180412	w	60	3
190925	w	52	2
180426	w	58	3
190410	w	33	5
190410	w	33	4
180322	w	43	4
190904	w	64	4
180227	w	17	4
190925	w	52	3
181128	m	42	3

Immunfluoreszenz

Tabelle 9: Spender Immunfluoreszenz Versuche

Probanden ID	Geschlecht	Alter	Passage
180322	W	43	3
180412	w	60	3
190925	w	52	2
180426	w	58	3
190410	w	33	5

Western Blot

Tabelle 10: Spender Western Blot Versuche

Probanden ID	Geschlecht	Alter	Passage
190520	W	45	2
190925	w	52	3
190410	w	33	4
180322	w	43	4
190904	w	64	4
180227	w	17	4
190708	w	41	3
191009	w	63	4
191023	w	42	2
191105	w	30	3
181128	m	42	3
191212	m	30	2

Aktivitätsassay

Tabelle 11: Spender Aktivitätsassay Versuche

Probanden ID	Geschlecht	Alter	Passage
200108	W	56	2
191212	m	30	3
191008	w	42	5
191105	w	30	5
191009	w	63	5
191029	w	42	5

3 Methoden

3.1 Überblick

In der folgenden Abbildung sieht man als Überblick den gesamten Aufbau des Projektes in zeitlicher Abfolge. Auf die einzelnen Schritte wird in den folgenden Abschnitten detailliert eingegangen.



Abbildung 4: Übersicht Projektablauf Zeitliche Reihenfolge des Versuchsablaufes. Auf die einzelnen Schritte wird im Text genauer eingegangen

3.2 Zellkultur / Allgemeine Anmerkungen

Es wurden Fibroblasten aus Bauchhaut, Oberarmhaut oder Mamaplastiken isoliert. Die Patienten haben gemäß der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer 3634) ihr Einverständnis gegeben, dass wir ihre Hautspenden zu Versuchszwecken in unserem Labor verwenden dürfen. Dabei sind uns lediglich Alter und Geschlecht der jeweiligen Spenderin/ des jeweiligen Spenders bekannt.

Bei den in unseren Versuchen verwendeten Spendern handelt es sich um zwei männliche und 13 weibliche Zellpopulationen. Bei den männlichen Spendern liegt das Durchschnittsalter bei 57 Jahren, bei den weiblichen bei 43,8 Jahren.

Die Arbeiten mit den Zellen wurden stets unter einer Laborwerkbank durchgeführt, um einen sterilen Umgang mit den vitalen Zellen sicherzustellen. Außerdem wurden das Nährmedium sowie die zugegebenen Zusätze stets vor Behandlung mit den Zellen in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt, um den Zellen die bestmögliche Lebensgrundlage zu schaffen.

3.2.1 Isolierung der Fibroblasten aus Hautplastiken

Die Proben wurden für den Transport gekühlt und in einen sterilen Beutel oder Gefäß verpackt. Zuerst wurde das Fett von den Proben ab präpariert, die übrig gebliebene Haut in 5x5mm große Stücke geschnitten und diese in einem 50ml Behältnis mit 5-10ml Dispase II- Lösung versetzt. Das Ganze wurde über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert und hat zur Folge, dass sich zunächst die Epidermis von der Dermis löst. Dispase ist ein Enzym, welches, ohne die Zellmembran der Zellen anzugreifen, Kollagen I und Fibronektin spaltet, und wird daher gerne für die Isolierung verwendet. Am darauffolgenden Tag wurden die Gewebestücke bei 37 °C für 45 min unter ständigem Schütteln inkubiert und anschließend für 5min bei 1200rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Darauf folgte der zweite Schritt der Isolierung der Fibroblasten, das Lösen der Zell-Zell- Adhäsionen, indem 5-10ml Kollagenaselösung den Proben hinzugegeben wurde. Diese Lösung bestand aus 0,2 % Kollagenase und 1,5 % BSA in Kollagenasepuffer. Dieser Schritt erfolgte erneut bei 37 °C für 45min auf einem Schüttler. Nach den 45 min wurde der Inhalt des Gefäßes auf ein Sieb gegeben und mit Hilfe eines Glasstempels in eine Kulturschale gepresst. Um möglichst viele Zellen zu gewinnen, wurde dieser Vorgang 2-3mal durchgeführt. Um die Kollagenaselösung von den Zellen zu trennen, wurden die Zellen erneut 5 min bei 1200rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das dadurch erhaltene Zellpellet wurde mit Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturschale überführt. Die Fibroblasten wurden anschließend im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am dritten Tag der Isolierung wurden durch einen ersten Mediumwechsel Zellen und Gewebsbestandteile abgesaugt, die über Nacht nicht adhärieren konnten. Die Standardkultivierung der Zellen erfolgte in Dulbecco's modified eagle (DMEM) Medium mit 4,5g Glucose, 10 % fetal calf serum (FCS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin.

3.2.2 Subkultivierung der Fibroblasten

Zunächst wird das Nährmedium aus der Kulturschale oder Flasche abgesaugt und die adhärenten Zellen mit PBS gewaschen, um auch letzte Reste Medium zu entfernen. Nach Entfernung der PBS-Flüssigkeit wird dann, je nach Kulturgefäß, 5-15ml Trypsin/EDTA Lösung zu den Zellen hinzugegeben und für 5min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Sinn des Ganzen ist das Ablösen der Zellen des Gefäßbodens. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen per "shake off"-Verfahren (leichtes Klopfen gegen das Gefäß) vom Boden gelöst, was durch den Blick durch das Mikroskop kontrolliert wird und anschließend mit dem gleichen Anteil FCShaltigem Nährmedium versetzt, um die Reaktion zu stoppen. Da es vorkommen kann, dass sich nicht alle Zellen gleich gut lösen, kann man mit einem Zellschaber etwas nachhelfen und die Zellen vom Boden lösen. Die Zellsuspension konnte nach mehrmaligem Resuspendieren in ein Gefäß überführt und 5min lang bei 1200rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet mit 1ml Nährmedium resuspendiert. Danach wurde entweder, sofern dies für nachfolgende Versuche nötig war, mit einem Hämozytometer die vorhandene Zellzahl bestimmt oder, falls nicht nötig, die Zellsuspension zu gleichen Teilen in mehrere neue Kulturgefäße überführt und mit ausreichend Nährmedium versetzt.

3.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Fibroblasten

Um die Fibroblasten aufbewahren zu können, wurden die Zellen in Einfriermedium, bestehend aus FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), gelöst und kryokonserviert. DMSO soll der Kristallisation entgegenwirken, birgt aber auch einige Gefahren. Es wirkt über 0 °C zytotoxisch, weswegen schnell und auf Eis gearbeitet werden muss. Nach Lösen der Zellen mit Trypsin und Erzeugen eines Zellpellets, wurden 1x10⁶ Zellen in ein Kryoröhrchen gegeben und mit 1ml Einfriermedium resuspendiert. Um die Zellen möglichst schonend herunterzukühlen, werden sie zunächst für 24h bei -80 °C in Kryo- Einfriergeräte eingelagert. Diese enthalten 100 % Isopropanol und sorgen dafür, dass die Zellen pro Minute lediglich um 1 °C heruntergekühlt werden. Es ist möglich, die Zellen kurzfristig bei 80 °C aufzubewahren. Über einen längeren Zeitraum sollte dafür jedoch Stickstoff verwendet werden.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, mit Nährmedium resuspendiert und in ein Gefäß gegeben.

Dabei ist ebenfalls wieder Vorsicht und Eile geboten, da auch hier das DMSO toxisch wirken kann, wenn es Raumtemperatur erreicht. Anschließend wurde das Gefäß mit den Zellen 5min bei 1200rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet mit Medium resuspendiert und in ein Kulturgefäß ausgesät.

Anschließend erfolgt die Kultivierung in einem 37 °C warmen Brutschrank mit 5 % CO₂.

3.2.4 Ermittlung der Zellzahl

Für die anstehenden Experimente musste zuvor die Zellzahl ermittelt werden. Dafür wurde ein Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) verwendet, in welches 10µl einer Zellsuspension nach Subkultivierung sowie Trypanblau im Verhältnis 1:1 hineingegeben wurde. Die Kammer wurde vorher mit einem angefeuchteten Deckglas versehen, sodass die Zellsuspension beim Pipettieren in den Hohlraum zwischen Deckglas und Kammer gesogen wird. Der Farbstoff Trypanblau wird verwendet, um vitale von geschädigten Zellen zu unterscheiden. Lebende Zellen besitzen eine intakte Zellwand und Membran, sodass der Farbstoff nicht ins Innere gelangen kann, während hingegen Zellen mit geschädigter Membran den Farbstoff anreichern und unter dem Mikroskop blau erscheinen. Nach der Zugabe des Gemisches auf das Hämozytometer wurden unter dem Lichtmikroskop Zellen der einzelnen Quadrate ausgezählt. Die Zellzahl lässt sich dabei mit folgender Formel berechnen:

 $Zellzahl (pro ml) = \frac{n (Probe)}{4} * VF * 10^{4}$

- *n* Anzahl gezählter Zellen in allen 4 Quadraten
- VF Verdünnungsfaktor
- 10⁴ festgelegter Kammerfaktor

Nachdem die Zellzahl pro ml ermittelt wurde, kann daraus die Menge der Suspension berechnet werden, die man für den jeweiligen Versuch benötigt. Dies erfolgt anhand dieser Formel:

```
\frac{gewünschte\ Zellzahl}{Zellzahl\ pro\ ml} = benötigtes\ Volumen\ der\ Zellsuspension
```

3.3 Druckkammer Gas-Versuch

3.3.1 Aufbau und Eigenschaften der Druckkammer

Unsere Versuche wurden mit der Geräte-Testkammer "HAUX-Testcom 200/2, (Projektnummer 3054, Fabriknummer 200832), produziert von der Firma HAUX Life, durchgeführt.

Die Druckkammer erlaubt die Durchführung von Experimenten mit einem Überdruck von 2 bar bei gasgefüllter Kammer. Um zu verhindern, dass ein Druck über die Höchstanzahl erreicht wird, ist die HAUX-Kammer mit einem Sicherheitsventil ausgestattet, welches bei einem Druck über 2,2bar das Überschreiten des zulässigen Drucks verhindert. Zudem kann man den Druck von außen stets über ein Manometer, welches den aktuellen Kammerdruck anzeigt, mitverfolgen.

Die Versorgung der Kammer mit Gas wird über ein Einlassventil reguliert, welches mittels eines Schlauchs mit einem Druckminderer und einer Schnellkupplung an die entsprechende Gasflasche angeschlossen ist. Um den aufgebauten Druck abzubauen, muss ein Auslassventil betätigt werden. Ein Schutzmechanismus sorgt dafür, dass die Kammer nur mit einem Öffnungshebel geöffnet werden kann, welcher gleichzeitig mit einem Entlüftungsventil versehen ist; somit kann die Kammeröffnung nur bei Drucklosigkeit erfolgen.



Abbildung 5: Druckkammer HAUX Testcom 200/2 daneben sichtbar das Manometer zur Druckkontrolle

3.3.2 Versuchsdesign

Ziel war es, die Effekte des reinen CO₂ und Stickstoffs auf die Zellen zu untersuchen.

Um dies zu gewährleisten, wurden die behandelten Fibroblasten mit einer Kontrollgruppe von primären Fibroblasten verglichen. Diese Kontrollgruppe wurde dabei unter Raumluftbedingungen und bei Raumtemperatur unter einer sterilen Werkbank aufbewahrt. Nach Ablauf der Versuchszeiten wurde auch bei diesen Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt

Die zu behandelnden Zellen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen in der Überdruckkammer für jeweils 5, 15 oder 30 Minuten einer CO₂- oder Stickstoff (N₂) -Atmosphäre ausgesetzt. N₂ wurde verwendet, um einen CO₂ spezifischen Effekt zu überprüfen und einen Vergleich zu ermöglichen. Zusätzlich wurden zum Zwecke der Induktion der Myofibrogenese 50 % der Kulturen mit 2 ng/ml TGF- β 1 im Nährmedium inkubiert. Die Phasen während einer Druckkammerbehandlung sind dabei in drei sich anschließende Phasen zu unterteilen. Zunächst wird kontinuierlich ein Druck aufgebaut, dies geschieht in der Kompressionsphase. Danach, während der Behandlungszeit, wird der jeweilig präferierte Druck aufrechterhalten. Diese Phase wird als Isopressionsphase bezeichnet. Nach Ende der Behandlung wird während der 3. Phase, der Dekompressionsphase, der Druck in der Kammer langsam abgesenkt, bis man den Umgebungsdruck erreicht hat.

3.3.3 Ausplattieren der Zellen für die Versuche

3 Tage vor Beginn der Überdruckbehandlung wurden Fibroblasten wie zuvor bereits beschrieben geerntet und deren Zellzahl ermittelt. Anschließend wurde die benötigte Zellzahl in 24- oder 6-Well- Platten ausgesät.

Zur Überprüfung der Zellvitalität wurden die Fibroblasten auf 24-*well*-Platten mit 2x10⁴ Zellen pro Well ausgesät (Abbildung 6).



Abbildung 6: Versuchsschema CellTiterBlue Assay sowie Propidiumiodid& Hoechst. 24-Well- Platten ohne und mit TGF-β

Für die immunhistologischen Versuche, die Versuche für den Proteinnachweis mittels Westernblot, als auch für die Enzymaktivitätsassay, wurden auf 6-Well-Platten 2x10⁵ Zellen pro Well ausgesät. An Tag 4, vor Beginn der Gasexposition, wurden Fotos der Well angefertigt (Abbildung 7).

Bei jedem der Versuche wurden 7 Platten pro Spender verwendet. Eine Platte diente dabei als Kontrolle, 6 weitere Platten wurde in der Überdruckkammer für jeweils 5, 15 und 30 Minuten einer CO₂ oder Stickstoff- Atmosphäre (Abbildung 8) ausgesetzt.



Abbildung 7: Konfluenz der Fibroblasten an Versuchstag 4 vor Beginn der Druckkammer- Behandlung



Abbildung 8: Versuchsaufbau der Druckkammer Versuche

3.3.4 Versuchsdurchführung

Vor der Behandlung mit CO₂ und Stickstoff wurden die Zellen direkt aus dem Brutschrank bei 37 °C in die Druckkammer bei Raumtemperatur überführt. Dabei erfolgte ein langsamer Druckaufbau bis auf 2 bar, um Kompressionsschäden der Membranen zu vermeiden. Die Zellen wurden anschließend unter stetiger Druckkontrolle für jeweils 5, 15 und 30 Minuten mit dem jeweiligen Gas exponiert. So konnte eine konstantes Druckniveau über die gesamte Behandlungszeit gewährleistet werden. Nach Ende der jeweiligen Behandlungszeit erfolgte ein langsamer Druckabbau bis zum Erreichen des Umgebungsdruckes. Im Anschluss wurden die Zellen ohne Verzögerung in eine sterile Werkbank überführt, wo ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Anschließend wurden die Fibroblasten in den Brutschrank zurückgegeben.

Bei der Vitalitätskontrolle der Zellen erfolgte nach einmaliger Gasexposition bereits nach 24h eine Auswertung.

Der Hauptversuch bestand darin, die zu behandelnden Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen in der Überdruckkammer mit 2 bar für jeweils 5, 15

oder 30 Minuten einen CO2- oder Stickstoff (N₂) -Atmosphäre auszusetzen, dabei erfolgte die Auswertung am 4. Tag, 24h nach der 3. Gasexposition.



Abbildung 9: Versuchsablauf

3.4 Ernte der Proben

Am 4. Tag, 24h nach der letzten Gasexposition, wurden die Zellen für weitere Untersuchungen geerntet. Dabei wurden die Fibroblasten, wie zuvor beschrieben, gelöst, und anschließend in ein 1,5 Eppendorf Gefäß gegeben, um dann eingefroren zu werden.

3.5 Prinzip des CellTiterBlue-Assay

Um die Zell Viabilität der Fibroblasten nach Behandlung in der Überdruckkammer mit CO₂ und Stickstoff zu überprüfen, wurde ein *CellTiterBlue* Assay von Promega durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen auf mehrere 24- Well- Platten ausgesät, einen Tag später erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Hälfte der Zellen mit TGF-β in einer Konzentration von 2ng/ml behandelt wurden. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen jeweils 15 min mit CO₂ oder mit Stickstoff versetzt. Direkt danach wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei 50 % der Zellen mit TGF-β versetzt wurden. 24h später erfolgte der Versuch mit CTB. Der Farbstoff wird direkt dem Medium im Verhältnis 1:10 zugegeben. Wichtig ist dabei, dass die Zellen für genau eine Stunde und bei 37 °C mit CTB inkubiert werden, dabei darf der Brutschrank nicht geöffnet werden. Der Versuch beruht darauf, dass der Farbstoff Resazurin durch die Mitochondrien stoffwechselaktiver, vitaler Zellen in den Farbstoff Resorufin umgesetzt wird, ohne jedoch dabei die Atmungskette zu beeinflussen. Bei einer Wellenlänge von 590nm kann dies anschließend im Photometer fluorometrisch gemessen und auf die Anzahl vitaler Zellen geschlossen werden.

3.6 Prinzip der Hoechst- und Propidiumiodid-Färbung

Auch bei diesem Vitalitätstest wurden die Zellen zuvor mit CO₂ und Stickstoff exponiert und 24 Stunden später mit diesen Lösungen gefärbt.

Propidiumiodid ist ein Farbstoff, welcher lediglich in der Lage ist, die Zellmembranen toter und geschädigter Zellen zu durchbrechen, so kann er genutzt werden, um genau diese zu identifizieren. Die Exzitationswellenlänge liegt bei 535 nm und die Emissionswellenlänge bei 617 nm. Die geschädigten Zellen erscheinen dabei rot.

Anders verhält es sich mit Hoechst 33342. Dieses DNA- Fluorochrom wird zur Visualisierung des Zellkerns benutzt und färbt alle Zellen an, egal ob geschädigt oder vital.

Die Exzitationswellenlänge liegt bei 356nm, die Emissionswellenlänge bei 458nm, die Kerne erscheinen somit blau. Erzeugt man nun im Fluoreszenzmikroskop übereinander gelagerte Bilder dieser 2 Färbungen, kann man genau erkennen, ob es sich bei den rot angefärbten Gewebeteilen wirklich um geschädigte Zellen handelt.

Die untersuchten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, dann wurde eine Mischung aus Propidiumiodid in einer Konzentration von 50 µg/ml und Hoechst mit 10 µg/ml hinzugegeben und für 5min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation erfolgte ein erneuter Waschschritt mit PBS, danach konnte man die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop anschauen und Aufnahmen anfertigen.

3.7 Image J Zellzahl- Bestimmung

Bei der Hoechst- und Propidiumiodid- Färbung werden als Auswertung Fotos aufgenommen, durch welche man jedoch keine quantitativen Daten erhält. Um diese zu erhalten, konnte Image J 2.0.0. als Tool dienen. Mit dieser Software war es möglich, die Zellzahl anhand der Zellkerne auf den Bildern zu ermitteln und anschließend in Relation mit den rot angefärbten nekrotischen bzw. geschädigten Zellen zu setzen. Der grobe Ablauf ist in Abbildung 10 zu sehen.



Abbildung 10: Ablauf einer Zellzahlbestimmung mit der Software Image J 2.0.0.

3.8 Immunzytochemische Anfärbung (α-SMA)

Ein Teil der untersuchten Zellen wurde mit TGF- β behandelt, bei welchem es sich um einen Wachstumsfaktor handelt, der die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten induziert. Charakteristisch für Myofibroblasten ist dabei, dass sie das Protein α -SMA exprimieren. Daher bestand ein Teil der Arbeit aus der Detektion dieses Proteins zur Bestimmung des Anteils ausdifferenzierter Myofibroblasten und der Vergleich zwischen den unterschiedlich behandelten Zellen.

Zur immunzytochemischen Anfärbung wurden die Zellen beim Aussäen in 6-Well Platten auf kleine autoklavierte Glasplättchen in die einzelnen Wells gegeben, auf denen die Fibroblasten adhärieren konnten. Nach der regulären 4- tägigen Versuchsdurchführung wie zuvor bereits beschrieben, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd in PBS 15min lang fixiert und danach bei 4 °C in PBS aufbewahrt.

Am Tag 1 der Immunfärbung wurden die auf den Glasplättchen zuvor fixierten Zellen herausgeholt, mit einer Pinzette in eine befeuchtete Metallkammer gelegt und

mit PBS beträufelt. Um die Zellen zu permeabilisieren, damit der Primärantikörper später in die Zelle hineingelangen und an das Zielprotein binden kann, wurde in einem ersten Schritt 0,2 %iges Triton X100 in 10ml PBS für 10min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt ging es darum, die unspezifischen Bindungen zu blocken, daher inkubierte man die Zellen mit 3 % BSA für eine Stunde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein monoklonaler, murinärer Primärantikörper auf die Zellen gegeben, welcher gegen das Antigen Actin Alpha 2 gerichtet ist. Dieser wurde zuvor in einer 1:250 Verdünnung in PBSTA (PBS, Trypsin, Albumin) angesetzt. Die Zellen wurden anschließend bei 4 °C über Nacht stehen gelassen.

Am 2.Tag der Färbung wurde zunächst dreimal mit PBS gewaschen und danach der biotinylierte Mouse-IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBSTA für 45min hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte wieder ein dreimaliges Waschen mit PBS und danach die Zugabe von Streptavidin-Alexa-488 in 1:100 in PBS für 30min, was zur Verstärkung dient. Dabei war darauf zu achten, dass dies in Dunkelheit geschah.

Durch den zusätzlichen Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet, konnte die Substratumsetzung und somit die Färbung erfolgen. Der Sekundärantikörper besitzt die Fähigkeit, über Biotin mit Streptavidin zu interagieren, da diese eine hohe Affinität zueinander besitzen, sodass die Zellen anschließend im Fluoreszenzmikroskop gut sichtbar werden.

Während dessen wurden die Objektträger vorbereitet, um dann die erneut gewaschenen Zellen in einer Lösung aus DAPI und fluoreszierendem Eindeck-Medium einzubetten. DAPI ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, mit dem die DNA in den Zellkernen angefärbt werden kann. Das Fluoreszenz *Mounting* Medium von DAKO dient dabei zur Fixierung der Zellen und verbessert deren Visualisierung.

Dafür wurde eine Mischung von 1:1000 angefertigt und jeweils 2 Tropfen der Lösung auf einen Objektträger pipettiert und anschließend das Glasplättchen mit den Zellen umgedreht auf diesen gelegt. Im Anschluss konnte man die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten und Aufnahmen anfertigen. Die Durchführung erfolgte jeweils streng gemäß Herstellerprotokoll.

44

3.9 Sonifizierung

Um die Proben einer Western Blot Analyse unterziehen zu können, wurden sie zuvor sonifiziert. Das Sonifizieren der Proben dient dazu, die Zellwände aufzuschneiden und so zugänglich zu machen. Die Ultraschalländerungen, die dabei erzeugt werden, erzeugen selbst wiederum Druckänderungen, die zum Zerreißen der Membranen und Zellwände führen, sodass ganz ohne den Einsatz von Enzymen die Zellen aufgeschlossen und die Proteine frei werden.

Die eingefrorenen Proben werden dafür auf Eis gelegt und kurz angetaut, sie sollten aber kalt bleiben, da während des Sonifizierungs-Vorgangs Wärme erzeugt wird.

Im Anschluss wird das einzelne Pellet an die Ultraschallsonde gehalten und mit 10 Ultraschallstößen sonifiziert. Danach erfolgt die Einbettung auf Eis. Die Einstellung des Gerätes liegt dabei bei einem Zyklus von 0,5 und einer Amplitude von 80 %.

3.10 Proteinbestimmung

Um die Proben und deren *Western Blot* Ergebnisse normieren zu können, ist eine Proteinbestimmung vor Durchführung des *Western Blots* obligat.

Dabei wurde das *Bicinchoninic acid*-Assay Kit (BCA) der Firma Thermo Fisher verwendet. Die Proteinbestimmung erfolgt in 2 Reaktionsschritten, den ersten Schritt stellt die Reduktion von Cu²⁺⁻ in Cu⁺ - Ionen dar, welche dann im Anschluss mit der Biocinsäure einen violetten Farbkomplex bilden, der mit dem Photometer bei 562 nm gemessen werden kann.

Zuerst wurden 4µl der zuvor sonifizierten Proben, die sich weiterhin im RIPA-Puffer befanden, in einem Verhältnis von 1:6 mit 20µl PBS verdünnt. Im nächsten Schritt wurde der bereits vorhandene Proteinstandard (siehe Tabelle 12) sowie die verdünnten Proben eine Mikrotiterplatte (96-Well- Platte) pipettiert. Das Ganze wird in Doppelbestimmung durchgeführt. In einem weiteren Schritt wurde allen Proben mit einer Multipipette jeweils 200µl Working Reagenz hinzugegeben, welche sich aus zwei Komponenten zusammensetzt: Reagenz A, Biocinsäure, und Reagenz B, 4 %iges Kupfersulfat. Die Working Reagenz wurde vorher in einem Verhältnis von 1:50 angemischt. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und nach Ablauf der Zeit bei 562 nm im Photometer gemessen. Mit den Werten des Standards wurde eine Standardkurve mathematisch erzeugt, anhand derer man die Proteinkonzentration der eigenen Proben bestimmen kann.

Tabelle 12: Pipettierschema des BSA- Standards

Konzentration (µg/µl)	Probe	BSA-Standard (µI)	PBS (µl)
2	А	300	0
1,5	В	375	125
1	С	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	н	100 von G	400
0 = Blank	I	0	400

3.11 Western Blot- Analyse

Das Prinzip des Western Blots beruht auf einem quantitativen Nachweis von Proteinen mittels verschiedener Antikörper sowie der Transfer von Proteinen auf eine Membran im engeren Sinn.

3.11.1 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese

In einem ersten Schritt wurden die Proben anhand des Protein Assay und der gewünschten Proteinmenge mit Wasser sowie Laemmlipuffer verdünnt, um überall die gleiche Menge an Protein zu haben. Die mit Wasser versetzten Proben wurden dafür mit einer Mischung aus Laemmlipuffer und Mercaptoethanol (80:20) versetzt, zentrifugiert und dann für 5 Minuten auf einem 95 °C heißen Wärmeblock aufgekocht. Das Ganze dient dazu, die Proteine zu denaturieren. Mercaptoethanol sorgt außerdem dafür, dass die Disulfidbrücken aufgebrochen werden.

Währenddessen wurden die fertigen 4-15 %igen Gele der Marke Bio Rad in die Kammer eingespannt, diese mit 10fach-verdünntem Laufpuffer aufgefüllt und die Kämme aus den Gelen gezogen, um den ROTI Western Marker sowie die eigenen Proben in die jeweiligen Taschen aufladen zu können. Der ROTI Western Marker dient dabei als Proteinleiter, um später die eigenen Proteine genau lokalisieren und deren Größe bestimmen zu können.

Daraufhin wurde die Kammer verschlossen und Strom mit einer Spannung von 80V angelegt. Das negativ geladene SDS (Natriumdodecylsulfat), was im Gel enthalten ist, kann an die Polypeptidbindungen der Proteine binden und deren Ladung überdecken, sodass alle Proteine gleichmäßig proportional zu ihrer Molmasse negativ geladen sind.

Nach circa 10-15 Minuten wurde die Spannung erhöht auf 120-150V, bis die Proben aus dem Gel hinausgelaufen sind, was durch die blaue Farbe des Laemmli Puffers sichtbar gemacht wird. Ab dann wurde der Gel-Lauf beendet und das Gel aus der Kammer herausgeholt. Um später auf das Gesamtprotein normieren zu können, wurde zunächst ein Bild des Gels gemacht, um es anschließend in Transferpuffer zu geben und für das eigentliche Blotting vorzubereiten.

3.11.2 Blotting

Das eigentliche Blotting erfolgt danach, indem die Proteine des Gels auf eine sogenannte Trägermembran, in diesem Fall PVDF Membran, übertragen werden. Die Proteine wandern in einer sogenannten Turbo Blotter Apparatur aufgrund einer zuvor angelegten Spannung aus dem Gel heraus und auf die darunter liegende Membran.

Zunächst wurden dafür das Gel, die PVDF-Membran sowie die für das Blotting benötigten Filterpapiere kurz in Transferpuffer getaucht und anschließend in einer Turbo *Blotter* Kassette folgendermaßen gestapelt:



Abbildung 11: Semi dry Blotting Aufbau der Schichten

Das Blotting erfolgte danach für 20min bei einer Spannung von 25V und einer Stromstärke von 1A.

3.11.3 Blocken und Antikörpermarkierung

Nach dem Übertragen der Proteine auf die Membran müssen zuerst unspezifische Bindungen blockiert werden, an die der Antikörper sonst binden könnte. Dazu wurde die Membran in ein 50ml Gefäß überführt, mit 10ml 5 %iger-BSA Mischung versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Trommelrollenmischer inkubiert.

Nach Ablauf der Stunde wurde die BSA-Mischung verworfen und der Primärantikörper in seiner jeweiligen vom Hersteller empfohlenen Konzentration in 3ml BSA hinzugegeben. Die Membran wurde danach über Nacht bei 4°C erneut inkubiert und gerollt.

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran zunächst 3-mal für 5 Minuten mit 10ml TBS- T gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper versetzt. Der Sekundärantikörper, welcher HRP (Meerrettichperoxidase) enthält, wurde dabei 1:1000 in 4ml TBS-T verdünnt und nach Zugabe erneut für eine Stunde auf einem Trommelrollenmischer, dieses Mal im Dunkeln, inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran erneut 3mal für 5 Minuten in TBS-T gewaschen.

3.11.4 Detektion

Die Detektion der Proteine erfolgte nach dem erneuten Waschen mit dem Chemilumineszenz-Detektionssystems *ChemiDoc* der Marke *Biorad*.

Dafür wurden zunächst auf die Membran Entwicklerlösung gegeben, die Luminol enthält. Das HRP, was im Sekundärantikörper enthalten war, reagiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid als Peroxidase mit dem Luminol, oxidiert dieses Substrat also und sorgt so für die Chemilumineszenz Reaktion und die dadurch mögliche Visualisierung der Proteine beim Fotografieren mit UV-Licht.

3.11.5 Auswertung

Die zuvor angefertigten Bilder der Membran wurden mittels Densitometrie mit dem Programm *ImageLab* 6.0.1. von *Biorad* ausgewertet. Mit dem angefertigten Bild des Gels, was vor dem Blotting erstellt wurde, ist es möglich, die Volumina der erhaltenen Banden auf das Gesamtprotein zu normieren. Anschließend wurden die erhaltenen Proteinmengen in Relation zur Kontrolle gesetzt.

3.12 Enzym-Aktivität Assay

Nach Aussetzung der Zellen mit CO₂ und Stickstoff wurden diese im Anschluss daran sofort geerntet, um sie in einem Aktivitätsassay zu untersuchen.

Hierfür wurden zwei verschiedene Enzyme des Citratzyklus untersucht, die Isocitratdehydrogenase II und die alpha- Ketoglutarat Dehydrogenase.

Bei der Durchführung des Assay wurde sich dabei streng an die vom Hersteller Sigma mitgegebene Anleitung gehalten.

Für die Durchführung der Assay wurden die 1x10⁶ Zellen nach dem Ernten mit den im Kid mitgelieferten Puffern versetzt, zentrifugiert und der Überstand für das Assay verwendet. Zeitgleich wurde auch ein NADH-Standard für die kolorimetrische Detektion erstellt.

Anschließend wurde ein zuvor angesetzter Reaktions-Mix den Proben und dem Standard hinzugegeben, die 96-Well Platte inkubiert und bei 37° mit dem Photometer gemessen, bis der Wert der aktivsten Probe den Wert des höchsten Standards übertraf. Mit diesen Ergebnissen konnte man eine Standardkurve für NADH erstellen, anhand dessen die Veränderung der NADH-Absorption in den eigenen Proben kalkulieren und danach mit folgender Formel die Enzymaktivität für diese berechnen.

 $IDH \ Aktivit \ddot{a}t = \frac{B \ x \ Probenverd \ddot{u}nnungsfaktor}{(Reaktionszeit) \ x \ V}$

 $KGDH \ Aktivit \ddot{a}t = \frac{B}{(Reaktionszeit) \ x \ V}$

BNADH Menge (in nmol), die zwischen Tinitial und Tfinal generiert wurdeReaktionszeitTfinal – T initial (in Minuten)VProben Volumen in ml/ Well

Anschließend wurde die berechnete Enzymaktivität noch auf *milliunits*/mL/mg berechnet, indem für die einzelnen Proben eine Proteinbestimmung/mg per Nanodrop Messung erfolgte.

3.13 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms *GraphPad* Prism Version 8.3.1. für Mac, *GraphPad Software*, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com. Bei allen Ergebnissen wurde zunächst ein Test auf Normalverteilung, der Shapiro Wilk Test, durchgeführt, um anhand dessen Ergebnis die weiteren möglichen Testverfahren im Hinblick auf Signifikanz ermitteln zu können.

Bei der darauffolgenden weiteren statistischen Auswertung wurden die parametrischen Ergebnisse durch ein *One-way* ANOVA ausgewertet. Für die nichtparametrischen Ergebnisse wurde ebenfalls ein *One-way* ANOVA durchgeführt, dabei jedoch die Friedman Variante gewählt, die für nichtparametrische Werte vorgesehen ist.

Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Proben wurde dann als signifikant angesehen, wenn der p-Wert bei < 0,05 lag (ns= nicht signifikant, *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001).

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Überdruckbehandlung auf die Zellvitalität

Im ersten Schritt wurden zunächst die Auswirkungen der CO₂-Behandlung untersucht, da diese möglicherweise die Messergebnisse beeinflussen könnten.

4.1.1 CellTiterBlue

Die Zellen wurden einmalig mit CO₂ oder Stickstoff exponiert, jeweils für 5, 15 oder 30 Minuten. Die Zell Viabilität wurde dabei 24h nach Gasexposition mittels *CellTiterBlue*® Assay (CTB) bestimmt, um eine mögliche toxische Wirkung auf die Zellen ausschließen und die höchstmögliche Dauer der Gasexposition detektieren zu können. Wie in Abbildung 12 zu sehen, konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich eines toxischen Effektes zwischen Kontrolle und den mit Gas exponierten Zellen festgestellt werden (n=3). Dies gilt sowohl für die einfachen Fibroblasten als auch für die mit TGF- β versetzten Fibroblasten.



Abbildung 12: Zellvitalität

Einfluss von einmaliger Gasexposition unterschiedlicher Art und Länge. Quantifizierung erfolgte mittels Photometrie. Es kann kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden

4.1.2 PJ/ Hoechst

Im Anschluss an die *CellTiterBlue* Versuche erfolgte die Vitalitätskontrolle der Zellen mittels PJ/ Hoechst Färbung. Hoechst, hier in der Abbildung 13 in blau zu sehen, dient dazu, die Kernmorphologie darzustellen und kleine fragmentierte, apoptotische Zellkerne ausfindig zu machen.

Propidiumiodid besitzt die Fahrigkeit, die perforierte Zellmembran von bereits abgestorbenen Zellen, aber nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen zu können. Es dient also als Nachweis für nekrotische Zellen, hier in rot zusehen.

Es konnte auch hierbei weder bei der Form noch bei der Größe der Zellkerne ein Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen (Abbildung 13) und den mit Gas exponierten Zellen (Abbildungen 15 und 15) festgestellt werden.



Abbildung 13: Fluoreszenzfärbung der Fibroblasten (Kontrolle) mit Propidiumiodid und Hoechst 33342. Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung.



Abbildung 14: Fluoreszenzfärbung der Fibroblasten nach CO₂ Exposition für 5, 15 und 30min, mit Propidiumiodid und Hoechst 33342 angefärbt



Abbildung 15: Fluoreszenzfärbung der Fibroblasten mit N₂ **Exposition** für 5, 15 und 30min, mit Propidiumiodid und Hoechst 33342 angefärbt

Mithilfe des Programmes ImageJ, wie zuvor ausführlich beschrieben, konnten wir die bildlichen Ergebnisse quantifizieren, hier in Abbildung 16 zu sehen. Auch hierbei zeigte sich, dass die Behandlung mit den verschiedenen Gasen keinen Effekt auf die Vitalität der Fibroblasten besitzt.



Abbildung 16: Einfluss einmaliger auf die Zellvitalität der Fibroblasten bei unterschiedlicher Dauer und Art der Gasexposition Die Werte beziehen sich auf die unbehandelte, auf 1 normierte Kontrolle. N=5. Es können keine Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden.

4.2 Einfluss der Überdruckbehandlung auf die Myofibrogense

4.2.1 Immunfärbung α-SMA

Auf den Bildern in den Abbildungen 17 und 18 ist eine immunhistochemische Färbung mit dem Protein α -SMA zu erkennen, welches hier als grün imponiert. α -SMA ist vorwiegend in Myofibroblasten zu finden. Fibroblasten ohne α -SMA Nachweis erscheinen rein blau.

In der Kontrolle erkennt man eine Zunahme der α -SMA Proteine nach Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- β .

Bei allen mit CO₂ exponierten Zellen, unabhängig von der Zeitdauer der Gasexposition, ist eine Abnahme des α-SMA zu erkennen.

Ein Effekt, der bei Anwendung von N_2 nicht zu beobachten ist. Hier ist sowohl bei der Kontrolle als auch bei den mit Stickstoff behandelten Zellen keine Abnahme des

 α -SMA zu sehen, unabhängig von der Dauer der Gasexposition und des Vorhandenseins von TGF- β . Es scheint sich vielmehr um eine Zunahme des α -SMA Gehalts zu handeln.



Abbildung 17: Immunfärbung des Proteins α-SMA nach Exposition mit CO² nach 3-tägiger Differenzierung und Expositionsdauer von 5,15 und 30 min (n=1)



Abbildung 18: Immunfärbung des Proteins α-SMA nach Exposition mit N₂ nach 3-tägiger Differenzierung und Expositionsdauer von 5,15 und 30 min (n=1)

4.2.2 Westernblot

α-SMA

Parallel zu der immunhistochemischen Färbung wurde ebenfalls eine Westernblot Analyse des Proteins α -SMA durchgeführt. Dabei wurden unter anderem die gleichen Spender wie bei der immunhistochemischen Färbung verwendet sowie acht weitere. Durch die Western Blot Analyse konnte, wie auch schon in der Immunhistochemie, bestätigt werden, dass ein deutlicher Unterschied in der Expression des α -SMA Proteins zwischen der mit TGF- β versetzten Kontrolle und den mit CO₂ exponierten Zellen vorliegt. Dies kann man visuell in dem Westernblot in Abbildung 19 erkennen.



Abbildung 19: Westernblot Bild der α-SMA Proteinexpression nach 3- tägiger Differenzierung und Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff für 5,15 oder 30min jeweils ohne und mit TGF-β (n=9),

In Abbildung 20 dargestellt ist der Unterschied der einzelnen Gruppen zur Kontrolle ohne TGF-β. Hier fällt auf, dass bei den mit CO₂ behandelten Fibroblasten erst ab einer Gasexposition von 30 Minuten eine signifikante Reduktion des Proteins vorliegt. Die anderen Zellreihen zeigen keinen Unterschied. Lediglich die mit Stickstoff exponierten Zellen weisen nach 15 Minuten einen Anstieg des Proteins auf.



Abbildung 20: Westernblot der a-SMA Proteinexpression vs. Kontrolle nach 3- tägiger Differenzierung und Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff für 5,15 oder 30min jeweils ohne und mit TGF- β (n=9) (ns= nicht signifikant, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001)

In Abbildung 21 ist der Vergleich zwischen Kontrollgruppe mit TGF- β zum Rest dargestellt, weiterhin ist die Proteinexpression jedoch auf die Kontrolle ohne TGF- β Zugabe normiert. Durch die Western Blot-Analyse ist bei den Zellen eine deutliche dosisabhängige Hemmung der α -SMA Expression durch die Gasexposition mit CO₂ festzustellen. Je länger die Zellen mit CO₂ exponiert waren, desto stärker fällt die Hemmung der α -SMA Expression aus. Bei den Zellen, die für 30 Minuten mit CO₂ exponiert wurden, liegt die Hemmung nahezu bei 60 %.

Im Gegensatz dazu ist mit Blick auf die mit Stickstoff exponierten Fibroblasten kein signifikanter Unterschied der α-SMA Expression zu erkennen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Gasexposition mit CO₂ zu einer signifikanten Reduktion bei TGF-β behandelten Zellen führt, mit Stickstoff jedoch kein Unterschied festgestellt werden kann.



Abbildung 21: Westernblot a-SMA Proteinexpression vs. Kontrolle + TGF- β nach 3- tägiger Differenzierung und Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff für 5,15 oder 30min jeweils ohne und mit TGF- β (n=9), (ns= nicht signifikant, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001)

Sirtuin 3

Es wurde ebenfalls die Proteinexpression des SIRT3 bestimmt. Hierbei zeigte sich eine Erhöhung der SIRT3 Expression im Vergleich zur Kontrolle bei den Zellen, die CO₂ ausgesetzt waren, aber kein TGF- β Behandlung erhalten hatten. Hier konnte eine Steigerung der Expression auf das 1,5- fache beobachtet werden. Keine signifikanten Unterschiede konnten festgestellt werden bei den mit Stickstoff behandelten Zellen sowie bei den Zellen, die zuvor mit TGF- β vorbehandelt wurden. Zu sehen ist dies sowohl visuell in Abbildung 22 sowie graphisch auch in Abbildung 23 und 24.



Abbildung 22: Westernblot Bild der Sirtuin 3 Proteinexpression nach 3- tägiger Differenzierung und Gasexposition unterschiedlicher Art und Länge (n=9), jeweils ohne und mit TGF-β



Abbildung 23: Westernblot Sirtuin 3 Proteinexpression vs. Kontrolle nach 3- tägiger Differenzierung und Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff für 5,15 oder 30min jeweils ohne und mit TGF- β (n=9), (ns= nicht signifikant, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001)



Abbildung 24: Westernblot Sirtuin 3 Proteinexpression vs. Kontrolle + TGF- β nach 3- tägiger Differenzierung und Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff für 5,15 oder 30min jeweils ohne und mit TGF- β (n=9), (ns= nicht signifikant, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001)
HIF-1α

Als dritter Nachweis erfolgte die Proteinbestimmung des Hypoxie-induzierenden Faktors HIF-1 α . Hierbei ist, wie in Abbildung 25-27 zu sehen ist, eine Zunahme der Expression bei den CO₂ -behandelten Zellen zu verzeichnen. Signifikante Zunahmen können hier sowohl im Vergleich zur einfachen Kontrolle als auch im Vergleich zu mit TGF- β versetzten Kontroll-Fibroblasten beobachtet werden. Bei den unbehandelten Fibroblasten ohne TGF- β ist eine signifikante Zunahme in allen drei CO₂ Gruppen zu sehen. Bei den mit TGF- β behandelten Zellen zeichnet sich eine dosisabhängige Zu- und Abnahme der Expression ab. Mit zunehmender Länge der Gasexposition steigt auch die Expression an (15 Minuten), sinkt dann jedoch wieder etwas ab.

Die mit Stickstoff behandelten Zellen weisen im Vergleich zur Kontrolle, sowohl unbehandelt als auch mit TGF- β versetzt, keinen signifikanten Anstieg der HIF-1 α Expression auf.



Abbildung 25: Westernblot HIF-1a Proteinexpression

nach 3- tägiger Differenzierung und Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff für 5,15 oder 30min jeweils ohne und mit TGF- β (n=8),

HIF1α -TGF 2.5 relative Proteinexpression +TGF 2ng/ml 2.0 Unterschied zur KO 1.5 ns KO 0.5 0.0 CO² Smin CO230min CO2 15min N² Smin Nº Smin N²Omin 40 **Dauer & Art der Gasexposition** n=8

Abbildung 26: Westernblot HIF-1a Proteinexpression vs. Kontrolle nach 3- tägiger Differenzierung und Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff für 5,15 oder 30min jeweils ohne und mit TGF- β (n=8), (ns= nicht signifikant, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001)



Abbildung 27: Westernblot HIF-1α Proteinexpression vs. Kontrolle + TGF-βnach 3- tägiger Differenzierung und Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff für 5,15 oder 30min jeweils ohne und mit TGF-β (n=8),

4.3 Einfluss der Überdruckbehandlung auf den Citratzyklus

Im Anschluss an die Westernblot Analyse führten wir Enzym Aktivitätsassay für Enzyme des Citratzyklus durch, da es Hinweise darauf gibt, dass CO₂ einen Einfluss auf deren Aktivität und somit auf den Zellzyklus haben könnte.

Es wurde sowohl ein Aktivitätsassay für die α -KG Dehydrogenase (α -KG-DH) als auch für die Isocitrat Dehydrogenase 2 (IDH2) durchgeführt.



Abbildung 28: Citratzyklus und dessen Enzyme

4.3.1 α-Ketoglutarat-Dehydrogenase

Bei dem hier durchgeführten Aktivitätsassay ist eine Reduktion der Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase bei den mit CO₂ behandelten Zellen im Gegensatz zur Kontrolle zu beobachten. Hierbei spielt die Gabe von TGF- β keine Rolle. Es handelt sich jedoch um n=1, sodass von keinen signifikanten Ergebnissen gesprochen werden kann.



Abbildung 29: α-KG-DH-Aktivität in milliunits/ml, Kontrolle vs. 10 minütiger CO₂-Behandlung, ohne und mit TGF-β



Abbildung 30: α-KG-DH- Aktivitätsverlauf über 70 min in milliunits/ml, Kontrolle vs. 10 minütiger CO₂-Behandlung, ohne und mit TGF-β

4.3.2 Isocitrat Dehydrogenase II

In Abbildung 31 ist die IDH- Aktivität der Fibroblasten nach Durchführung des Aktivitätsassay zu erkennen. Dieses wurde direkt im Anschluss an die 10- minütige Gasexposition durchgeführt. Wir konnten nachweisen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den CO₂ behandelten Zellen besteht. Hierbei sieht man eine deutliche Reduktion der Aktivität. Diese zeigt sich sowohl

zum Auswertungszeitpunk, der von dem Aktivitätsassay Kit vorgeschrieben ist, als auch im gesamten Verlauf der Aktivität.



Abbildung 31: IDH-Aktivität in milliunits/mL nach 3- tägiger Differenzierung und Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff für 10 min jeweils ohne und mit TGF- β (n=4) (ns= nicht signifikant, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001)





IDH Aktivitätsverlauf

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die spezifischen Auswirkungen von CO_2 auf molekularer Ebene auf die durch TGF- β induzierte Myofibrogenese *in vitro* zu untersuchen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse liefern wichtige Einblicke in die Rolle dieses Gases bei der Regulation zellulärer Mechanismen und im Hinblick auf fibrotische Erkrankungen.

In folgendem Abschnitt werden die Hauptbefunde zusammengefasst und in den Kontext der bestehenden Literatur gestellt. Darüber hinaus werden potenzielle klinische Implikationen diskutiert und weitere Forschungsrichtungen vorgeschlagen, die sich aus den Erkenntnissen dieser Arbeit ergeben.

Abbildung 32 soll dabei einen ersten Überblick über unsere Ergebnisse geben.

Wir konnten nachweisen, dass CO_2 eine spezifische, hemmende Wirkung auf die Myofibrogenese (durch den verminderten α -SMA-Nachweis besitzt. Zu den genauen Wirkmechanismen auf molekularer Ebene konnten wir erste Hypothesen aufstellen, die den Glukosemetabolismus betreffen. Gleichzeitig konnten wir rein hypoxische Effekte durch den direkten Vergleich mit Stickstoff ausschließen. Zudem konnten wir einen Anstieg des HIF-1 α und des mitochondrialen SIRT3 durch CO_2 verzeichnen. Im Folgenden werden diese Ergebnisse noch einmal einzeln diskutiert.



Abbildung 33: vereinfachte Darstellung der Ergebnisse Hemmende Wirkung von CO₂ auf α-SMA Expression, IDH und α-KG-DH Aktivität sowie erhöhte Expression von HIF-1α sowie SIRT3

5.1 Die Rolle von CO₂ auf die Myofibrogenese

5.1.1 Allgemein

Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist ein komplexer Prozess, der durch verschiedene Faktoren wie mechanische Belastung, Wachstumsfaktoren und biochemische Signale gesteuert wird. CO₂ kann diesen Prozess potenziell durch verschiedene Mechanismen beeinflussen:

- pH- Regulierung: CO₂ kann den pH-Wert der extrazellulären Umgebung durch die Bildung von Kohlensäure (H2CO₃) beeinflussen, wenn es mit Wasser reagiert. Es führt dabei zur Ansäuerung des Gewebes. Änderungen des pH-Werts können die Aktivität verschiedener Enzyme und Signalwege modulieren, die an der Fibroblastendifferenzierung beteiligt sind. ^{84,85}
- HIF Signalweg: Erhöhte CO₂ -Konzentrationen können zu Gewebehypoxie führen, die den HIF Signalweg aktiviert. Gleichzeitig könnte CO₂ selbst für eine erhöhte Expression von HIF-1α sorgen. HIF-1α ist ein Faktor, der Einfluss auf Gene hat, die mit der Fibroblastendifferenzierung in Verbindung stehen.⁷⁷
- Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS): Erhöhte CO₂-Werte können Auswirkungen auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen haben. Es ist bekannt, dass ROS verschiedene zelluläre Prozesse regulieren, darunter Differenzierung, Proliferation und Apoptose. ROS können Signalwege aktivieren, die an der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beteiligt sind. ⁸⁶
- Andere Einflüsse wie die Matrix Versteifung und Auslösen von Entzündungsreaktionen werden ebenfalls diskutiert
- Beeinflussung des Zytokin TGF-β: TGF-β spielt eine entscheidende Rolle im Prozess der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, wie von Vaughan et al. im Jahr 2000 gezeigt wurde. Während der pathologischen Wundheilung, wie in keloidalem Gewebe, kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht in der TGF-β-Expression mit erhöhter Expression des Zytokins und der Rezeptoren. ^{34,43} Dies lässt sich durch den Nachweis des Myofibroblastenmarkerproteins α-SMA quantifizieren.

Der erste Punkt, auf den wir uns fokussierten, war zunächst der Nachweis eines spezifischen Effektes von CO₂. Anschließend wurden die Auswirkungen von CO₂ auf TGF- β , die Expression von HIF-1 α und SIRT3 sowie die Effekte auf den Zellstoffwechsel in das Zentrum unserer Untersuchungen gestellt.

5.1.2 Spezifische Wirkung

Unsere Versuchsreihe hat unsere Erwartungen bestätigt, dass CO_2 einen spezifischen Effekt auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten hat. Wir behandelten die Zellen sowohl mit CO_2 als auch mit Stickstoff unter hypoxischen Bedingungen und konnten feststellen, dass die Hemmung der Myofibrogenese nur bei den zuvor mit TGF- β versetzten und anschließend mit CO_2 inkubierten Zellen auftrat. Dieser Befund belegt eindeutig den einzigartigen Einfluss von CO_2 auf den Prozess der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten.

5.1.3 Zelluläre Effekte

Studien zum Thema pathologischer Wundheilung haben sich bisher hauptsächlich mit den Auswirkungen von CO₂ auf zelluläre Prozesse wie Gewebeperfusion oder Kollagensynthese befasst, ohne jedoch die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu untersuchen, die zu diesen Veränderungen führen. Im Folgenden gehen wir daher zunächst auf diese festgestellten zellulären Prozesse ein:

Diverse Untersuchungen konnten nachweisen, dass CO₂ geeignet ist, um Keloidgewebe abzutragen. Gleichzeitig verursacht es eine Kollagenschrumpfung, - ab und -umbau. CO₂ sorgt dabei durch die Aktivierung von Metalloproteasen dafür, dass die fehlerhafte Kollagenmatrix abgebaut und neues, physiologisches Kollagen synthetisiert wird.⁶⁴

Die Studie von Stolecka-Warzecha et al. beschäftigte sich mit dem Einfluss von Carboxytherapie auf die Narbenreduktion. Sie nutzen CO₂, welches intradermal oder subcutan appliziert wird. Sie gehen davon aus, dass intradermale Injektionen von CO₂ zu einer kleinen inflammatorischen Reaktion führt, deren Folge periphere Vasodilatation, Stimulation von Mikrozirkulation und vermehrte Durchblutung des Gewebes darstellen, was letztendlich zu einer gesteigerten Oxygenierung und Metabolisierung führt. Auch die durch CO₂ hervorgerufene Hypoxie wird dabei als positiver Stimulus für Neovaskularisation angesehen.⁶⁴

Die Forschung von Daniela D'Arcangelo et al. deutet darauf hin, dass eine Azidifizierung des Gewebes infolge erhöhter CO₂ -Konzentration die Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen behindert, und gleichzeitig diese Zellen vor einer Apoptose schützt. ⁸⁷ Dies würde einen Anhaltspunkt geben, wieso wir keine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle in unseren Zellvitalitätsversuchen finden konnten. Zudem gibt dies auch einen Hinweis darauf, dass durch CO₂ die Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten eingeschränkt wird, was einen gewünschten Effekt in der pathologischen Wundheilung darstellt.

Um diese zellulären Ereignisse erklären zu können, beschäftigten wir uns im Anschuss daher mit molekularen Wirkmechanismen.

5.1.4 Antifibrotische Effekte

Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln sowie in diversen Experimenten und Arbeiten bestätigt wurde, nimmt TGF- β eine entscheidende Schlüsselrolle in der Myofibrogenese ein. ^{42,88,89} Diese Schlüsselrolle macht TGF- β zu einem interessanten und wichtigen Ziel für gezielte Therapien.

Unsere Experimente zeigten, dass CO_2 ausschließlich Wirkung auf Fibroblasten hatte, die mit TGF- β behandelt wurden. Die Proteinexpression von α -SMA in der Versuchsreihe mit TGF- β versetzten Fibroblasten war dabei signifikant reduziert bei den Zellen, die zuvor mit CO₂ behandelt wurden. Im Vergleich dazu konnte keine Reduktion in der Kontrolle und in den mit Stickstoff behandelten Zellen nachgewiesen werden.

Es ist erwähnenswert, dass die Expression von α -SMA in Abhängigkeit von der Dauer der CO₂ -Exposition abnahm. Dies deutet darauf hin, dass höchstwahrscheinlich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen CO₂ und TGF- β besteht.

Daraus kann man rückschließen, dass CO_2 zu einer dosisabhängigen Inhibition der Proliferation und einer dosisabhängigen Differenzierungshemmung den Fibroblasten zu Myofibroblasten führt. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass CO_2 einen spezifischen Einfluss auf den TGF- β Signalweg haben könnte und so den Prozess der Myofibrogenese verlangsamt, aber nicht vollständig hemmt. Von Interesse wäre es nun in Folgearbeiten, den molekularen Mechanismus im TGF- β Signalweg und auch die Rezeptoren der CO_2 behandelten, mit TGF- β versetzten Fibroblasten zu untersuchen. Die Suche nach vergleichbaren Arbeiten, die sich mit dem direkten Effekt von CO₂ auf die Myofibrogenese beschäftigen, gestaltete sich als schwierig. Denn obwohl CO₂ eine etablierte Therapiemethode darstellt, erfolgt dies scheinbar kaum evidenzbasiert.

Eine Studie von Takano et al., die sich ebenfalls mit den Auswirkungen von CO_2 auf den TGF- β Signalweg beschäftigte, kommt dabei zu einem gegenteiligen Ergebnis wie wir. Sie stellten in ihren Versuchen fest, dass CO_2 über eine Ansäuerung des pH-Wertes eine *Up*-Regulation von TGF- β verursacht. Der Versuchsaufbau unterscheidet sich jedoch stark von unserem, da in diesem Fall eine CO_2 Formula verwendet wurde und kein reines Gas in einer Überdruckkammer. Zudem wurden die Zellen auch nicht mit TGF- β versetzt und so eine Myofibrogenese induziert, sondern lediglich die Expression des TGF- Signalweges untersucht.⁹⁰

Eine andere Studie, auf die wir stießen, behandelt das Thema der Krebsassoziierten Fibroblasten. Auch in diesen ist die Zellproliferation vergleichbar pathologisch gesteigert. Die Untersuchungen fokussierten sich dabei ebenfalls auf eine CO₂-Applikation und dessen Effekte, unter anderem gemessen an der Expression von TGF- β und α -SMA. Es wurde dabei, im Gegensatz zu uns, an Mäusen ein CO₂ Hydrogel aufgetragen, welches 20min einwirken konnte. Doch unabhängig vom Versuchsaufbau und -ablauf konnten auch Tadoko et al. eine signifikante Hemmung der Expression α -SMA sowie TGF- β vermerken, welche sie immunhistochemisch untersuchten.⁹¹

Diese widersprüchlichen Ergebnisse bedürfen einer weiteren Untersuchung. Da jedoch bei unseren Versuchen spezifisch die mit TGF- β versetzten Zellen eine verminderte Expression aufwiesen, liegt hier eine Beziehung zwischen CO₂ und TGF- β nahe.

Es gilt, dies weiterzuverfolgen, denn durch die Blockade oder Modulation des TGFβ-Signalwegs könnte die Myofibrogenese reduziert oder sogar verhindert werden. Mögliche spezifische Ansätze wären dabei die Verwendung von Rezeptor Inhibitoren oder Antikörpern, um so die pathologischen Prozesse zu unterbrechen oder zu verlangsamen.

Es ist jedoch wichtig, nicht zu vergessen, dass die Modulation des TGF-β Signalwegs auch auf andere physiologische Prozesse Auswirkungen haben kann, da der Signalweg an vielen verschiedenen Funktionen beteiligt ist. Um das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen zu minimieren, sollte daher der Fokus darauf liegen, eine zielgerichtete Therapie zu finden.

5.1.5 HIF-1α

Wie CO₂ sich auf die Zellen auswirkt, ist ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Einer der möglichen Wirkungsweisen stellt dabei die Wirkung von CO₂ auf HIF-1 α dar. Denn HIF-1 α , welches normalerweise durch Hypoxie stabilisiert wird, konnte in unseren mit CO₂ behandelten Zellen vermehrt nachgewiesen werden.

Da der Kohlenstoffdioxid-Versuch unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt wurde, bestand die Vermutung, dass HIF-1 α allein dadurch Hypoxie stabilisiert werden könnte, da Hypoxie der eigentliche Mechanismus ist, der zu einer Stabilisierung führt. Jedoch konnte keine erhöhte Expression von HIF-1 α bei den unter Hypoxie mit Stickstoff behandelten Zellen verzeichnet werden, was darauf hindeutet, dass kein rein Hypoxie bedingter Anstieg vorliegt. Dabei war ein Anstieg von HIF-1 α unabhängig von der Zugabe von TGF- β zu verzeichnen. Was ebenso auffällig ist, ist, dass die Expression von HIF-1 α mit zunehmender CO₂ Expositionsdauer ansteigt, bei den mit Stickstoff behandelten Zellen Zellen jedoch nicht. Hier wäre es von Interesse, in weiteren Versuchen anzuschauen, ob wirklich eine Beziehung zwischen CO₂ und HIF-1 α besteht. Arbeiten mit vergleichbaren Versuchsansätzen zu dem Thema konnten nicht gefunden werden.

Jedoch stießen wir bei der Literaturrecherche auf eine Studie, welche sich mit der Wirkung von Hypoxie auf die Myofibrogenese beschäftigt. Moderassi et al. konnten dabei zeigen, dass sich hypoxische Zustände inhibitorisch auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten auswirken können, selbst dann, wenn hohe Konzentrationen von TGF- β vorhanden sind. Genau wie wir, orientierten sie sich dabei am gemessenen α -SMA, dabei sowohl an der Kontraktilität als auch an der Expression. Gleichzeitig konnten sie ein erhöhtes Level an HIF-1 α sowie eine dadurch bedingte mögliche Down-Regulation des TGF- β nachweisen.⁹²

Hervorgehoben werden muss hier, dass, anders als unsere Ergebnisse nahelegen, sich deren Befunde auf rein durch Hypoxie erhöhtes HIF-1 α beziehen. Zudem ergaben sich bei uns lediglich Hinweise auf eine Wirkung von CO₂ auf HIF-1 α , aber nicht auf TGF- β und die Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Jedoch ist es eine interessante Hypothese, dass HIF-1 α einen negativen Effekt auf TGF- β haben könnte.

Im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau mit einer reinen Hypoxie für 5,15 und 30 Minuten, ließen Moderassi et al. die Zellen in 2-prozentigem O₂ Medium wachsen, die hypoxischen Zustände dauerten also länger an.

Auch Leinhos et al. konnten nachweisen, dass Hypoxie die Myofibroblastendifferenzierung unterdrücken kann. Es ergaben sich sogar erste Hinweise darauf, dass Hypoxie Myofibroblasten wieder in primäre Fibroblasten umkehren kann.⁷⁸ Dies wäre ein durchaus interessante und vielversprechende Richtung.

Diese von uns und auch von weiteren festgestellten Effekten sind jedoch kontrovers zu diskutieren, da andere Studien ergaben, dass Hypoxie und damit einhergehend HIF-1α stimulierende Faktoren für Fibrose und Myofibroblasten Aktivität darstellen. Die Resultate dieser Studien wurden 2023 in einem Review von Qiu et al. zusammengefasst.⁷⁹

Die dort aufgeführten Studien vertreten nach ihren Untersuchungen die Ansicht, dass Keloide, welche eine erhöhte Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese und dadurch bedingten erhöhten Sauerstoffverbrauch aufweisen, ein hypoxisches *Microenvironment* verursachen. Dies führt zu einer Überakkumulation von HIF-1α, was wiederum weitere fibrotische Wege aktivieren soll. Es gibt dabei Studien, die nachweisen konnten, dass Keloide eine hohe HIF-1α Expression aufweisen und dieses die Kollagensynthese fördert. ^{93,94} Auch die Studie von Jusman et al. stellte die Theorie auf, dass HIF-1α die Fibroblasten Proliferation in Keloiden reguliert. ⁹⁵

Gleichzeitig konnten Lei et al. in ihrer Studie nachweisen, dass HIF-1 α die Fibrose ebenfalls durch einen Einfluss auf den TGF- β Signalweg beeinflussen kann. ⁹⁶ Die Ergebnisse der Studien erscheinen logisch und plausibel, stehen jedoch teilweise im Gegensatz zu unseren bisherigen Annahmen. Die kontroversen Ergebnisse erfordern daher weitere Untersuchungen, da sie von höchster klinischer Relevanz sind und das HIF-System in den Fokus potenzieller Ziele für die Entwicklung neuer Therapien rücken.

5.1.6 Sirtuin 3

Sirtuin 3, eine Deacetylase, welche in den Mitochondrien lokalisiert ist und eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen einnimmt, war Gegenstand unserer Untersuchungen. Vorarbeiten lieferten Rückschluss darauf, dass CO₂ einen Effekt auf genau diese Deacetylase haben könnte. In unserer Studie konnten wir einen

signifikanten Anstieg der SIRT3 Konzentration bei zuvor mit CO₂ behandelten Fibroblasten erkennen. Gleichzeitig ließ sich jedoch feststellen, dass bei Zellen, die mit TGF- β behandelt wurden, kein Anstieg von SIRT3 zu beobachten war. Diese beiden Ergebnisse legen nahe, dass die Überexpression von SIRT3 im Zusammenhang mit einer antimyofibrotischen Differenzierung zusammenhängt, vermutlich auch getriggert durch die Behandlung mit CO₂. Gleichzeitig bestätigt die Unterexpression in Anwesenheit von TGF- β jedoch auch die Vermutung, dass dieses einen negativen Einfluss auf SIRT3 besitzt. Diese Beziehung konnten bereits auch andere Arbeiten nachweisen.⁹⁷

In unserer Studie haben wir beobachtet, wie auch schon andere Studien zuvor zeigen konnten, dass die Behandlung der Fibroblasten mit TGF- β zu einer Reduktion von SIRT3 führt. ²⁸ Die *Down*regulation des SIRT3 Gens könnte einer der Mechanismen sein, wie TGF- β die Myofibroblasten Transformation bewältigt, allerdings ist noch wenig bekannt über die genauen Mechanismen. Vorherige Studien spekulierten, dass durch TGF- β induzierter mitochondrialer DNA-Schaden zu reduzierten ATP-Leveln sowie veränderten NADPH/ND *Ratio* führen könnte. Dies könnte eine Pseudohypoxie erzeugen und so über einen Anstieg von HIF-1 α zu einem Anstieg fibrotischer Umbauprozesse führen.²⁶ Dies steht im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen aus anderen Teilen unserer Studie, in welcher der Einfluss von CO₂ auf HIF-1 α untersucht wurde.

Den umgekehrten Effekt konnten jedoch bereits auch mehrere Studien nachweisen. Eine Überexpression von SIRT3, führte zu einer Reversion der TGF-β Effekte wie ROS-Produktion und die Induktion von Myofibroblasten Differenzierung.^{26–28,98}

Diese Ergebnisse decken sich mit unseren. Wir konnten gesteigerte SIRT3 Level nach CO₂ Expression nachweisen, welche auf eine positive Korrelation hindeuten, dies zeigten auch schon vorherige Studien. ⁹⁷

Die Ergebnisse dieser Studien lassen den Verdacht aufkommen, dass während einer pathologischen Wundheilung, die durch eine Überproduktion von Myofibroblasten und Kollagen, aber vor allem auch ein überproportionales Vorkommen von TGF-β gekennzeichnet ist, eine *Down*regulation von SIRT3 auftritt. Diese *Down*regulation könnte dazu führen, dass die erfolgreiche Wundheilung erschwert wird. Gleichzeitig würde dies für unsere Ergebnisse jedoch bedeuten, dass durch die Überexpression von SIRT3, getriggert durch CO₂, TGF-β und alle dadurch hervorgerufenen Effekte gehemmt werden. Diese Hypothese stellt einen weiteren Schritt dar, um das Verständnis der Wirkung von CO₂ auf molekularer Ebene zu vertiefen und bedarf einer eingehenden Untersuchung.

Ein zusätzlicher Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen könnte zudem die Isocitrat Dehydrogenase II (IDH2) des Citratzyklus geben. Studien konnten zeigen, dass die IDH durch SIRT3 beeinflusst und reguliert wird. ²⁷ Dieser Zusammenhang wurde in unserer Studie nicht untersucht, jedoch klingt dies nach einem durchaus vielversprechenden Ansatz. Vor allem im Hinblick darauf, dass auch wir uns in unserer Studie umfassend mit dem Citratzyklus und den dort vorkommenden Enzymen beschäftigt haben.

5.1.7 Citratzyklus

Nachdem wir in unserer Studie zunächst beweisen konnten, dass es sich bei den Wirkungen von CO₂ auf die Differenzierung von Fibroblasten um spezifische Effekte handelt und der rein hypoxische Effekt ausgeschlossen werden konnte, war unser Ziel, möglichst genauere Informationen über die molekulare Wirkungsweise zu erhalten.

In den Vorversuchen konnten wir nachweisen, dass die von uns untersuchten und behandelten Fibroblasten durch die Druckkammerversuche weder geschädigt wurden, noch in Apoptose gingen. Trotzdem kam es unter CO₂ Behandlung zu einer geringeren Bildung von Myofibroblasten, wie wir durch die α-SMA Immunhistologie und den Westernblot nachweisen konnten. Dies führte zu der Frage, auf welche Weise die Proliferation der Fibroblasten gehemmt werden könnte. Daher rückte der Citratzyklus in den Fokus unserer Untersuchungen.

Denn wenn der Citratzyklus langsamer abläuft, kann dies Auswirkungen auf die Zellphysiologie haben, einschließlich der Proliferation von Fibroblasten, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Keloiden und hypertrophen Narben haben.

 Energiemangel: Der Citratzyklus ist ein wesentlicher Teil des zellulären Energiestoffwechsels, da er mitverantwortlich für die ATP- Produktion und andere energiereiche Moleküle ist. Ein langsamerer Citratzyklus könnte zu einem Energiemangel in der Zelle führen, was die Fähigkeit der Fibroblasten zur ungehemmten Proliferation beeinträchtigen könnte.

- 2. Reduzierte Biosynthese: Der Citratzyklus liefert Vorläufermoleküle für biosynthetische Reaktionen, wie zum Beispiel der Synthese von Fettsäuren, Aminosäuren und Nukleotiden. Ein langsamerer Citratzyklus könnte die Verfügbarkeit dieser Vorläufermoleküle verringern, was wiederum die Fähigkeit der Fibroblasten beeinträchtigen könnte, neue Zellbestandteile zu synthetisieren, die für ihre Proliferation erforderlich sind.
- Reduziertes Redoxpotential: Während des Citratzyklus werden NADH und FADH2 regeneriert, diese sind für das zelluläre Redoxgleichgewicht unabdingbar. Ein langsamerer Citratzyklus könnte zu einem reduzierten Redoxpotential führen, was oxidative Stressreaktionen auslösen und die Zellproliferation hemmen könnte.

Eine von Xie et al. veröffentliche Studie ⁹⁹ untersuchte erstmals den Zusammenhang des Glukosemetabolismus und der gesteigerten Myofibrogenese. Genauso wie in unserem Versuch versetzten sie dafür Fibroblasten mit 2 ng/ml TGF- β . Sie fanden heraus, dass in der Myofibrogenese von Patienten mit Lungenfibrose ein *Uptake* an Enzymen des Citratzyklus zu messen ist. Zudem konnten sie im weiteren Verlauf bestätigen, dass eine Hemmung des Glukosemetabolismus in Fibroblasten ein effektiver Schritt sein kann, um pulmonale Fibrose zu behandeln. Diese Überlegungen und Ergebnisse decken sich mit unseren.

Zum einen ist dies eine Bestätigung für uns, dass der Glukosemetabolismus und dessen Enzyme einen wichtigen Ansatzpunkt darstellt, um Fibroblasten und deren Differenzierung zu hemmen. Auch andere Arbeiten konnten bereits die hemmende Wirkung von CO₂ auf das Zellwachstum nachweisen. ^{75,100,101}

Zum anderen lieferten Vorarbeiten erste Hinweise, dass genau das bei uns im Fokus stehende CO₂ möglicherweise die Enzyme des Citratzyklus beeinflussen, ja sogar hemmen kann. Daher entschieden wir uns, die α-KG-DH sowie die IDH2 genauer zu untersuchen. Ähnlich wie Xie et al. führten auch wir Enzym-Aktivitätsassay durch. Diese ergaben, dass CO₂ durchaus eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der Enzyme haben könnte, vor allem auf die IDH2- Aktivität. Dies würde bedeuten, dass, wie eben beschrieben, die Aktivität des Zyklus herabgesetzt würde und so der unkontrollierten Produktion entgegenwirken könnte. Wir fokussierten uns vor allem auf die IDH2, da hier mehr Daten zu einer möglichen Hemmung vorlagen. Leider konnten wir aufgrund zeitlicher Engpässe keine

ausreichende Fallzahl mehr generieren. Doch diese erfreulichen ersten Ergebnisse sollten Anhalt sein, diese weiterzuverfolgen.

Eine von Vohwinkel et al. durchgeführte Studie beschäftigte sich ebenfalls mit möglicher mitochondrialer Dysfunktion, die durch erhöhte CO_2 Level hervorgerufen werden kann. Im Gegensatz zu unserer Vermutung jedoch, dass CO_2 die α -KG-DH hemmen könnte, stellen sie hervor, dass dieses Enzym einen möglich protektiven und reparierenden Effekt auf den Zyklus und Malfunktionen haben könnte. Die IDH2 betreffend decken sich jedoch unsere Ergebnisse. Sie konnten ebenfalls nachweisen, dass CO_2 die IDH2 herunterreguliert und so die mitochondriale Funktion und Zellproliferation beeinträchtigt ⁷⁵. Zudem stellten sie fest, dass durch gesteigerte CO_2 Partialdrücke die Zellverdopplungszeit der behandelten Fibroblastenkulturen abnahm. Die Auswirkungen von CO_2 auf die Zellen konnten Vohwinkel und al. erst nach 3 Tagen verzeichnen, wir hingegen schon nach 10 Minuten.

Die Frage, die man sich an diesem Punkt stellen muss, ist die, ob das gesamte Mitochondrium durch CO₂ zerstört wird und ob die Fibroblasten nachhaltigen Schaden nehmen. Die Ergebnisse unserer Voruntersuchungen zeigten jedoch, dass keine Schädigung oder erhöhte Apoptoserate der Fibroblasten durch die Gas-Behandlung festgestellt werden konnten. Dies legt nahe, dass durch unsere kurzen Versuchszeiten von 5 bis 30 Minuten nur eine Verlangsamung der Enzyme und Down-Regulation metabolischer Prozesse und Zellproliferation, jedoch keine Schädigung verursacht wurde. Die mögliche Erklärung dahinter wäre, dass die Abnahme der Aktivität und der Glykolyse darauf beruht, unter den durch CO₂ verursachten metabolisch ungünstigen Bedingungen ATP einzusparen. Dies ist jedoch nur eine Theorie und erfordert weitere Untersuchungen.

Eine zusätzlich spannende Theorie wurde durch die Ergebnisse von Yu et al. aufgebracht, die die Regulation von IDH2 durch SIRT3 beschrieben haben. ²⁷ Dies lässt verschiedene Optionen offen:

- 1. CO₂ selbst wirkt hemmend auf die IDH2
- 2. CO_2 und das durch CO_2 überregulierte SIRT3 hemmen zusammen die IDH2
- 3. Nur das durch CO₂ überregulierte SIRT3 hemmt die IDH2

Hier wäre es interessant, in Folgearbeiten genauer auf dieses mögliche Zusammenspiel einzugehen, um den Wirkmechanismus zu verstehen.

5.1.8 Vergleich zur Radiotherapie/ Brachytherapie

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, stellt die Radio- bzw. Brachytherapie ebenfalls eine Therapieform der Keloid- und hypertrophen Narben-Behandlung dar. Der Wirkmechanismus beruht dabei auf Hemmung der Fibroblastenproliferation und des Zellzyklus. ⁶¹

Auch wenn es keine ausreichende Datenlage dazu gibt, ob und inwiefern eine Bestrahlung von Keloidnarben oder der umgebenden, gesunden Haut, eine sekundäre Tumorerkrankung verursachen kann, ist dies dennoch eine nicht zu vernachlässigende Frage. Studien zu diesem Thema konnten bei Patienten mit aufgetretener Karzinogenese nicht belegen, ob es einen Zusammenhang gibt oder nicht. Wichtig ist auch, dass bei dieser Form der Behandlung auf die richtige Dosis und auf die Protektion umliegender Gewebe geachtet wird. ^{61,102,103} Das Ergebnis und die Folgen der Therapie sind also stark Anwender-abhängig.

Sollte sich in weiterführenden Arbeiten und Studieren zeigen, dass die CO₂ Behandlung ähnlich wie die Radiotherapie auf Ebene des Zellzyklus wirkt und die Proliferation hemmt, wäre zu diskutieren, ob dieses Verfahren möglicherweise sogar protektiver im Hinblick auf eine mögliche Sekundär- Karzinogenese wäre.

Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt, der noch weiterzuverfolgen wäre, ist der von Long et al. Dieser besagt, dass Zellen, die einen hohen HIF-1α Gehalt aufweisen, resistenter gegenüber einer Radiotherapie sind. ⁹⁴

Zum Teil würden sich die Ergebnisse mit unseren Resultaten decken. Wir konnten durch die CO₂-Behandlung sowohl erhöhte HIF-1α Level nachweisen als auch die Vermutung aufstellen, dass die Zellen in einen möglichen Zellarrest gehen und so die Proliferation herabgesetzt wird.

Dies würde erklären, warum eine Radiotherapie in mit CO₂ vorbehandelten Zellen nicht gut wirksam ist. Zellen, die sich im GO-Zustand befinden, können gegenüber Strahlentherapie oft widerstandsfähiger sein als Zellen, die sich aktiv teilen. Da Strahlung ihre Wirkung vor allem auf Zellen ausübt, die sich in der aktiven Teilungsphase befinden, können ruhende Zellen mit niedrigerer Teilungsrate weniger anfällig für die schädlichen Auswirkungen von Strahlung sein. Dies könnte bedeuten, dass eine Kombinationstherapie aus CO₂ und Strahlung eher weniger effektiv und geeignet wäre.

5.2 Wirkung von Stickstoff

Wir verwendeten Stickstoff in unseren Versuchen vornehmlich, um eine spezifische Wirkung von CO₂ nachzuweisen und einen rein hypoxischen Effekt auszuschließen. Daher führten wir die Versuche sowohl mit Stickstoff als auch mit CO₂ in der Überdruckkammer durch. Trotzdem bestand die Frage, ob und wenn ja, welche Einflussfaktoren Stickstoff auf die Zellen haben könnte.

Bezüglich Vitalität konnten wir keine Unterschiede feststellen. Stickstoff hat also in dem Maße, wie wir es angewandt haben, keine negativen Einflüsse auf die Zellen gehabt.

In den weiteren Versuchen waren allerdings keine Auswirkungen von Stickstoff zu vermerken. Weder kam es zu einer relevanten α -SMA Reduktion noch zu einem signifikanten Anstieg von HIF-1- α oder SIRT3. Genauso wenig konnten wir einen Einfluss auf den Citratzyklus vermerken. Diese Ergebnisse scheinen der Beweis dafür zu sein, dass Stickstoff vermutlich in der Suche nach Therapiemöglichkeiten keine Rolle zu spielen scheint und keiner weiteren Untersuchung bedarf. Ebenso ist auch die Literatur zu diesem Thema limitiert.

5.3 Kritische Betrachtung und mögliche Schwächen der Arbeit

Während der Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente könnten verschiedene Faktoren zu Verzerrungen geführt haben.

Die von uns verwendete Unterdruckkammer der Firma Haux entspricht den aktuellen wissenschaftlichen Standards auf dem Gebiet der Grundlagenforschung und eignet sich hervorragend, um im Modell an Fibroblasten die Auswirkungen der verschiedenen Gase zu untersuchen. Es ist jedoch anzumerken, dass wir keine Studien finden konnten, die einen vergleichbaren Versuchsaufbau und -ansatz verfolgt haben.

Die Kammer wurde über alle Versuche hinweg nur von einer Person bedient, was Unterschiede in der Handhabung minimiert. Dabei wurde die Druckkammer manuell bedient, sodass ein konstanter Druckauf und -abbau, über alle Versuche hinweg wahrscheinlich Abweichungen aufwies. Des Weiteren handelt es sich bei den verwendeten Zellen um humane Zellen verschiedener Spender, sodass Abweichungen zu erwarten sind. Diese könnten durch eine höhere Fallzahl verringert werden und bieten gleichzeitig eine bessere Heterogenität der Versuche. Da es sich bei unseren Proben um Spenderinnen und Spender handelte, hatten wir keinen Einfluss auf das Alter oder das Geschlecht, sodass es sich hier um ein homogenes Kollektiv vorwiegend Frauen mittleren Alters handelt, die sich einer plastischen Schönheitsoperation unterzogen haben. Hier stellt sich zudem die Frage, ob eventuelle Einnahmen von Ovulationshemmern oder Antibiotika mögliche Wechselwirkungen wie beispielsweise Enzymreaktionen verstärkt, verfälscht der sogar eingeschränkt haben könnten. Hier wäre es interessant, in weiteren Versuchen vorab mehr Informationen über die jeweiligen Spender zu erhalten, auch im Hinblick darauf, dass mittlerweile nachgewiesen werden konnte, dass das weibliche Geschlecht und Schwangerschaft Risikofaktoren für die Entwicklung von Narben und Keloiden darstellen. ^{40,104}

Ein weiterer Aspekt stellt das Einfrieren der verwendeten Zellen dar, wobei mit zunehmender Lagerdauer möglicherweise ein Qualitätsverlust einhergehen könnte.

Zudem muss auch die Genauigkeit der von uns verwendeten Auswertungsmethoden diskutiert werden. Sowohl systematische Fehler wie falsch geeichte Waagen oder Pipetten könnten mögliche Messfehler und somit mögliche falsche Proteinmengen bedingen. Eine weitere Fehlerquelle könnten Messfehler bei der Auswertung über ImageLab sein, die zu Verfälschungen der Ergebnisse geführt haben.

Bei dem von uns durchgeführten Enzym-Aktivitätsassay mussten wir uns auf die Anleitung verlassen, die uns von dem Hersteller mitgegeben wurde. Diese war teils wenig ausführlich beschrieben, daher können auch hier Fehler sowohl bei der Durchführung als auch bei der Auswertung unterlaufen sein. Zudem ist die Fallzahl zu klein, um eine signifikante Korrelation herstellen zu können. Die geringen Fallzahlen entstanden dabei vor allem aufgrund zeitlicher Einschränkungen. Dies wäre also ein guter Startpunkt für Folgearbeiten und weitere Versuche.

Bei der statistischen Auswertung könnte es zu Fehlern bei der Auswahl des Tests und zu Verzerrungen aufgrund der geringen Fallzahl gekommen sein.

Das größte Hindernis stellt jedoch der Transfer dar. So kann eine isolierte Betrachtung des Verhaltens einzelner Zelltypen in unserem Versuchsmodell nur schwer die Komplexität der Prozesse in einer "realen" Wunde während der Wundheilung abbilden. Hier wären in vivo Versuchsmodelle von Bedeutung.

80

Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass trotz möglicher Fehlerquellen und der hohen statistischen Ansprüche unsere Ergebnisse signifikant waren. Zudem können sie sowohl durch Ergebnisse von Vorarbeiten als auch durch realistische Wirkmechanismen gut erklärt werden können. Nichtsdestotrotz sind weitere Untersuchungen und die Erhöhung von Fallzahlen in weiteren Untersuchungen vonnöten.

5.4 Ausblick und therapeutische Perspektive

Die Bildung von Narben gehört zum natürlichen Reparaturprozesses des Körpers. Jedoch kann es zu pathologischen Wundheilungsprozessen kommen, sodass Narben das Aussehen und die Funktion des Gewebes erheblich beeinträchtigen und schwer zu behandeln sind. Therapien, die die Funktion und das Erscheinungsbild von Narbengewebe verbessern können, sind daher von großem Interesse. Die Behandlung von Narben erfolgt derzeit entweder chirurgisch, nichtchirurgisch oder es erfolgt eine Kombination aus verschiedenen Ansätzen.

Obwohl Fortschritte beim Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen erzielt wurden, gibt es derzeit immer noch keine vollständig wirksame Behandlung zur Hemmung der Fibrose. Zudem stößt die Standardbehandlung von abnormen Narben immer noch an ihre Grenzen, nicht zuletzt wegen eines fehlenden Konsenses über den Goldstandard.¹⁰⁵

Es bleibt festzuhalten, dass wir während der Literatursuche zu diesem Themengebiet an Grenzen stießen, was auch den Grund für unsere Arbeit darstellt. Es scheint, dass viele Studien zu dem Thema der Effektivität diverser Therapien im Bereich Keloiden und hypertrophen Narben durchgeführt wurden und werden. Jedoch fehlt oft die Evidenz hinter den Therapien⁶⁴. Kaum eine der Studien beschäftigt sich mit der molekularen oder zellulären Wirkweise. Gerade was die CO₂ Behandlung und deren molekulare Wirkmechanismen angeht, war die Literatur sehr knapp bemessen. Daher wäre ein großer Schritt, zurückzugehen und die bereits durchgeführten Therapien erneut auf molekularer Ebene zu verstehen, um die Therapie weiter zu optimieren.

Durch unsere Arbeit konnten wir erste Hinweise auf die molekularen Wirkmechanismen von CO₂ geben, die weiterverfolgt werden sollten. So konnten wir Hinweise feststellen, dass CO₂ eine negative Wirkung auf die aerobe Glykolyse durch Hemmung verschiedener Enzyme des Citratzyklus besitzt. Ein weiterer

Ansatzpunkt könnte ebenfalls die beeinflussende Wirkung von Kohlenstoffdioxid auf HIF-1α sowie SIRT3 darstellen, was sich vor allem in der Differenzierung von Myofibroblasten zeigt.

Ein von unseren Ergebnissen unabhängiger, aber entscheidender Ansatzpunkt für Forschungen sollte die Untersuchung potenzieller geschlechts- und ethnizitätsspezifischer Unterschiede sein. Es ist mittlerweile bewiesen, dass Asiaten, Afrikaner sowie Frauen im Vergleich zu anderen ethnischen Gruppen und Männern häufiger von dieser Erkrankung betroffen sind.^{32,40,104} Wenn man auf genetischer Ebene die entscheidenden Differenzen finden würde, könnte man hierauf basierend, gezieltere Therapieentwicklung entwickeln.

Nicht Teil dieser Arbeit, aber doch von großer Bedeutung, scheinen Erkenntnisse im Bereich der fetalen Fibroblasten zu sein. Studien zeigen, dass fetale Fibroblasten die Fähigkeit besitzen, bei einer Verletzung des Fötus im Mutterleib eine vollständige Regeneration ohne Narbenbildung zu bewirken. Dies bedeutet, dass eine narbenfreie Heilung möglich ist, bei der Zellen regenerieren und nicht repariert werden. Die biomechanischen Prozesse dahinter zu verstehen, könnte ein möglicher Ansatzpunkt für Therapieformen der adulten Fibroblasten darstellen.^{19,106,107}

Wir setzten uns in unserer Arbeit vor allem mit den molekularen Wirkmechanismen des TGF-β auseinander. Dabei konnten unsere Fragen nur zum Teil beantwortet werden und dazu ergaben sich neue Fragen.

Insbesondere die Frage nach der Wirkungsweise auf den TGF-β Signalweg und auf die Enzyme des Citratzyklus bedarf weiterer Klärung. Zur abschließenden Beantwortung dieser Fragen sind folgende Dinge notwendig:

- Eine Untersuchung des TGF-β Signalweges
- Genauere Informationen über die Spenderinnen und Spender
- Heterogener Spenderpool
- Eine Erhöhung der Fallzahl
- Untersuchung der festgestellten Dosis-Wirkungsbeziehung

Und obwohl die Anwendung von CO₂ bereits eine etablierte Therapiemethode darstellt, scheint es eine Überlegung wert zu sein, wie man die Versuche der Überdruckkammer, die vielversprechend scheinen, auf eine klinische Anwendung übertragen könnte. Hierbei ergibt sich vor allem das spezifische Problem, dass der

Mensch nur limitiert ohne Sauerstoff auskommen kann. Eine Methode, ähnlich wie die bereits durchgeführten CO₂ -Injektionen, bei der lediglich die betroffene Stelle behandelt wird, müsste gefunden werden. Zudem wäre die ausschließliche lokale Wundbehandlung zum Schutz des restlichen Körpers auch gemäß unseren Ergebnissen bezüglich der Hemmung des Citratzyklus durchaus empfehlenswert.

In den letzten Jahren haben die Erkenntnisse über diese Form der Erkrankung jedoch immer weiter zugenommen, daher sind die kommenden Entwicklungen in diesem Bereich von höchstem Interesse. Es könnte durchaus sein, dass unsere neu entdeckten Hinweise auf die molekularen Wirkungsmechanismen von CO₂ einen wichtigen Ansatzpunkt dabei darstellen könnten.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Haut	1
Abbildung 2: Darstellung der Differenzierung von Fibroblast zu Myofibroblast	8
Abbildung 3: Reaktionsfolge des Citratzyklus	17
Abbildung 4: Übersicht Projektablauf	33
Abbildung 5: Druckkammer HAUX Testcom 200/2	37
Abbildung 6: Versuchsschema CellTiterBlue Assay	39
Abbildung 7: Konfluenz der Fibroblasten an Versuchstag 4	39
Abbildung 8: Versuchsaufbau der Druckkammer Versuche	40
Abbildung 9: Versuchsablauf	41
Abbildung 10: Ablauf einer Zellzahlbestimmung	43
Abbildung 11: Semi dry Blotting	47
Abbildung 12: Zellvitalität	51
Abbildung 13: Fluoreszenzfärbung der Fibroblasten (Kontrolle)	52
Abbildung 14: Fluoreszenzfärbung der Fibroblasten nach CO ₂ Exposition	53
Abbildung 15: Fluoreszenzfärbung der Fibroblasten mit N ₂ Exposition	54
Abbildung 16: Einfluss einmaliger auf die Zellvitalität	55
Abbildung 17: Immunfärbung des Proteins α-SMA nach Exposition mit CO ₂	56
Abbildung 18: Immunfärbung des Proteins α -SMA nach Exposition mit N ₂	57
Abbildung 19: Westernblot Bild der α-SMA Proteinexpression	58
Abbildung 20: Westernblot der α-SMA Proteinexpression vs. Kontrolle	59
Abbildung 21: Westernblot α -SMA Proteinexpression vs. Kontrolle + TGF- β	60
Abbildung 22: Westernblot Bild der Sirtuin 3 Proteinexpression	60
Abbildung 23: Westernblot Sirtuin 3 Proteinexpression vs. Kontrolle	61
Abbildung 24: Westernblot Sirtuin 3 Proteinexpression vs. Kontrolle + TGF- β	61
Abbildung 25: Westernblot HIF-1α Proteinexpression	62
Abbildung 26: Westernblot HIF-1α Proteinexpression vs. Kontrolle	63
Abbildung 27: Westernblot HIF-1 α Proteinexpression vs. Kontrolle + TGF- β	63
Abbildung 28: Citratzyklus und dessen Enzyme	64
Abbildung 29: α-KG-DH-Aktivität	65
Abbildung 30: α-KG-DH- Aktivitätsverlauf	65
Abbildung 31: IDH-Aktivität	66
Abbildung 32: IDH-Aktivitätsverlauf	66
Abbildung 33: vereinfachte Darstellung der Ergebnisse	67

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial	19
Tabelle 2: Geräte	22
Tabelle 3: Substanzen und Lösungen	26
Tabelle 4: Medien und Puffer	28
Tabelle 5: Antikörper und Marker	
Tabelle 6: Kit Systeme	
Tabelle 7: Liste der verwendeten Software	31
Tabelle 8: Spender Vitalitätsversuche	31
Tabelle 9: Spender Immunfluoreszenz Versuche	32
Tabelle 10: Spender Western Blot Versuche	32
Tabelle 11: Spender Aktivitätsassay Versuche	32
Tabelle 12: Pipettierschema des BSA- Standards	46

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1. Moll, I. Duale Reihe Dermatologie. (Thieme, Stuttgart, 2016).
- 2. Rassner, G. *Dermatologie: Lehrbuch und Atlas mit Zugang zum Elsevier-Portal.* (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München, 2009).
- 3. Welsch, U., Kummer, W. & Deller, T. *Histologie Das Lehrbuch: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie.* (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München, 2018).
- 4. Aumüller, G., Aust, G., Engele, J., Maio, G. & Kirsch, J. *Duale Reihe Anatomie*. (Thieme, 2020).
- 5. Li, B. & Wang, J. H.-C. Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation and Measurement. *J Tissue Viability* **20**, 108–120 (2011).
- 6. Drenckhahn, D. & Waschke, J. *Taschenbuch Anatomie*. (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2020).
- 7. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321 (2008).
- 8. Martin, P. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* **276**, 75–81 (1997).
- 9. Singer, A. J. Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine* 9 (1999).
- 10. Scheithauer, M. & Riechelmann, H. Übersicht Teil I: Grundlagen der kutanen Wundheilung. *Laryngorhinootologie* **82**, 31–35 (2003).
- Lorenz, H. P., Whitby, D. J., Longaker, M. T. & Adzick, N. S. Fetal wound healing. The ontogeny of scar formation in the non-human primate. *Ann Surg* 217, 391–396 (1993).
- 12. Rowlatt, U. Intrauterine wound healing in a 20 week human fetus. *Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol.* **381**, 353–361 (1979).
- 13. Sullivan, K. M., Lorenz, H. P., Meuli, M., Lin, R. Y. & Adzick, N. S. A model of scarless human fetal wound repair is deficient in transforming growth factor beta. *Journal of Pediatric Surgery* **30**, 198–203 (1995).
- 14. Diegelmann, R. F. & Evans, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* **9**, 283–289 (2004).
- 15. Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J. Invest. Dermatol. **127**, 526–537 (2007).
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 349–363 (2002).
- McAnulty, R. J. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 666–671 (2007).
- Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B. & Statkov, P. R. Contraction of Granulation Tissue in vitro: Similarity to Smooth Muscle. *Science* 173, 548–550 (1971).
- 19. Parekh, A. & Hebda, P. A. The Contractile Phenotype of Dermal Fetal Fibroblasts

in Scarless Wound Healing. Curr Pathobiol Rep 5, 271–277 (2017).

- 20. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology* **200**, 500–503 (2003).
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F. & Desmoulière, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 7, 301–311 (2014).
- 22. Taflinski, L. *et al.* Blue light inhibits transforming growth factor-β1-induced myofibroblast differentiation of human dermal fibroblasts. *Experimental Dermatology* **23**, 240–246 (2014).
- 23. Bielefeld, K. A., Amini-Nik, S. & Alman, B. A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci* **70**, 2059– 2081 (2013).
- 24. Nischwitz, S. P. *et al.* Evidence-based therapy in hypertrophic scars: An update of a systematic review. *Wound Repair and Regeneration* **28**, 656–665 (2020).
- 25. Jagadeesan, J. & Bayat, A. Transforming growth factor beta (TGFβ) and keloid disease. *International Journal of Surgery* **5**, 278–285 (2007).
- 26. Bindu, S. *et al.* SIRT3 blocks myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis by preventing mitochondrial DNA damage. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **312**, L68–L78 (2017).
- Yu, W., Dittenhafer-Reed, K. E. & Denu, J. M. SIRT3 Protein Deacetylates Isocitrate Dehydrogenase 2 (IDH2) and Regulates Mitochondrial Redox Status. J. Biol. Chem. 287, 14078–14086 (2012).
- Sosulski, M. L., Gongora, R., Feghali-Bostwick, C., Lasky, J. A. & Sanchez, C. G. Sirtuin 3 Deregulation Promotes Pulmonary Fibrosis. *GERONA* glw151 (2016) doi:10.1093/gerona/glw151.
- Berman, B., Maderal, A. & Raphael, B. Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment. *Dermatologic Surgery* 43, S3–S18 (2017).
- 30. Ogawa, R. *et al.* Diagnosis and Treatment of Keloids and Hypertrophic Scars— Japan Scar Workshop Consensus Document 2018. *Burns Trauma* 7, 39 (2019).
- Ogawa, R. Japan Scar Workshop (JSW) Scar Scale (JSS) for Assessing Keloids and Hypertrophic Scars. in *Textbook on Scar Management* (eds. Téot, L., Mustoe, T. A., Middelkoop, E. & Gauglitz, G. G.) 133–140 (Springer International Publishing, Cham, 2020). doi:10.1007/978-3-030-44766-3_15.
- Sadiq, A., Khumalo, N. P. & Bayat, A. Genetics of Keloid Scarring. in *Textbook on Scar Management* (eds. Téot, L., Mustoe, T. A., Middelkoop, E. & Gauglitz, G. G.) 61–76 (Springer International Publishing, Cham, 2020). doi:10.1007/978-3-030-44766-3_8.
- 33. Ehrlich, H. P. *et al.* Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol* **145**, 105–113 (1994).
- Wolfram, D., Tzankov, A., Pülzl, P. & Piza-Katzer, H. Hypertrophic Scars and Keloids—A Review of Their Pathophysiology, Risk Factors, and Therapeutic Management: *Dermatologic Surgery* 35, 171–181 (2009).
- 35. Babu, M., Diegelmann, R. & Oliver, N. Fibronectin is overproduced by keloid fibroblasts during abnormal wound healing. *Mol Cell Biol* **9**, 1642–1650 (1989).

- Oliver, N., Babu, M. & Diegelmann, R. Fibronectin Gene Transcription Is Enhanced in Abnormal Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology* 99, 579–586 (1992).
- Arima, J., Huang, C., Rosner, B., Akaishi, S. & Ogawa, R. Hypertension: a systemic key to understanding local keloid severity. *Wound Repair and Regeneration* 23, 213–221 (2015).
- Kim, H.-D. *et al.* Recurrent Auricular Keloids during Pregnancy. *Arch Plast Surg* 40, 70–72 (2013).
- 39. Ogawa, R., Arima, J., Ono, S. & Hyakusoku, H. CASE REPORT Total Management of a Severe Case of Systemic Keloids Associated With High Blood Pressure (Hypertension): Clinical Symptoms of Keloids May Be Aggravated by Hypertension. *Eplasty* 13, e25 (2013).
- 40. Park, T. H. & Chang, C. H. Keloid Recurrence in Pregnancy. *Aesth Plast Surg* **36**, 1271–1272 (2012).
- Sadiq, A., Khumalo, N. P. & Bayat, A. Genetics of Keloid Scarring. in *Textbook on Scar Management: State of the Art Management and Emerging Technologies* (eds. Téot, L., Mustoe, T. A., Middelkoop, E. & Gauglitz, G. G.) (Springer, Cham (CH), 2020).
- 42. Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming Growth Factor-ill Induces u-Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts. 9 (1993).
- Bock, O. *et al.* Studies of Transforming Growth Factors Beta 1-3 and their Receptors I and II in Fibroblast of Keloids and Hypertrophic Scars. *Acta Dermato-Venereologica* 1, 1–1 (2005).
- 44. Köse, O. & Waseem, A. Keloids and Hypertrophic Scars: Are They Two Different Sides of the Same Coin? *Dermatol Surg* **34**, 336–346 (2008).
- 45. Gold, M. H. *et al.* Updated International Clinical Recommendations on Scar Management: Part 2—Algorithms for Scar Prevention and Treatment. *DERMATOLOGIC SURGERY* 7 (2014).
- 46. Nast, A. *et al.* S2k-Leitlinie Therapie pathologischer Narben (hypertrophe Narben und Keloide) –Update 2020. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **19**, 312–327 (2021).
- 47. Atiyeh, B. S. Nonsurgical Management of Hypertrophic Scars: Evidence-Based Therapies, Standard Practices, and Emerging Methods. *Aesth Plast Surg* **44**, 1320–1344 (2020).
- 48. Lee, Y. *et al.* Combined Therapeutic Strategies for Keloid Treatment. *Dermatologic Surgery* **45**, 802–810 (2019).
- 49. Puzey, G. The use, of pressure garments on hypertrophic scars. *Journal of Tissue Viability* **12**, 11–15 (2002).
- 50. Del Toro, D., Dedhia, R. & Tollefson, T. T. Advances in scar management: prevention and management of hypertrophic scars and keloids. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* **24**, 322–329 (2016).
- 51. Andrews, J. P., Marttala, J., Macarak, E., Rosenbloom, J. & Uitto, J. Keloids: The paradigm of skin fibrosis pathomechanisms and treatment. *Matrix Biol* **51**, 37–46 (2016).

- 52. Karagoz, H. *et al.* A Review of the Prevention and Treatment of Hypertrophic Scars: Part I Clinical Aspects. *Arch Clin Exp Surg* **1**, 237 (2012).
- 53. Bouzari, N., Davis, S. C. & Nouri, K. Laser treatment of keloids and hypertrophic scars. *International Journal of Dermatology* **46**, 80–88 (2007).
- 54. Gaston, P., Humzah, M. D. & Quaba, A. A. The pulsed tuneable dye laser as an aid in the management of postburn scarring. *Burns* **22**, 203–205 (1996).
- 55. Dilmaghani, S. *et al.* Needling, lasers, and Meso-Botox for hypertrophic and keloidal scars: A comprehensive review study on promising procedural treatments. *J Family Med Prim Care* **11**, 4195–4204 (2022).
- 56. Juckett, G. & Hartman-Adams, H. Management of Keloids and Hypertrophic Scars. *AFP* **80**, 253–260 (2009).
- 57. Kuo, Y.-R. *et al.* Flashlamp pulsed dye laser (PDL) suppression of keloid proliferation through down-regulation of TGF-β1 expression and extracellular matrix expression. *Lasers in Surgery and Medicine* **34**, 104–108 (2004).
- 58. Kuo, Y.-R. *et al.* Suppressed TGF-β1 expression is correlated with up-regulation of matrix metalloproteinase-13 in keloid regression after flashlamp pulsed-dye laser treatment. *Lasers in Surgery and Medicine* **36**, 38–42 (2005).
- 59. Kuo, Y.-R., Wu, W.-S. & Wang, F.-S. Flashlamp pulsed-dye laser suppressed TGFβ1 expression and proliferation in cultured keloid fibroblasts is mediated by MAPK pathway. *Lasers in Surgery and Medicine* **39**, 358–364 (2007).
- 60. Berman, B. *et al.* A Review of the Biologic Effects, Clinical Efficacy, and Safety of Silicone Elastomer Sheeting for Hypertrophic and Keloid Scar Treatment and Management. *Dermatologic Surgery* **33**, 1291–1303 (2007).
- 61. Berman, B. *et al.* A Retrospective Registry Study Evaluating the Long-Term Efficacy and Safety of Superficial Radiation Therapy Following Excision of Keloid Scars. *J Clin Aesthet Dermatol* **13**, 12–16 (2020).
- 62. Shepherd, J. P. & Dawber, R. P. R. The Response of Keloid Scars to Gryosurgery. *Plastic and Reconstructive Surgery* **70**, 677–681 (1982).
- 63. Zouboulis, C. C., Zouridaki, E., Rosenberger, A. & Dalkowski, A. Current developments and uses of cryosurgery in the treatment of keloids and hypertrophic scars. *Wound Repair and Regeneration* **10**, 98–102 (2002).
- 64. Stolecka-Warzecha, A. *et al.* The Influence of Carboxytherapy on Scar Reduction. *Clin Cosmet Investig Dermatol* **15**, 2855–2872 (2022).
- 65. Wang, J. *et al.* Application of fractional carbon dioxide laser monotherapy in keloids: A meta-analysis. *Journal of Cosmetic Dermatology* **n**/**a**, (2024).
- 66. Zhang, C., Yin, K. & Shen, Y. Efficacy of fractional carbon dioxide laser therapy for burn scars: a meta-analysis. *Journal of Dermatological Treatment* **0**, 1–6 (2019).
- 67. Paolo, F., Nefer, F., Paola, P. & Nicolò, S. Periorbital area rejuvenation using carbon dioxide therapy. *Journal of Cosmetic Dermatology* **11**, 223–228 (2012).
- 68. Fabry *et al.* Clinical and microcirculatory effects of transcutaneous CO2 therapy in intermittent claudication. Randomized double-blind clinical trial with a parallel design. *Vasa* **38**, 213–224 (2009).
- 69. Finzgar, M., Melik, Z. & Cankar, K. Effect of transcutaneous application of gaseous carbon dioxide on cutaneous microcirculation. *CH* **60**, 423–435 (2015).

- 70. Frangez, I., Colnaric, J. & Truden, D. Use of Transcutaneous Application of CO2 in Diabetic Foot Pathology. *Clin Res Foot Ankle* **05**, (2017).
- 71. Akahane, S. *et al.* Transcutaneous carbon dioxide application accelerates muscle injury repair in rat models. *International Orthopaedics (SICOT)* **41**, 1007–1015 (2017).
- 72. Brandi, C. *et al.* The Role of Carbon Dioxide Therapy in the Treatment of Chronic Wounds. *in vivo* 4 (2010).
- Brochado, T. M. M., de Carvalho Schweich, L., Di Pietro Simões, N., Oliveira, R. J. & Antoniolli-Silva, A. C. M. B. Carboxytherapy: Controls the inflammation and enhances the production of fibronectin on wound healing under venous insufficiency. *Int Wound J* 16, 316–324 (2019).
- 74. Onishi, Y. *et al.* Transcutaneous Application of Carbon Dioxide (CO2) Induces Mitochondrial Apoptosis in Human Malignant Fibrous Histiocytoma In Vivo. *PLoS ONE* 7, e49189 (2012).
- 75. Vohwinkel, C. U. *et al.* Elevated CO2 Levels Cause Mitochondrial Dysfunction and Impair Cell Proliferation. *J. Biol. Chem.* **286**, 37067–37076 (2011).
- Thomas, L. W. & Ashcroft, M. Exploring the molecular interface between hypoxiainducible factor signalling and mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 76, 1759–1777 (2019).
- 77. Ke, Q. & Costa, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* **70**, 1469–1480 (2006).
- 78. Leinhos, L. *et al.* Hypoxia suppresses myofibroblast differentiation by changing RhoA activity. *J Cell Sci* **132**, (2019).
- 79. Qiu, Z. *et al.* Role of HIF-1α in pathogenic mechanisms of keloids. *Journal of Cosmetic Dermatology* **22**, 1436–1448 (2023).
- 80. Krebs, H. A. & Johnson, W. A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *FEBS Lett* **117 Suppl**, K1-10 (1980).
- 81. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. (Springer, Berlin, Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-17972-3.
- 82. Kang, W., Suzuki, M., Saito, T. & Miyado, K. Emerging Role of TCA Cycle-Related Enzymes in Human Diseases. *Int J Mol Sci* **22**, 13057 (2021).
- 83. Rassow, J., Netzker, R. & Hauser, K. *Duale Reihe Biochemie*. (Thieme, Stuttgart, 2022).
- Kołodziejczak, A., Podgórna, K. & Rotsztejn, H. Is carboxytherapy a good alternative method in the removal of various skin defects? *Dermatologic Therapy* 31, e12699 (2018).
- 85. Varlaro, V. *et al.* Carboxytherapy : effects on microcirculation and its use in the treatment of severe lymphedema A review. in (2007).
- 86. Bolevich, S. *et al.* Protective role of carbon dioxide (CO2) in generation of reactive oxygen species. *Mol Cell Biochem* **411**, 317–330 (2016).
- 87. D'Arcangelo, D. *et al.* Acidosis Inhibits Endothelial Cell Apoptosis and Function and Induces Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *Circulation Research* **86**, 312–318 (2000).
- 88. Derynck, R. & Feng, X.-H. TGF-β receptor signaling. *Biochimica et Biophysica*

Acta (BBA) - Reviews on Cancer 1333, F105–F150 (1997).

- Leask, A. & Abraham, D. J. TGF-β signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal* 18, 816–827 (2004).
- 90. Takano, K., Kasamatsu, S., Aoki, M. & Takahashi, Y. Carbon dioxide-induced decrease in extracellular pH enhances the production of extracellular matrix components by upregulating TGF-β1 expression via CREB activation in human dermal fibroblasts. *Experimental Dermatology* **32**, 1651–1662 (2023).
- 91. Tadokoro, Y. *et al.* Transcutaneous carbon dioxide application suppresses the expression of cancer-associated fibroblasts markers in oral squamous cell carcinoma xenograft mouse model. *PLoS One* **18**, e0290357 (2023).
- 92. Modarressi, A. *et al.* Hypoxia Impairs Skin Myofibroblast Differentiation and Function. *Journal of Investigative Dermatology* **130**, 2818–2827 (2010).
- 93. Kang, Y. *et al.* Hypoxia and HIF-1α Regulate Collagen Production in Keloids. *Journal of Investigative Dermatology* **140**, 2157–2165 (2020).
- 94. Long, F. *et al.* 2ME2 increase radiation-induced apoptosis of keloid fibroblasts by targeting HIF-1α in vitro. *Australasian Journal of Dermatology* **57**, e32–e38 (2016).
- 95. Jusman, S. W. A., Sari, D. H., Ningsih, S. S., Hardiany, N. S. & Sadikin, M. Role of Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha (HIF-1α) in Cytoglobin Expression and Fibroblast Proliferation of Keloids. 9 (2018).
- 96. Lei, R. *et al.* HIF-1α promotes the keloid development through the activation of TGF-β/Smad and TLR4/MyD88/NF-κB pathways. *Cell Cycle* 18, 3239–3250 (2019).
- 97. Chen, T. *et al.* Activation of SIRT3 by resveratrol ameliorates cardiac fibrosis and improves cardiac function via the TGF-β/Smad3 pathway. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **308**, H424–H434 (2015).
- Zhang, Y. *et al.* Necroptosis Inhibition by Hydrogen Sulfide Alleviated Hypoxia-Induced Cardiac Fibroblasts Proliferation via Sirtuin 3. *Int J Mol Sci* 22, 11893 (2021).
- 99. Xie, N. *et al.* Glycolytic Reprogramming in Myofibroblast Differentiation and Lung Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **192**, 1462–1474 (2015).
- 100. Holz, O. Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *European Respiratory Journal* **24**, 575–579 (2004).
- deZengotita, V. M., Abston, L. R., Schmelzer, A. E., Shaw, S. & Miller, W. M. Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolality. *Biotechnology and Bioengineering* 78, 741–752 (2002).
- 102. Jiang, P. *et al.* Efficacy and the toxicity of the interstitial high-dose-rate brachytherapy in the management of recurrent keloids: 5-year outcomes. *Brachytherapy* **17**, 597–600 (2018).
- 103. Ogawa, R., Yoshitatsu, S., Yoshida, K. & Miyashita, T. Is Radiation Therapy for Keloids Acceptable? The Risk of Radiation-Induced Carcinogenesis. *Plastic and Reconstructive Surgery* **124**, 1196 (2009).
- Noishiki, C., Hayasaka, Y. & Ogawa, R. Sex Differences in Keloidogenesis: An Analysis of 1659 Keloid Patients in Japan. *Dermatol Ther (Heidelb)* 9, 747–754 (2019).

- 105. Ogawa, R. The Most Current Algorithms for the Treatment and Prevention of Hypertrophic Scars and Keloids: A 2020 Update of the Algorithms Published 10 Years Ago. *Plast Reconstr Surg* **149**, 79–94 (2022).
- 106. Larson, B. J., Longaker, M. T. & Lorenz, H. P. Scarless Fetal Wound Healing: A Basic Science Review. *Plast Reconstr Surg* **126**, 1172–1180 (2010).
- 107. Bullard, K. M., Longaker, M. T. & Lorenz, H. P. Fetal Wound Healing: Current Biology. *World J. Surg.* 27, 54–61 (2003).

Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek bedanken, der mir nicht nur fachlich zur Seite stand, sondern mich auch durch seine motivierende Art und sein unermüdliches Engagement maßgeblich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat. Sein fachliches Know-how, sein immer offenes Ohr sowie seine stets konstruktive Kritik und Ideen haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso möchte ich mich bei dem Klinikdirektor Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Joachim Windolf bedanken, der es mir ermöglicht hat, die Arbeit im Forschungslabor der Unfall- und Handchirurgie anfertigen zu können. Ein großer Dank gilt auch Herrn PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka aus dem Institut für Pathologie für die Annahme der Zweitbetreuung.

Zudem danke ich allen weiteren Personen, die mich während der Arbeit im Labor auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben. Der Arbeitsplatz wurde vor allem durch das Engagement von Jutta Schneider, Samira Seghrouchni und Amin Zennati zu einem Ort, an den ich jeden Tag mit Freude gekommen bin und an den ich noch oft zurückdenke.

Ich möchte auch meiner Familie und meinen Freunden danken, die immer an mich geglaubt haben und mich in allen Phasen meines Studiums und meiner Forschung unterstützt haben.

Der größte Dank gilt meinem Vater, vielen Dank für deine bedingungslose Liebe, Unterstützung und dein Verständnis, ohne dich wäre ich niemals dort, wo ich jetzt bin.

Zuletzt möchte ich diese Arbeit meiner Mutter Antonie widmen.

Der Antrieb, der mich durch alle Höhen und Tiefen gebracht hat und der Grund, wieso ich überhaupt Ärztin geworden bin. Ich hoffe, du bist stolz auf mich. In ewiger Liebe und Dankbarkeit. Für immer.