

Aus der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie

(Direktor: Prof. Dr. med. Jochen Cremer)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

„Autologe Keratinozytentransplantation in Verbindung
mit Fibrin –
eine mögliche Therapieoption für die Behandlung
chronischer Wundheilungsstörungen“

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Sebastian Kleen
aus Düsseldorf

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. Justus Groß,
Segeberger Kliniken GmbH
Herzzentrum

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Martin Albrecht,
Klinik für Anästhesiologie und
Operative Intensivmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.04.2019

gez.: Prof. Dr.med. Johann Roider
(Vorsitzender der Kommission)

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis	III
II	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Einführung in die vorliegende Arbeit	1
1.2	Anatomie und Physiologie der menschlichen Haut.....	3
1.2.1	Anatomischer Aufbau	3
1.2.2	Weitere Zellen der Haut.....	4
1.3	Wundheilung.....	5
1.3.1	Wundheilungsphasen	5
1.3.2	Wundheilungsformen.....	7
1.3.2.1	Primäre Wundheilung.....	7
1.3.2.2	Sekundäre Wundheilung	7
1.4	Einteilung der chronisch venösen Wunde.....	8
2	Therapeutische Verfahren	9
2.1	Vakuumtherapie.....	9
2.2	Plättchenreiches Fibrin	10
2.3	Hauttransplantation.....	11
2.3.1	Spalthauttransplantation	11
2.3.2	Vollhauttransplantation	11
2.4	Amputation.....	12
3	Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	13
4	Material und Methoden	14
4.1	Geräte.....	14
4.2	Materialien	15
4.3	Methodik	17
4.3.1	Keratinozyten-Isolierung	17
4.3.1.1	Entnahme der Haut.....	17
4.3.1.2	Protokoll zur Keratinozyten-Isolierung – Version I.....	17
4.3.1.3	Protokoll zur Keratinozyten-Isolierung – Version II.....	18
4.3.1.4	Protokoll zur Keratinozyten-Isolierung – Version III.....	19
4.3.1.5	Keratinozytenkultur	20
4.3.1.6	Kryokonservierung von Keratinozyten.....	21
4.3.2	Anfertigung des Lysats	21

4.3.3	Proteinkonzentrationsmessung.....	22
4.3.4	Gel gießen	24
4.3.5	Gelelektrophorese	25
4.3.6	Western Blot	25
4.3.7	Anfertigung der histologischen Präparate.....	28
4.3.7.1	Entwässerung	28
4.3.7.2	Paraffin-Einbettung	28
4.3.7.3	Gewebeschnitte am Mikrotom.....	29
4.3.8	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung).....	29
4.4	Keratinozyten-Applikation im Co-Delivery-Verfahren.....	30
4.5	Klinische Anwendung der Keratinozytentransplantation	31
5	Ergebnis	33
5.1	Etablierung und Optimierung der Keratinozytenkultur	33
5.2	Western Blot	36
5.3	Histologie	37
5.4	Individueller Heilversuch am Patienten.....	38
5.4.1	Fotodokumentation Patient 1	39
5.4.2	Fotodokumentation Patient 2.....	41
6	Diskussion	44
6.1	Keratinozytenkultur	44
6.2	Histologische Analyse.....	51
6.3	Individueller Heilversuch.....	52
7	Zusammenfassung und Ausblick	56
8	Literaturverzeichnis	58
9	Danksagung.....	63
	Anhang	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut.....	4
Abbildung 2: Phasen der kutanen Reparatur	6
Abbildung 3: Stadien der chronisch venösen Insuffizienz.....	8
Abbildung 4: Stadium II nach Hach	8
Abbildung 5: Anlage eines VAC-Verbands am linken Unterschenkel	9
Abbildung 6: Beginnende Polymerisation des Fibrins.....	10
Abbildung 7: Spalthautgewinnung mit dem Dermatome.....	11
Abbildung 8: Vollhauttransplantation in Form einer Lappenplastik	12
Abbildung 9: Amputationsstumpf des linken Beins	12
Abbildung 10: Zellisolierung unter der Bench	19
Abbildung 11: Blick auf die Unterseite der Hautprobe	20
Abbildung 12: Beispiel eines Western Blot nach Entwicklung.	28
Abbildung 13: Beladung der Sprühkammer mit Keratinozyten und PRF..	30
Abbildung 14: pH-Teststreifen nach Abschluss des Kalibrierungsprozesses	31
Abbildung 15: Zell-Passagezeit pro entnommener Hautprobe in Tagen	34
Abbildung 16: Wachstumsdauer Zell-Konfluenz-Wachstumsplatte	35
Abbildung 17: Mikroskopisches Bild kultivierter Keratinozyten.	35
Abbildung 18: Auszug aus einem Western Blot.....	36
Abbildung 19: H.E.-Färbung eines kolonisierten Patch	37
Abbildung 20: Ausgangsbefund von Patient 1 am lateralen Unterschenkel	39
Abbildung 21: Laterale Ansicht des li. Unterschenkels von Patient 1	40
Abbildung 22: Laterale Ansicht des li. Unterschenkels von Patient 1	40
Abbildung 23: Laterale Ansicht des li. Unterschenkels von Patient 1	41
Abbildung 24: Ventrale Ansicht des re. Unterschenkels von Patient 2	41
Abbildung 25: Leicht laterale Ansicht des re. Unterschenkels von Patient 2	42
Abbildung 26: Leicht laterale Ansicht des re. Unterschenkels von Patient 2	42
Abbildung 27: Leicht laterale Ansicht des re. Unterschenkels von Patient 2	43

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammonium Persulfate
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (Aqua destillata)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
Bsp.	Beispiel
CLA	Cutaneous Lymphocyte Antigen
CK	Cytokeratin
CVI	Chronisch venöse Insuffizienz
DFS	Diabetisches Fußsyndrom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dtl.	Deutschland
DZ	Dendritische Zellen
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
etc.	et cetera
FGF	Fibroblast Growth Factor
FCS	Fetal Calf Serum
G-CSF	Granulocytes Colony Growth Factor
GM-CSF	Granulocytes/Macrophages Colony Growth Factor
h	Stunde/n (hour)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPT	Hyperparathyreodismus
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Imunglobulin
INF	Interferon
IL	Interleukin
INF	Insulin-like Growth Factor

kDa	Kilodalton (Einheit)
KGF	Keratinocyte Growth Factor
lat.	lateinisch
LZ	Langerhans Zellen
li.	links
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minute
NaCl	Natriumchlorid
NKZ	Natürliche Killerzellen
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Platelet-Derived-Growth Factor
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PRF	Platelet Rich Fibrin
pH	potentia Hydrogenii
RT	Raumtemperatur
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
re.	rechts
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (unit)
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Epithelial Growth Factor
Vol	Volumen
ZTL	Zytotoxische T-Zelle
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Einführung in die vorliegende Arbeit

Mit einer Inzidenz von 80.000 Patienten^{44,45} und damit verbundenen Behandlungskosten von über 1 Milliarde Euro pro Jahr¹² stellen chronische Wunden ein großes gesellschaftliches und gesundheitsökonomisches Problem dar. Allein in Deutschland werden jährlich bis zu 45.000 Amputationen durchgeführt^{10,51}.

In Zukunft ist durch die zunehmende Zahl an älteren Patienten zudem mit dem vermehrten Auftreten von mit chronischen Wunden in Zusammenhang stehenden Krankheiten, wie unter anderem Diabetes mellitus^{7,11}, zu rechnen.

Oberstes Ziel sollte daher die kausale Therapie der chronischen Wunden sein, vor allem bedingt durch die chronisch venöse Insuffizienz, die periphere arterielle Verschlusskrankheit sowie durch das diabetische Fußsyndrom. Kommt es trotzdem zur Ausbildung einer chronischen Wunde, stehen zur Unterstützung und Beschleunigung der Wundheilung mit der Vakuumtherapie, der Applikation von plättchenreichem Fibrin, Spalthauttransplantation, Vollhauttransplantation sowie im schlimmsten Fall der Amputation verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung^{9,43}. Chirurgische Verfahren sind bei kompromittierter Extremitätendurchblutung aufgrund der individuellen Krankengeschichte des Patienten sowie der Bildung einer neuen Wundfläche oftmals keine geeignete Therapieoption.

Um dennoch eine verbesserte Granulation sowie langsame Epithelialisierung des Wundgrunds zu erreichen^{1,56}, wird im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel PRF, auf den Wundgrund appliziert.

Ziel dieser Arbeit ist es, die PRF-Applikation mit autolog gewonnenen und kultivierten Keratinozyten zu kombinieren und damit eine neue und potente Therapieoption für Patienten mit chronischen Wunden zu entwickeln.

Die autolog kultivierten Zellen werden gemeinsam mit PRF in einer sprühbaren Matrix^{59,64} auf den Wundgrund appliziert. In diesem sogenannten Co-Delivery-Verfahren kommt es während des Sprühvorgangs zur Polymerisierung der flüssigen Fibrinmatrix, damit sind die Zellen für einige Tage auf dem Wundgrund fixiert. Die Fibrinmatrix wird vom Körper aufgelöst, und die autologen Zellen gelangen auf den Wundgrund, sodass nach einigen Tagen bereits einzelne Zellnester zu erkennen

sind. Hierdurch soll die Wundheilung von außen induziert, unterstützt, beschleunigt und zudem ein kosmetisch befriedigendes Ergebnis erzielt werden.

Durch ihre Anzuchtzeit von vier bis sechs Wochen sind aktuelle Isolierungsverfahren^{17,18,27} nicht für eine mögliche breite klinische Anwendung geeignet, sodass die Optimierung des Keratinozyten-Isolierungsvorgangs mit seiner Erstbeschreibung durch Rheinwald und Green⁴⁸ die zentrale Intention dieser Arbeit darstellt.

Bedingt durch ihre histologische Lage in der Basalschicht der Epidermis³⁵, ist der Isolierungsvorgang der Keratinozyten nicht trivial, da diese zum einen aus ihrem Zellverband gelöst werden müssen, zum anderen dabei aber nicht zu sehr geschädigt werden dürfen, um eine Einleitung der Apoptose zu verhindern.

Um das bestmögliche Ergebnis bei der Isolierung von Keratinozyten aus humanen Hautzellproben zu erreichen, wird zunächst als Basis ein laborinternes Protokoll zur Isolierung von Endothelzellen der Gefäßinnenwand verwendet. Dieses wird mit bisher gängigen Isolierungsprotokollen^{17,18,27} verglichen und anschließend verbessert.

So soll nach stetiger Auswertung der eigenen Beobachtungen und Kulturergebnisse sowie unter Berücksichtigung der Erfahrungen aus anderen Isolierungsverfahren^{17,18,27,48} ein neues, verbessertes Protokoll entwickelt werden.

In einem letzten Schritt wird das Co-Delivery-Verfahren mit autolog kultivierten Keratinozyten nach *In-vitro*-Versuchen und histologischer Auswertung im Rahmen eines individuellen Heilversuchs *in vivo* am Patienten getestet.

1.2 Anatomie und Physiologie der menschlichen Haut

1.2.1 Anatomischer Aufbau

Anatomisch lässt sich die Hautdecke in drei Schichten einteilen: Epidermis, Dermis und Subkutis.

Die oberflächliche bis zu 100 µm dicke **Epidermis** ist die eigentliche Deckschicht unseres Körpers und kann in vier Etagen gegliedert werden, die dadurch entstehen, dass Zellen gleichen Differenzierungsgrades auf einer Ebene liegen.

In einem etwa vierwöchigen, fortschreitenden Reifungsprozess wandern die in der untersten Etage liegenden mitosefähigen Keratinozyten an die Körperoberfläche und bilden in ihrem Endstadium als kernlose Hornzelle die oberste Etage, wo sie fortlaufend durch nachrückende Zellen abgeschilfert und ersetzt werden. Mitose, terminale Differenzierung und Zellverlust halten sich dabei die Waage.

Charakteristisch für das **Stratum basale** ist die direkt auf der Basallamina sitzende aus einer Lage bestehende Schicht aus prismatischen Zellen, die durch ihre mitotische Aktivität als einzige für den Zellnachschub verantwortlich sind. Auf endogene oder exogene Reize kann es mit einem synchronisierten Anstieg oder Abfall der Mitoseaktivität reagieren.

Das daran anschließende **Stratum spinosum** besteht aus zwei bis fünf polygonalen Zelllagen, in denen bereits die Synthese der für den Verhornungsprozess notwendigen Produkte beginnt.

Im etwa dreilagigen **Stratum granulosum** können die mit dem Verhornungsprozess in Zusammenhang stehenden zytoplasmatischen Aggregate lichtmikroskopisch nachgewiesen werden.

Die oberste und letzte Schicht, das **Stratum corneum**, besteht aus den Kern- und zellorganellosen Hornzellen (Korneozyten). Die Spalten zwischen den einzelnen Hornzellen sind mit polaren Lipiden (Ceramide) ausgefüllt und versiegelt, um einen unkontrollierten Wasserverlust des Körpers nach außen zu verhindern.

Um die Scherkräfte, denen die Haut ausgesetzt ist, abzufangen, werden die Keratinozyten von zahlreichen Haftkontakten (Desmosomen, Hemi-Desmosomen, Zytokeratinfilamenten) zusammengehalten. Dadurch entsteht ein Zugkräfte übertragendes Netzwerk, das die ganze Epidermis durchzieht und über die dermo-epidermale Verbindungszone an die Kollagenfasern der Dermis angeschlossen ist.

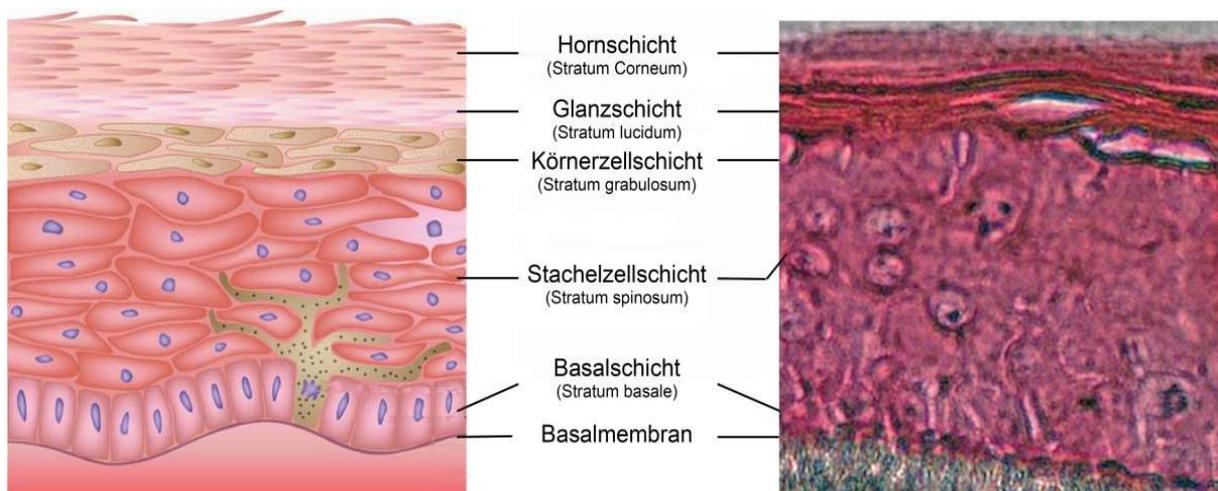


Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut (li.: Schema, re.: Histologie Hämatoxylin-Eosin gefärbt)³⁸

Die **Dermis** kann in papilläre Dermis (Stratum papillare) und retikuläre Dermis (Stratum reticulare) unterteilt werden.

Das **Stratum papillare** besitzt zur Versorgung jeder Papille eine eigene Kapillarschlinge und ist zudem mit einer Vielzahl freier Nervenendigungen ausgestattet. Durch die papilläre Struktur bietet sie eine zusätzliche Möglichkeit der Verzahnung zwischen Epidermis und Dermis und erhöht somit die Widerstandsfähigkeit der Haut.

Das **Stratum reticulare** besteht aus geflechtartigem straffen Bindegewebe und wird zudem von elastischen Fasern durchzogen. Dadurch ist sie auf der einen Seite reißfest und auf der anderen reversibel dehnbar.

Die unterste Hautschicht, die **Subkutis**, besteht aus lockerem Bindegewebe und Fettgewebe, das zudem durch Bindegewebszüge durchzogen ist. Dadurch wird sie an tiefere Strukturen wie z. B. Faszien mehr oder weniger verschieblich verankert.

Wichtiger Bestandteil der Subkutis sind zudem die epifaszialen Leitungsbahnen, die in ihr laufen (Plexus superficialis und Plexus profundus).^{35,39,46,57}

1.2.2 Weitere Zellen der Haut

Die in der Haut ubiquitär vorkommenden **Mastzellen** produzieren eine große Breite an Mediatoren und haben zudem großen Einfluss auf die Wundheilung, Angiogenese und den fibrotischen und entzündlichen Bindegewebsumbau. Neben Histamin kann bei Aktivierung der hochaffinen IgE-Rezeptoren der Zellmembran zudem eine Reihe weiterer proinflammatorischer Zytokine freigesetzt werden (bspw. IL-6, IL-8 und IL-10).

Melanozyten sind für die Pigmentierung und somit die Eigenfarbe der Haut verantwortlich. Hauptaufgabe ist es, durch die Produktion und Abgabe von Melanin an die umliegenden Keratinozyten zu reagieren und die Haut zu pigmentieren.

Langerhans-Zellen sind die dendritischen Zellen der Haut, die in regelmäßigen Abständen zwischen den Keratinozyten sitzen und als Antigen-präsentierende Zellen dienen. Daher spielen Langerhans-Zellen eine entscheidende Rolle bei zahlreichen weiteren immunologischen Prozessen.

Merkelzellen sind langsam adaptierende Mechanorezeptoren. Durch eine Reihe von ihnen gebildeter Proteine (z. B. Nerve Growth Factor und Substanz P) sind sie vermutlich auch an weiteren Vorgängen beteiligt.^{35,57}

1.3 Wundheilung

Ziel der Wundheilung ist es, Gewebedefekte zu reparieren und zu verschließen. Dieser Prozess ist keinesfalls nur ein lokales Geschehen, sondern bezieht sich auf den Gesamtorganismus. Konstitution, Immunabwehr und systemische Erkrankungen haben demnach einen großen Einfluss auf die Wundheilung. Bei der sekundären Wundheilung sowie chronischen Wunden ist dieser enge Regelkreis gestört.^{3,6,22}

1.3.1 Wundheilungsphasen

Die nur nach oberflächlichen Verletzungen ablaufende **physiologische Regeneration** ist eine defektfreie Heilung aus funktionell gleichartigen Zellen. Die teilungsfähigen Zellen im Gewebe müssen dabei erhalten sein.

Bei tieferen Wunden kommt der Mechanismus der **Reparation** oder auch **pathologischen Regeneration** zum Einsatz (Abb. 2), wodurch der Gewebedefekt durch minderwertigen bindegewebigen Ersatz narbig abheilt und dadurch verschlossen wird. Der dynamische Ablauf der Reparation kann in vier Hauptphasen unterteilt werden, die sich gegenseitig überlappen und in ihrer Dauer variieren. Die Zeitangaben sind daher Orientierungswerte.

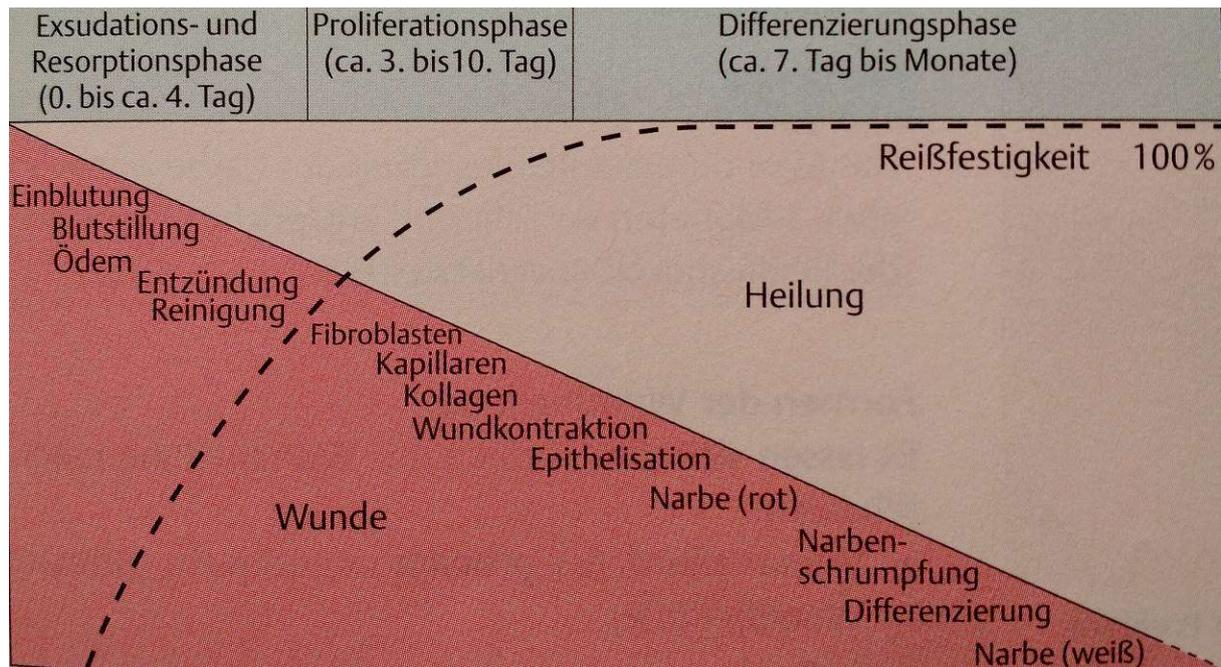


Abbildung 2: Phasen der kutanen Reparatur und Entwicklung der Narbenreißfestigkeit. Das Diagramm stellt die einzelnen Phasen der Wundheilung in ihrer zeitlichen Abfolge in Bezug zur Abnahme der Wund- und Zunahme der Heilungsfläche dar. Zudem wird die Zunahme der Narbenreißfestigkeit im zeitlichen Verlauf der Wundheilung gezeigt.⁶

Die erste, etwa acht Stunden dauernde **Exsudationsphase** dient vor allem der Hämostase. Durch den Gewebedefekt treten Blutplasma sowie Blutbestandteile aus, und es kommt zu einer Vasokonstriktion. Die anschließende Vasodilatation ist mit der Einwanderung von Thrombo- und Lymphozyten verbunden und führt zu einer ersten Reinigung der Wunde.

Daran schließt sich die etwa bis zum 4. Tag *post iniuriam* andauernde **Resorptionsphase** an. Sie ist gekennzeichnet durch das Einwandern von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sowie das Einleiten der Fibrinolyse. Es kommt zur Opsonierung und Phagozytierung von Bakterien, Abräumung des nekrotischen Gewebes sowie einer T-Zell-vermittelten Immunantwort.

Am Ende der bis zum 10. Tag andauernden **Proliferationsphase** steht das Granulationsgewebe, das durch seine Vielzahl an Kapillaren eine makroskopisch körnige (lat. *granulum*) Oberfläche besitzt.

Durch Makrophagen sezernierte Mediatoren wandern Fibroblasten aus dem umliegenden Gewebe in den Wundgrund ein und werden aktiviert und sorgen für eine erste mechanische Reißfestigkeit, die vom Defektrand aus in die Wunde einwachsende Kapillaren unterstützt wird. Weiteres Charakteristikum dieser Phase ist die Abnahme von Entzündungszellen und die Zunahme von proliferationsaktiven

Zellen wie Keratinozyten, Fibroblasten und Angioblasten. Koordiniert von Makrophagen führen sie zur Reepithelialisierung, Angiogenese und zum Gewebeverschluss.

Die letzte teilweise bis zu Monaten dauernde **Differenzierungs- oder Maturationsphase** führt zur endgültigen bindegewebigen Narbenbildung, mit anschließender Wundkontraktion und Reepithelialisierung.

Je nach Körperregion können so 50 % bis 99 % des ursprünglichen Defektes repariert werden. Zuletzt führt die Migration von umliegenden Epithelzellen zur Epithelialisierung, dabei ist das gebildete Narbengewebe zunächst rötlich-livide und steht leicht über Hautniveau. Im Laufe der Zeit gleicht es sich an und wird weißlich, da verletzte und verloren gegangene Melanozyten nicht ersetzt werden können. Das Einwachsen von Nervenendigungen führt allerdings zur Reinnervierung der verletzten Strukturen. Die Reißfestigkeit der Haut beträgt im Vergleich zur unverletzten Haut nach sieben Tagen etwa 3 %, steigt über 20 % nach drei Wochen und auf etwa 80 % nach drei Monaten.^{3,6,22}

1.3.2 Wundheilungsformen

1.3.2.1 Primäre Wundheilung

Diese Wundheilungsform kann bei zwanglos aneinanderliegenden, nicht infizierten Wundrändern oder durch Wundheilungsstörungen beeinträchtigten Wunden beobachtet werden. Durch die Nähe der beiden Wundränder kommt es zur schnellen Verschmelzung und Induzierung von Angiogenese, Granulierung und Reepithelialisierung. Insgesamt wird nur wenig Granulationsgewebe gebildet, und es kommt durch den simultanen Beginn der Epithelialisierung zur Bildung einer feinen, strichförmigen Narbe.^{3,6,22}

1.3.2.2 Sekundäre Wundheilung

Im Gegensatz zur primären Wundheilung wird diese Heilungsform bei auseinanderklaffenden, nicht adaptierten Wundrändern beobachtet. Aber auch Infektionen und Wundheilungsstörungen können zu einer sekundären Wundheilung führen. Charakteristisch sind der in 1.3.1 beschriebene Ablauf der Wundheilungsphasen, der Gewebedefekt und die prolongierte Heilungsdauer.^{3,6,22}

1.4 Einteilung der chronisch venösen Wunde

Die chronisch venöse Wunde lässt sich nach Hach et al.²⁰ in vier Stadien einteilen. Dabei ist im **Stadium I** ein chronisch venöses Stauungssyndrom mit Schwellneigung ohne Gewebenekrose festzustellen. Das **Stadium II**, die Dermatoliposklerose, ist durch eine Destruktion der Haut und des Subkutangewebes gekennzeichnet. Diese greift im **Stadium III** auch auf Teile der Faszie über, ist aber noch regional begrenzt (Dermatoliposclerosis regionalis). Dennoch kann bereits in diesem Stadium ein Kompartmentsyndrom auftreten. Das letzte **Stadium IV**, die Dermatoliposclerosis circularis oder auch chronisch venöses Kompartmentsyndrom genannt, ist durch eine zirkulär um den Unterschenkel verlaufende sklerotische Veränderung der Haut, des Subkutangewebes und der Muskefaszie mit manchmal zirkulär verlaufenden Ulzerationen gekennzeichnet. Durch ein sekundäres Lymphödem kann es zudem zur Versteifung von Sprung-, Knie- und Hüftgelenken kommen.²⁰



Abbildung 3: Stadien der chronisch venösen Insuffizienz von links nach rechts und ihre sichtbaren Folgen^{12,52}.

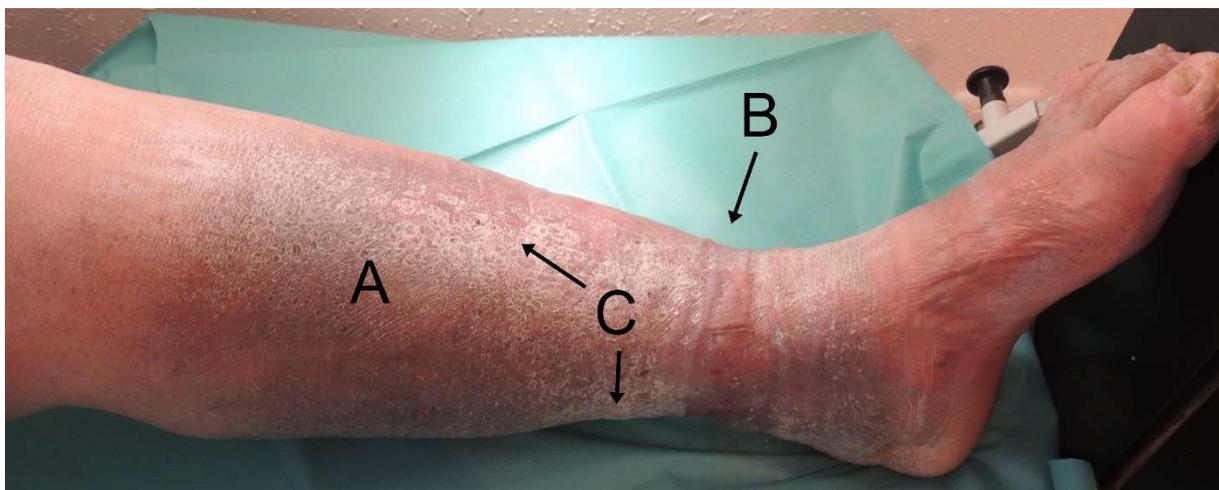


Abbildung 4: Stadium II nach Hach, Dermatoliposklerose des linken Unterschenkels. Livide Verfärbung des gesamten Unterschenkels (A), Ödeme (B) sowie Atrophie der oberflächlichen Hautschichten (C).⁴²

2 Therapeutische Verfahren

2.1 Vakuumtherapie

Der Wundgrund wird mit einem Schwamm ausgefüllt und mit einer Folie luftdicht verschlossen. Anschließend wird die Folie inzidiert und eine Vakuumpumpe aufgesetzt. Durch auf den Wundgrund negativ ausgeübten Druck wird die Durchblutung angeregt, sodass sich eine bessere Granulation erreichen lässt.^{2,66}

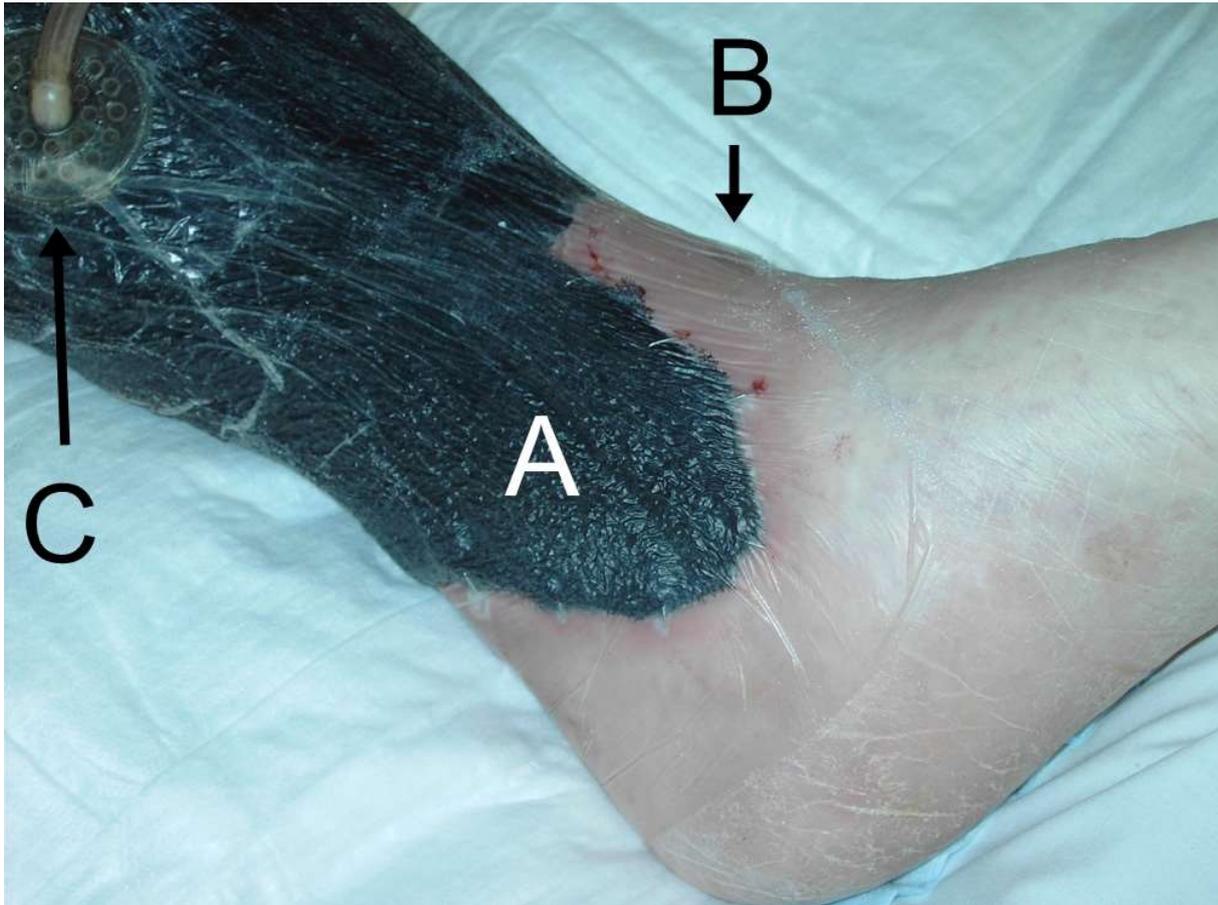


Abbildung 5: Anlage eines VAC-Verbands am linken Unterschenkel. Zu erkennen ist der schwarze Schwamm (A), luftdicht verschlossen durch transparente Folie (B). Am linken oberen Bildrand ist der Schlauch zur Vakuumpumpe zu erkennen (C)²⁵.

2.2 Plättchenreiches Fibrin

Dem Patienten werden zunächst etwa 150 ml Blut abgenommen, aus dem anschließend durch Zentrifugation PRF gewonnen wird. Dieses wird dann auf den Wundgrund appliziert und polymerisiert dort. PRF ist reich an körpereigenen Wachstumsfaktoren wie z. B. VEGF, PDGF, TGF- β 1, Thrombozyten und Fibrinogen, die die Wundheilung physiologisch stimulieren.

Fibrinogen als Vorläufer für die Bildung eines Fibrinnetzes sowie Thrombozyten sind vor allem zu Beginn der Wundheilung sehr wichtig. Letztere führen durch Ausschüttung weiterer Zyto- und Chemokine in der Anfangsphase der Wundheilung zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, die im Folgenden durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine die Aktivierung von Fibroblasten und Keratinozyten triggern. VEGF und PDGF dienen im Verlauf als Wachstumsstimuli und fördern die Epithelneubildung und Angiogenese sowie die Kollagensynthese und -ablagerung. TGF- β 1, der eine große Rolle bei der Stimulierung der Kollagensynthese spielt, ist zudem an der Verminderung der Aktivität von Proteasen beteiligt.^{1,16,24,28,31,36,40,41}



Abbildung 6: Beginnende Polymerisation des Fibrins nach Aufsprühung auf eine Wundfläche am Unterschenkel. Zu erkennen sind die leichten Höhenunterschiede, bedingt durch die dynamische Applikation mithilfe eines Sprühsystems²⁶.

2.3 Hauttransplantation

2.3.1 Spalthauttransplantation

Ist mit konservativer Therapie oder Vakuumtherapie keine ausreichende Wundheilung zu erreichen oder der Hautdefekt sehr groß, kann er durch eine Spalthauttransplantation gedeckt werden. Dazu wird dem Patienten mithilfe eines Dermatoms unter Vollnarkose ein etwa 0,1 mm bis 0,6 mm dicker Hautlappen, meistens vom Oberschenkel, entnommen. Da nur die oberflächlichen Hautschichten transplantiert werden und eine größere Schrumpfungstendenz zu erwarten ist, bleibt das kosmetische Ergebnis meist hinter dem der Vollhauttransplantation zurück.^{12,37}

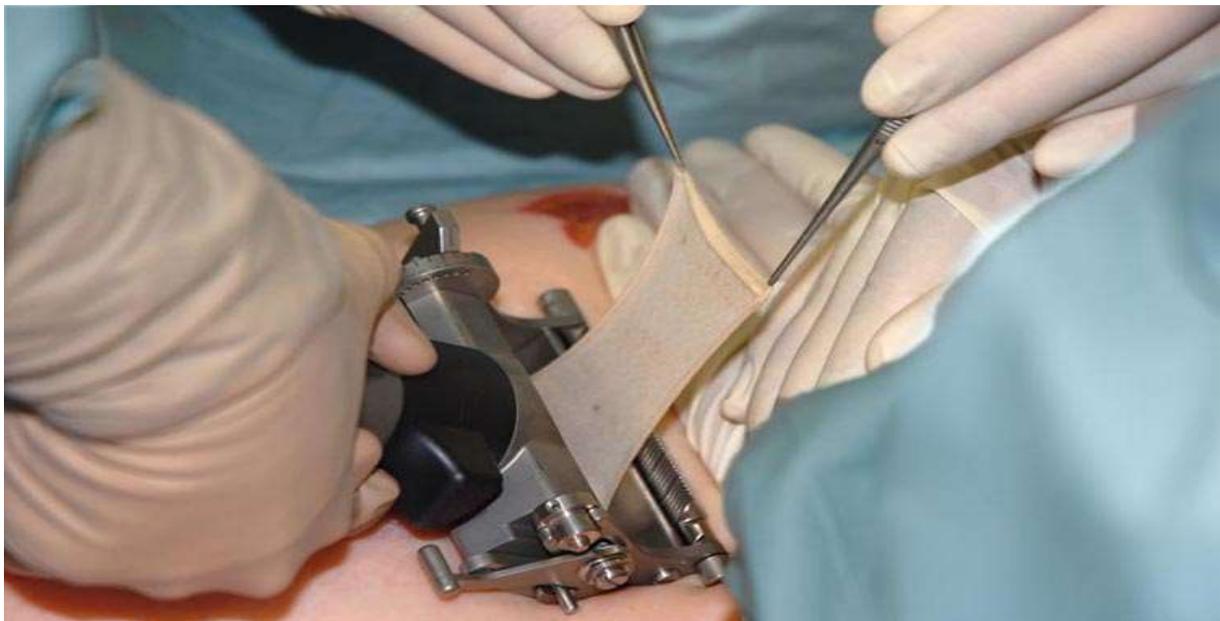


Abbildung 7: Spalthautgewinnung mit dem Dermatome. Zur besseren Abnahme wird die Entnahmestelle aufgespannt⁵⁸.

2.3.2 Vollhauttransplantation

Für kleinere Wunddefekte oder exponierte Hautareale wie z. B. das Gesicht eignet sich die Vollhauttransplantation. Dabei werden alle Hautschichten transplantiert, was zu einer geringeren Schrumpfungstendenz des Transplantats sowie einem verbesserten kosmetischen Ergebnis im Vergleich zur Spalthauttransplantation führt. Zu beachten sind das erschwerte Anwachsen des Transplantats und die Verursachung eines größeren Defekts an der Entnahmestelle.^{12,54}

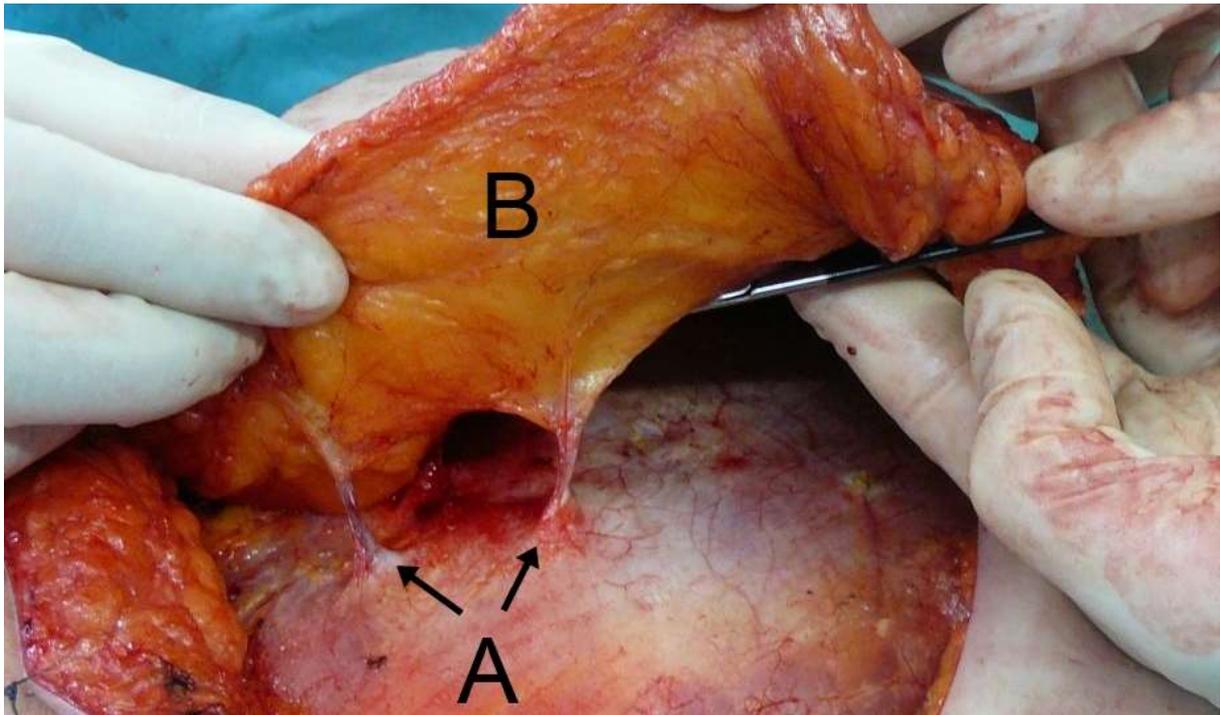


Abbildung 8: Vollhauttransplantation in Form einer Lappenplastik. Es werden alle Hautschichten entnommen. Zentral erkennbar sind zwei Gefäße (A), die den entnommenen Hautlappen (B) versorgen⁵⁵.

2.4 Amputation

Führt keine Therapie zum Abheilen des Wunddefekts, bleibt als finale Therapieoption oftmals nur die Amputation übrig, die zu hohen Beeinträchtigungen und Komplikationen beim Patienten auf der einen Seite und dadurch langfristig zu erhöhten gesundheitsökonomischen Kosten auf der anderen Seite führt.^{11,12}

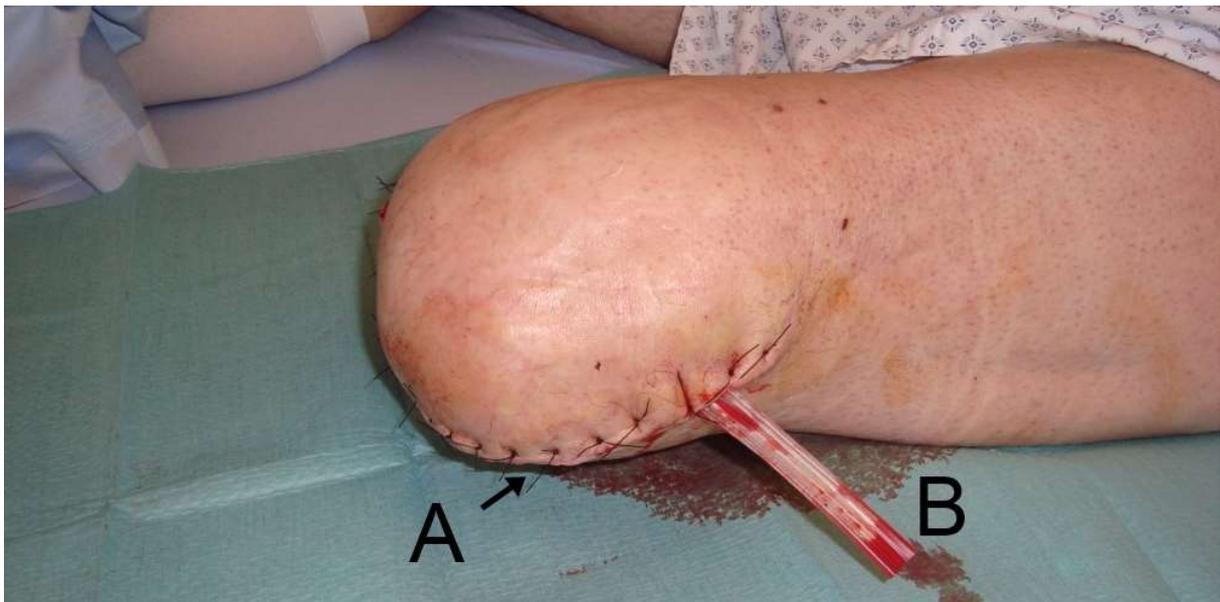


Abbildung 9: Amputationsstumpf des linken Beins nach Unterschenkelamputation. Reizlose Narbenverhältnisse (A) bei liegender Easyflow-Drainage (B)⁶⁰.

3 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Durch die übergeordnete Idee der langfristigen Entwicklung und Etablierung einer neuen Therapieoption zur Behandlung chronischer Wunden ergeben sich für diese Arbeit folgende, zentrale Fragestellungen:

- Optimierung und Anpassung der bisher verwendeten Keratinozyten-Isolierungsprotokolle:
 - Ist eine Reduktion der Größe des Hautbiopsats möglich?
 - Kann ein besseres und reproduzierbares Anwachsen der Zellen etabliert werden?
 - Ist eine Verkürzung der Kultivierungsdauer bei Minimierung des Arbeitsaufwands umzusetzen?
- Welche Zelldichte muss auf den Wundgrund appliziert werden, um ein erfolgreiches Anwachsen der Keratinozyten zu gewährleisten?
- Welche Fibrinschichtdicke muss verwendet werden, um ein erfolgreiches Anwachsen der Keratinozyten zu gewährleisten?
- Stellt die Kombination der Therapiemöglichkeiten von PRF-Applikation und Hauttransplantation in Form von Zellen eine mögliche Therapieoption zur Behandlung von chronischen Wunden dar?

4 Material und Methoden

4.1 Geräte

Bench (HS12)

Heraeus Instr. (Hanau, Dtl.)

Brutschrank (HexaCell 150)

*Thermo Fisher Scientific
(Waltham, USA)*

Deckgläser

Menzel (Burgdorf, Dtl.)

Einbettung (HistoCore Arcadia H)

Leica (Wetzlar, Dtl.)

Einmalfilter (Minisart 70 µm)

*Sartorius Stedium Biotech
(Göttingen, Dtl.)*

Elektrophoresekammer

BioRad (Hercules, USA)

(Mini PROTEAN® Tetra System)

Fast Blotter

*Thermo Fisher Scientific
(Waltham, USA)*

(Pierce G2 Fast Blotter)

Fluorometer (Qubit)

*Thermo Fisher Scientific
(Waltham, USA)*

Objektträger

Menzel (Burgdorf, Dtl.)

Mikroskop (Axiovert 135)

Zeiss (Oberkochen, Dtl.)

Mikrotom (RM 2155)

Leica (Wetzlar, Dtl.)

Six-Well

*Greiner Bio-One
(Kremsmünster, Österreich)*

Vortexer (VF2)

IKA-Werke

(Staufen im Breisgau, Dtl.)

Wasserbad

GFL (Burgwedel, Dtl.)

Zellkulturflasche (25cm², 75cm²)

Sarstedt (Nürnberg, Dtl.)

Zentrifugen

Eppendorf AG

(Centrifuge 5415R/5804R)

(Hamburg, Dtl.)

4.2 Materialien

Im Labor typischerweise verwendete Materialien wie Eppendorf-Pipetten oder Kunststoffeinmalartikel werden nicht gesondert aufgeführt.

APS	<i>Roth (Karlsruhe, Dtl.)</i>
1. Antikörper (Anti-Rex1, rabbit, polyclonal)	<i>Abcam (Cambridge, UK)</i>
1. Antikörper (Anti-Cytokeratin 16, rabbit, monoclonal)	<i>Abcam (Cambridge, UK)</i>
2. Antikörper (Goat anti-rabbit IgG, HRP conjugated)	<i>Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)</i>
Blotto-Milch	<i>Roth (Karlsruhe, Dtl.)</i>
Collagenase	<i>Roche (Basel, Schweiz)</i>
DMSO (Kryolösung)	<i>Roth (Karlsruhe, Dtl.)</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (supplementiert mit definierten Mengen an Pen./Strep., EGF und FCS)	<i>Biowest (Nuaille, Frankreich)</i>
Dulbeccos PBS	<i>Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)</i>
Entwicklerlösung (ECL Prime)	<i>GE Healthcare (Little Chalfont, Großbritannien)</i>
Eosin-Blau	<i>Merck (Darmstadt, Dtl.)</i>
Ethanol (96 %)	<i>Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)</i>
FCS	<i>Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)</i>
Gentamycin	<i>Ratiopharm® (Ulm, Dtl.)</i>
Isopropanol	<i>Merck (Darmstadt, Dtl.)</i>
Keratinocyte Growth Medium 2 (supplementiert mit definierten Mengen an Pen./Strep., EGF und CaCL ₂)	<i>PromoCel (Heidelberg, Dtl.)</i>
Mayers Hämalaun	<i>Merck (Darmstadt, Dtl.)</i>
Methanol	<i>Merck (Darmstadt, Dtl.)</i>
Penicillin/Streptomycin	<i>Thermo Fisher Scientific</i>

Protein Ladder (Color Protein Standard)	<i>(Waltham, USA)</i> <i>New England Biolab</i> <i>(Ipswich, USA)</i>
Running Buffer	<i>Bio Rad Laboratories GmbH</i> <i>(Hercules, USA)</i>
TBS	<i>Merck (Darmstadt, Dtl.)</i>
TEMED	<i>Roth (Karlsruhe, Dtl.)</i>
TGS Buffer	<i>Bio Rad Laboratories GmbH</i> <i>(Hercules, USA)</i>
Transfer Buffer	<i>Thermo Fisher Scientific</i> <i>(Waltham, USA)</i>
Tris	<i>Roth (Karlsruhe, Dtl.)</i>
Trypsin-EDTA	<i>Thermo Fisher Scientific</i> <i>(Waltham, USA)</i>
Tween 20	<i>Merck (Darmstadt, Dtl.)</i>
Xylol	<i>Merck (Darmstadt, Dtl.)</i>

4.3 Methodik

4.3.1 Keratinozyten-Isolierung

4.3.1.1 Entnahme der Haut

Nach Bewilligung des Ethikantrages (D 469/11) sowie Aufklärung und Einwilligung des Patienten wurden die Hautproben in Lokalanästhesie und unter sterilen Bedingungen entnommen. Dazu wurde der für die Hautprobe gewählte Bereich desinfiziert und mit einem handelsüblichen Lokalanästhetikum betäubt. Anschließend wurde mit einem Skalpell ein etwa 2 x 2 cm großes Hautareal entnommen. Hierbei wurde auf die Mitnahme von etwas subkutanem Fettgewebe geachtet, um sicherzugehen, dass das Stratum basale der Haut in der Probe enthalten ist. Anschließend wurde die Wunde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial versorgt. Die Proben wurden anschließend in NaCl gelagert und ins Labor transportiert.

4.3.1.2 Protokoll zur Keratinozyten-Isolierung – Version I

Für die ersten Isolierungsversuche wurde ein laborinternes Protokoll der Abteilung für Herz- und Gefäßchirurgie (Stand 01.01.2013), das zuvor zur Isolierung von Endothelzellen der Gefäßinnenwand verwendet wurde, benutzt.

Die maximal einen Tag alte und in Flüssigkeit (PBS oder NaCl) bei 4 °C gelagerte Hautprobe (je nach OP-Resektat zwischen 0,5 x 2 cm und 3 x 4 cm) wurde unter der Bench, in einer mit PBS gefüllten Petrischale, steril mithilfe von Pinzette, Schere und Skalpell vom Unterhautfettgewebe getrennt. Danach waren auf der Unterseite der verbleibenden Hautprobe kleine Poren zu erkennen. Anschließend wurde die Probe in etwa 5 x 5 mm große Stücke zerkleinert und noch einmal mit frischem PBS gewaschen. In ein 50-ml-Falcon wurden dann 10 ml 0,1%ige Collagenase-A-Lösung angesetzt. Dazu wurden 0,1 g Collagenase A abgewogen und in 10 ml dest. Wasser gelöst. Dieses wurde dann durch einen Minisart-Einmalfilter in ein neues 50-ml-Falcon steril filtriert. Dann wurden die Hautstücke hinzugegeben und für 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Alle fünf Minuten wurde das Falcon gevortext, und nach Ablauf der 20 Minuten hatte sich die Collagenase-A-Lösung milchig verfärbt und die Hautstücke waren leicht ausgefranst. Die Hautstücke wurden unter der Bench mit einer Pinzette entfernt und das Falcon anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde anschließend abgegossen und das Pellet mit 1ml DMEM+++ Medium resuspendiert und in ein 6-Well-Fach ausgesät. Um ein ausreichendes Wachstum zu gewährleisten, wurden weitere 4 ml Medium hinzugegeben, und das Well wurde dann im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

4.3.1.3 Protokoll zur Keratinozyten-Isolierung – Version II

Im Gegensatz zum Protokoll der Version I wurden die Hautstücke nach gleicher Präparation in ein Falcon mit 20 ml 0,5%iger Collagenase-A-Lösung gegeben. Dazu wurden 1 g Collagenase A abgewogen und in 20 ml dest. Wasser gegeben. Durch einen Minisart-Einmalfilter wurde die Lösung steril in ein neues 50-ml-Falcon filtriert, und es wurden zudem 2,5 µl Gentamycin hinzugegeben. Die Gentamycin-Konzentration betrug dabei 5 µg/ml. Das Falcon wurde dann über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Falcon unter der Bench in eine Petrischale abgegossen und die Hautstücke noch einmal mithilfe einer sterilen Schere, Pinzette und eines Skalpells in etwa 2 x 2 mm große Stücke zerkleinert. Die Stücke wurden anschließend in ein neues 50-ml-Tube mit 5 ml Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) gegeben. Dabei war auf eine vollständige Bedeckung der Hautstücke mit Trypsin zu achten. Bei 37 °C wurde das Falcon für 20 Minuten im Wasserbad inkubiert und dabei alle fünf Minuten kräftig geschüttelt und gevortext, um die Keratinozyten aus dem Zellverband zu lösen.

Durch Zugabe von 10%igem FCS (2 ml FCS/1 ml Trypsin) wurde die Reaktion gestoppt und die Lösung danach durch einen Cell-Strainer (70 µm Porengröße) in ein neues 50-ml-Falcon überführt. Dadurch sollten zu große Zellen und nicht gewollte Bestandteile ausgesiebt werden. Anschließend wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml Keratinozyten-2-Growth-Medium resuspendiert und in ein oder mehrere 6-Wells ausgesät sowie mit weiteren 4 ml Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

4.3.1.4 Protokoll zur Keratinozyten-Isolierung – Version III

Das maximal zwölf Stunden alte und in Flüssigkeit (PBS, NaCl) aufbewahrte Haut-Biopsat wurde, wie in Version II, im Labor steril verarbeitet. Anschließend wurde die Hautprobe direkt in 2 x 2 mm große Stücke geschnitten und in ein Falcon mit 20 ml 0,5%iger Collagenase-A-(Roche-)Lösung gegeben. Das Falcon wurde dann für 60 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, um eine möglichst hohe Enzymaktivität zu erreichen.

Anschließend wurde die Collagenase-Lösung abgekippt, und die Hautstücke wurden in ein neues mit 5 ml Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) gefülltes 50-ml-Falcon überführt. Das neue Falcon wurde wiederum für 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und alle fünf Minuten kräftig gevortext, um die Keratinozyten zusätzlich durch mechanische Kraft zu lösen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10%igem FCS gestoppt (2 ml FCS/1 ml Trypsin). Mit einer sterilen Pinzette wurden die verbliebenen, deutlich enzymatisch veränderten Hautstücke unter der Bench aus dem Falcon entfernt und entsorgt. Das Falcon wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur und bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde dann mit 1 ml Keratinozyten-Growth-Medium resuspendiert, in ein 6-Well ausgesät, mit weiteren 4 ml Medium aufgefüllt und anschließend im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Um die bestmögliche Grundlage für das Anwachsen der Keratinozyten zu finden, wurden zudem versuchsweise Aussaat und Wachstum der Zellen auf normalen 6-Wells mit dem mit Fibronektin beschichteten Wells verglichen.



Abbildung 10: Zellisolierung unter der Bench – Präparation des Unterhautfettgewebes mit Schere und Pinzette. Die Probe liegt zum Schutz vor Austrocknung und zur Reinigung in PBS, das durch Blutbeimengungen der Probe rötlich verfärbt ist.

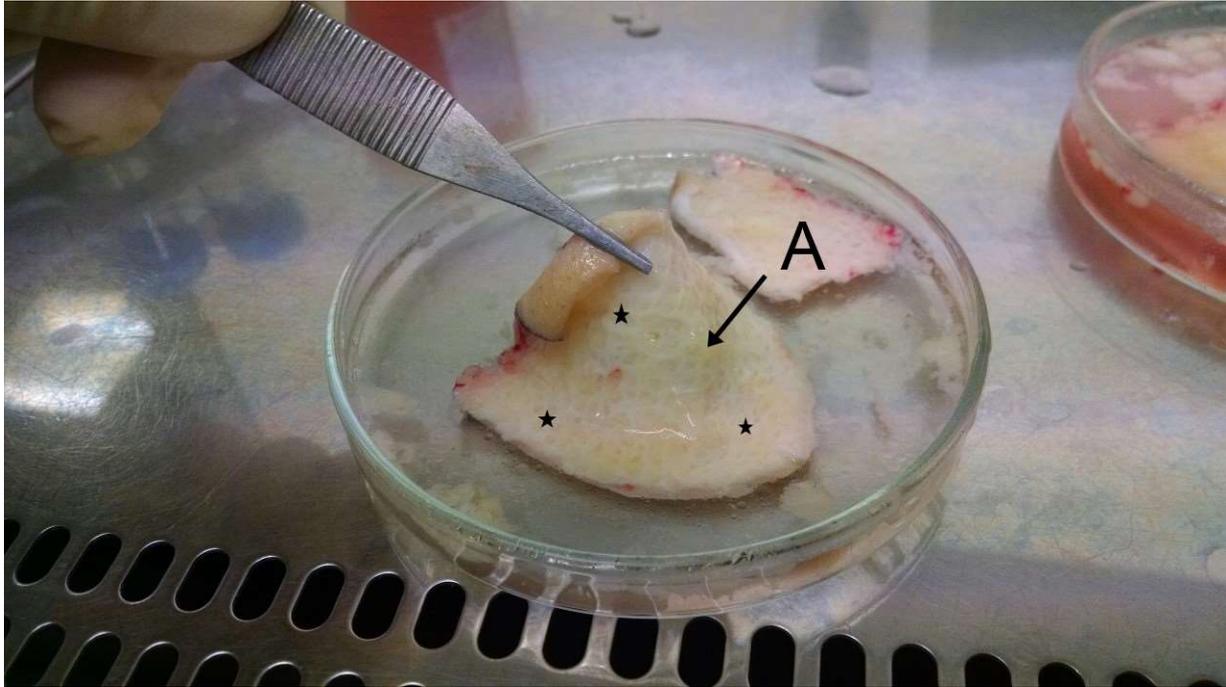


Abbildung 11: Blick auf die Unterseite der Hautprobe. Zu erkennen sind die Poren der papillären Dermis (Sterne) sowie leicht gelblich verbliebenes subkutanes Fettgewebe (A).

4.3.1.5 Keratinozytenkultur

Etwa vier bis fünf Tage nach Aussaat der Zellen wurde ein erster vorsichtiger Mediumwechsel unternommen. Dazu wurden mit einer 1000- μ l-Eppendorf-Pipette vorsichtig 3-4/5 ml Medium abgezogen und durch neues ersetzt. Nachdem unter dem Mikroskop eine 90%ige bis 95%ige Konfluenz der Zellen zu beobachten war, wurden diese passagiert.

Dazu wurde zunächst das Medium abgezogen bzw. abgekippt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 5 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und diese für 15 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Waren nach Ablauf dieser Zeit nicht alle Zellen vom Boden gelöst, wurde bis zum vollständigen Ablösen in kurzen Intervallen weiter inkubiert. Das Trypsin-Zell-Gemisch wurde anschließend in ein 50-ml-Falcon überführt und zur Inaktivierung 15 ml 10%iges FCS hinzugegeben. Danach wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die am Boden des Tubes befindlichen Zellen mit 1 ml Keratinozyten-2-Growth-Medium resuspendiert sowie anschließend auf die gewünschte Anzahl an 6-Well-Fächern, T-25- oder T-75-Flaschen aufgeteilt. Nach Auffüllen der Behälter auf das erforderliche Volumen von Medium (~ 5 ml, ~ 15 ml, ~ 25 ml) war die Passagierung abgeschlossen.

4.3.1.6 Kryokonservierung von Keratinozyten

Zur Kryokonservierung der Keratinozyten wurde zunächst das gleiche Vorgehen wie bei der Passagierung gewählt. Nach Zentrifugation der Zellen und Abgießen des Überstandes wurden die Zellen mit 1,8 ml DSMO/FCS resuspendiert und in ein Kryo-Tube überführt. Um ein zu schnelles und schädliches Abkühlen der Zellen zu verhindern, wurden die Tubes in eine Schaumstoffbox gelegt und bei minus 80 °C eingefroren. Nach zwei bis drei Tagen konnten die Zellen dann in die Stickstoff-Kühlung überführt werden.

Zum Auftauen der Zellen wurde das gewünschte Tube bei Raumtemperatur erwärmt, bis sich der Inhalt verflüssigte. Anschließend wurde der komplette Inhalt mit Medium resuspendiert und ausgesät.

4.3.2 Anfertigung des Lysats

Die Anfertigung eines Zelllysats dient der Zerkleinerung und Auflösung der Zelle in ihre einzelnen Bestandteile. Diese können anschließend mithilfe von weiteren molekularbiologischen Verfahren analysiert werden. Während des kompletten Vorgangs der Zelllyse müssen die Proben auf Eis gekühlt werden, um zu vermeiden, dass Proteine zerfallen. Um genug Material zu erhalten, wurde pro Lysat mindestens eine volle T-75-Flasche verwendet.

Zur weiteren Vorbereitung wurde zum einen die Zentrifuge auf 4 °C heruntergekühlt und zum anderen eine genügende Anzahl an auf Eis gekühlten Tubes mit PBS/C (pro Lysat ein Tube) sowie PBS/C+T (pro Lysat etwa 200-300 µl) bereitgestellt. Danach wurden die Zellproben aus dem Brutschrank geholt.

Im ersten Arbeitsschritt wurde zunächst das Medium aus der Zellkulturflasche verworfen. Anschließend wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen, das ebenfalls verworfen wurde. Der verbliebene Rest 1x PBS in der Flasche wurde mithilfe einer Pipette abgesaugt und dann verworfen.

Anschließend wurden 1ml PBS/C hinzugefügt und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Durch Schräghalten der Flasche sammelte sich das PBS/C in einer Ecke, und es ließen sich dort einzelne größere losgelöste Zellverbände erkennen. Anschließend überführte man das PBS/C mit den darin befindlichen Zellen in ein beschriftetes 1,5-ml-Tube und zentrifugierte dieses für zehn Minuten bei 13200 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet je nach Größe

mit 200 bis 300 µl PBS/C+T (bei einer vollen T-75-Flasche 300 µl) resuspendiert. Dann wurde das weiterhin auf Eis gekühlte Tube mithilfe eines Ultraschallstabs dreimal für zehn Sekunden sonifiziert. Nach jedem Sonifizieren wurde der Ultraschallstab mit Isopropanol gereinigt und das Tube gekühlt. Nach dem dreimaligen Sonifizieren wurde das Tube für 30 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend erneut dreimal für zehn Sekunden sonifiziert.

Zum Abschluss der Zellysierung wurde das Tube für zehn Minuten bei 13200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war der Überstand das Lysat. Dieses wurde in ein neues, beschriftetes Eppendorf-Tube überführt. Zur Lagerung wurde das Lysat bzw. wurden die Lysate bei minus 20 °C eingefroren. Nachfolgend wurde die Proteinkonzentrationsbestimmung mithilfe einer Qubit Messung durchgeführt.

4.3.3 Proteinkonzentrationsmessung

Die Qubit-Messung ist ein photometrisches Verfahren, das die durch die Probe verursachte Lichtbrechung misst und in eine Konzentration umrechnet.

Die Proteinkonzentrationsmessung mithilfe des Qubit-2.0-Fluorometers, kurz Qubit-Messung, diente der Bestimmung des Proteingehalts in den bisher nicht gemessenen Lysatproben. Mit der ermittelten Konzentration in µl/µg wurde dann das Mischungsverhältnis für die spätere Geltasche des Western Blot ermittelt. Dazu wurde die Proteinkonzentration auf 40 µg Probe aufgerechnet und mit 3*Lämmli-Puffer sowie PBS/C+T versetzt.

Für den kompletten Messvorgang wurden die Originalreagenzien sowie Qubit Assay Tubes verwendet. Vor der Messung wurden die bei minus 20 °C gelagerten Lysate auf Eis aufgetaut, ebenso wurden die bei 4 °C im Kühlschrank liegenden Fluorometer-Standards 1-3 dort zwischengelagert. Im Gegensatz dazu wurden die Färbelösung (Qubit Protein Reagent, lichtgeschützt) sowie der Qubit-Protein-Buffer bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Danach wurde die Working Solution im Verhältnis 1:200 angesetzt, und anschließend wurden die Proben und die drei Standards vorbereitet. Beide wurden jeweils in Qubit Assay Tubes pipettiert. Für die Proben wurden 199 µl Working Solution sowie 1 µl Probe in ein Assay Tube dazugegeben und für die Standards je 190 µl Working Solution mit 10 µl Standard 1, 2 oder 3. Die Berechnung des

Ansatzes der Working Solution lässt sich am einfachsten anhand eines Rechenbeispiels verfolgen.

Rechenbeispiel:

Anzahl Proben: 2 → verdoppeln = 4

Anzahl Standards: 3

= 7

+ 1 (für genügend Volumen)

8

8*200 µl = 1600 µl (Qubit Prot. Buf.) – 8 µl (Abzug aufgrund der Zugabe des Farbreagens)

= 1592 µl Qubit Protein Buffer

+ 8 µl Qubit Protein Reagent (Farbstoff)

= 1600 µl Working Solution

Die Tubes wurden verschlossen und für zwei bis drei Sekunden gevortext. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurde die Qubit-Proteinkonzentrationsmessung durchgeführt. Dafür wurde am Gerät die Proteinmessung gestartet und zunächst eine Standardkurve erstellt. Dazu wurden die Standards 1-3 der Reihe nach eingelesen. Anschließend wurden die Proben gemessen. Dabei war darauf zu achten, dass zwischen den einzelnen Messungen ein Abstand von 30 Sekunden lag. Das Ergebnis wurde dann im Gerät auf 1 µg/µl umgerechnet.

Nach Abschluss aller Messungen wurden die Lysate für den Western Blot vorbereitet. Dazu wurde die gemessene Proteinkonzentration auf 40 µg aufgerechnet, bei einem späteren Gelprobenvolumen von 30 µl für den Western Blot. Dazu wurde die berechnete Menge an Lysatprobe in µl mit 10 µl 3*Lämmli-Puffer versetzt und dann mit PBS/C+T auf 30 µl aufgefüllt.

Qubit-Messung Probe 1:

3,12 µg/µl	2,98 µg/µl
------------	------------

Mittelwert = **3,05 µg/µl**

Aufrechnung der Lysatprobe mit einer Konzentration von 40 µg auf ein Gesamtvolumen der Probe von 30 µl = 40 µg: **3,05 µg/µl**

13,1 µl Probe	10 µl 3x Lemmli-Puffer	6,9 µl PBS/C+T
---------------	------------------------	----------------

4.3.4 Gel gießen

Für die Gelelektrophorese wird ein Polyacrylamid-Gel (SDS-Gel) benötigt, das in verschiedenen Konzentrationen angefertigt werden kann. Durch die höhere oder niedrigere Konzentration teilen sich die Proteine in der Gelelektrophorese unterschiedlich schnell auf.

Das komplette Gel wurde unter einem Abzug gegossen. Zunächst wurden alle benötigten Materialien sowie der Arbeitsplatz für einen reibungslosen Arbeitsablauf vorbereitet. Anschließend wurden in zwei unterschiedlichen 50-ml-Falcons nach fester Reihenfolge die Ansätze für das Running-Gel (Trenn-Gel) sowie das Stacking-Gel (Sammel-Gel) gegeben. Die unterschiedlichen Mengen für die verschiedenen Gelkonzentrationen wurden im Internet⁴⁹ abgerufen. Die Verwendung von 1,5 M oder 1 M Tris-Puffer pH 8,8 , 0,5 M oder 1 M Tris-Puffer pH 6,8 sowie APS 20 % oder 10 % spielte für die Qualität der Gele keine Rolle. Für ein 10 %-SDS-Gel, wie es standardmäßig für die Western Blots zum Keratinozytennachweis verwendet wurde, wurden folgende Mengen pipettiert:

Running- und Stacking-Gel wurden hierbei gleichzeitig angefertigt.

Substanz	Trenn-Gel	Sammel-Gel
d.H ² O	3,8 ml	2,9 ml
10 % SDS	80 µl	50 µl
1 M/1,5 M Tris-Puffer pH 8,8	2 ml	-
0,5 M/1 M Tris-Puffer pH 6,8	-	1,25 ml
Acrylamid	2ml	0,75 ml

Anschließend wurden zum Ansatz für das Trenn-Gel 8 µl TEMED und 80 µl APS 10 %/20 % gegeben. Nach vorsichtigem Schütteln wurde der Inhalt dann zügig mit einer Transferpipette in den Glaseinsatz gegeben (etwa bis 1 cm unter den Rand) und mit Isopropanol aufgefüllt. Nach Polymerisation des Gels wurde das Isopropanol abgegossen, und die Rückstände wurden mit Whatman-Papier aufgesaugt.

Danach wurden zum Ansatz des Sammel-Gels 5 µl TEMED und 50 µl APS 10 %/20 % gegeben und nach vorsichtigem Schwenken mithilfe einer neuen Transferpipette bis zum oberen Rand in den Glaseinsatz gegeben (oberhalb des erhärteten Trenn-Gels). Anschließend wurde zügig ein Kamm eingesetzt, um die Geltaschen zur späteren Beladung des Gels zu bilden.

Das fertige SDS-Gel wurde zur Aufbewahrung bei 4 °C im Kühlschrank in ein angefeuchtetes Papier gewickelt und in eine beschriftete Plastiktüte gegeben.

4.3.5 Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Molekülgröße in kDa durch unterschiedliche Wandergeschwindigkeit im angelegten elektrischen Feld. Leichte Proteine wandern dabei schneller als größere Proteine, sodass die Proben der Größe nach aufgetrennt werden.

Dazu wurden die zuvor bei minus 20 °C eingefrorenen, fertig vorbereiteten Zell-Lysate bei 95 °C für fünf Minuten aufgetaut. Um ein unwillkürliches Platzen der Tubes zu verhindern, wurden diese zuvor mit einer Nadel angestochen. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert, damit sich die gesamte Zellprobe am Boden befand.

Die Trägermatrix (SDS Page/SDS Gel = Polyacrylamid-Gel) wurde anhand der zu erwartenden Proteingröße ausgesucht. Dabei wurden für große Proteine niedrige Gel-Konzentrationen gewählt und umgekehrt. Für den Nachweis der kultivierten Keratinozyten wurden 10%ige, selbstgegossene Gele verwendet. Nach Einspannung in die Gel-Kammer wurde zunächst diese und dann die komplette Blotting-Kammer mit Pufferlösung befüllt. Anschließend wurden die in der Trägermatrix befindlichen Geltaschen mit den Proben befüllt.

Dabei kam in die erste Tasche die Protein-Ladder (10 µl). Diese teilte sich je nach verwendetem Hersteller nach bestimmten genormten kDa-Größen auf und diente später durch ihre fest definierten Bandengrößen als Orientierung für die aufgetragenen unbekanntenen Proben. In die nachfolgenden Taschen wurden dann jeweils ca. 30 µl Probe gegeben. Nach Anlage eines konstanten Stroms von ca. 25 mA bis 30 mA wanderten die geladenen Proteine in Richtung Pluspol.

In einem nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine, die sich je nach Molekülgröße mehr oder weniger weit bewegt hatten, mithilfe des Western Blots sichtbar gemacht.

4.3.6 Western Blot

Der Western Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Dabei werden die durch Gelelektrophorese nach Molekülgröße aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen (Blotting), mit einem Antikörper inkubiert und anschließend mithilfe von Fototechnik sichtbar gemacht.

Zur Beschleunigung des Blotting-Vorgangs wurde bei den Western Blots zum Keratinozytennachweis auf den Fast Blotter „Pierce G2“ der Marke Thermo Scientific zurückgegriffen. Er verkürzt den normalen Blotting-Vorgang von zwei Stunden auf etwa zehn Minuten.

Kurz vor Beendigung der Gelelektrophorese erfolgten die Vorbereitungen für das „Fast Blotting“. Dazu wurde eine Plastikwanne mit etwa 200 ml 1-Step Transfer Buffer befüllt. Pro Gel, das geblottet wurde, wurden vier Lagen Western-Blotting-Filterpapier (7 x 8,4 cm) und eine zuvor in Methanol gelegte und dadurch aktivierte PVDF-Membran benötigt. Das Filterpapier sowie die Membran wurden mindestens für fünf Minuten in die Plastikwanne gelegt, um ein Gleichgewicht zwischen dem in der Plastikwanne befindlichen und dem in das Papier und die Membran aufgenommenen Transfer Buffer herzustellen. Anschließend wurde die Kassette beladen, dabei war der Boden die Anode bzw. der Pluspol. Zunächst wurden zwei Papiere aus der Plastikwanne auf die Unterseite der Kassette gelegt. Darauf wurde danach die aktivierte Membran, ebenfalls aus der Plastikwanne, gelegt. Dann wurde das Gel aus der Elektrophorese-Kammer und zum Schluss wurden zwei weitere Lagen Papier aus der Wanne platziert. Während des gesamten Vorgangs wurde darauf geachtet, dass die Papiere sowie die Membran nicht austrockneten. Um ein sauberes Blotting-Ergebnis zu gewährleisten, war auf das enge Aneinanderliegen der verschiedenen Schichten zu achten. Dann wurde die Oberseite, die als Kathode oder Minuspol fungiert, aufgesetzt, und die komplette Kassette wurde anschließend in den Fast Blotter geschoben.

Am Gerät selbst wurden dann die gewünschten Einstellungen vorgenommen. Es wurden stets die vom Hersteller vorgegebenen Pre-Programmed Methods benutzt, da das Blotting-Ergebnis zufriedenstellend war und keinerlei eigene Einstellungen nötig machte. Es wurde vornehmlich das „Mixed Range MW“-Programm für die Keratinozyten-Blots verwendet. Nach Beendigung des Blottens ertönte ein akustisches Signal, und die Kassette wurde aus dem Gerät entfernt und geöffnet.

Anschließend wurde wie beim normalen Western Blot vorgegangen. Die fertig geblottete Membran wurde umgehend zweimal kurz in dest. Wasser gewaschen. Auch hier wurde darauf geachtet, dass die Membran nicht austrocknet.

Anschließend wurde die Membran einmal in TBS-T gewaschen. Um die Membran zu blockieren und damit ein Verwaschen zu verhindern, wurde sie für eine Stunde bei Raumtemperatur in frisch angesetzter 5%iger Blotto-Milch auf den Rüttler gelegt.

Danach wurde der erste Antikörper angesetzt. Zur Berechnung des Verdünnungsansatzes war die Herstellerangabe zu beachten (mono- und polyklonal jeweils in 5%iger Blotto-Milch).

Für die Western Blots dieser Arbeit wurden folgende Antikörper-Ansätze gewählt:

α -Cytokeratin 16 als 1. AK: 1:5000 und goat α -rabbit als 2. AK: 1:5000

α -rex als 1. AK: 1:1000 und goat α -rabbit als 2. AK: 1:20000

Die Membran wurde aus dem Rüttler genommen und zusammen mit dem ersten Antikörper-Ansatz in ein 50-ml-Falcon gegeben. Anschließend wurde dieses über Nacht bei 4 °C mit kreisenden Bewegungen im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Blot aus dem Kühlschrank genommen und dreimal für zehn Minuten in TBS-T gewaschen. Währenddessen wurde der zweite Antikörper angesetzt.

Der zweite Antikörper wurde mit der Membran in eine Schale und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Rüttler gegeben.

Durch Abkippen des zweiten Antikörpers und dreimaligem Waschen für eine Stunde in TBS-T wurde die Inkubation beendet. Nun erfolgte die Detektion der Banden.

Für die Membran wurde eine durchsichtige Plastikhülle (zurechtgeschnittene Klarsichtfolie) vorbereitet und die Membran auf die Innenseite der Hülle gelegt. Sofort danach wurde der kurz zuvor angefertigte Ansatz der ECL-Solution (500 μ l Solution A und 500 μ l Solution B) aufpipettiert und anschließend für zwei bis fünf Minuten einwirken gelassen. Durch vorsichtiges, aber dennoch kräftiges Ausstreichen von innen nach außen wurde das restliche ECL Prime entfernt. Die Plastikhülle wurde dann in der Detektionskassette positioniert.

Die Detektionskassette wurde geöffnet und der ECL Film vorsichtig auf die Membran gelegt. Anschließend wurde die Kassette zügig geschlossen und die Entwicklungszeit gestoppt (1 sec. bis fünf bis zehn Minuten). Nach Ablauf der Zeit wurde der Film aus der Kassette entnommen und entwickelt. Je nach Ergebnis wurde die Entwicklungszeit variiert.

Der entwickelte Film wurde zur besseren Orientierung noch einmal auf den Blot gelegt, um die Protein-Ladder einzuzeichnen. Anschließend wurden die detektierten Banden mit der Protein-Ladder verglichen, um einzuschätzen, bei welcher kDa-Größe diese lagen. Das Ergebnis wurde dann mit den spezifischen Herstellerangaben jedes Antikörpers verglichen, um zu ermitteln, ob es sich um eine

korrekt detektierte Bande handelte oder um ein falsch positives Ergebnis durch eine eventuelle Verunreinigung oder positive Kreuzreaktion.

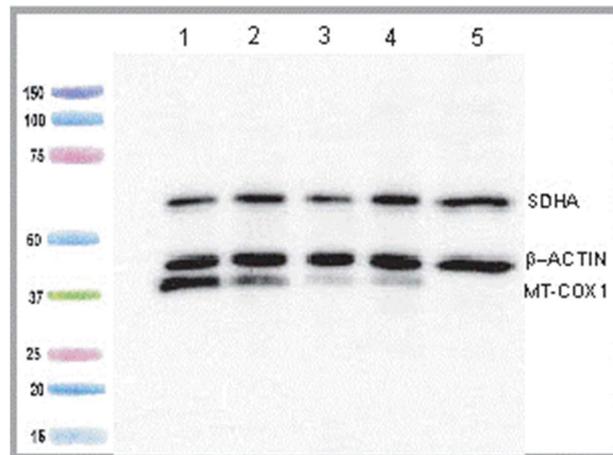


Abbildung 12: Beispiel eines Western Blot nach Entwicklung. Die Abbildung zeigt die Protein-Ladder (links, farblich) mit von unten nach oben ansteigenden kDa-Größen sowie verschiedene positive Banden. Verwendet wurden dabei drei verschiedene Antikörper (SDHA, β -Actin und MT-COX1). Mithilfe der Protein-Ladder können diese in ihrer kDa-Größe eingeschätzt werden.

4.3.7 Anfertigung der histologischen Präparate

4.3.7.1 Entwässerung

Um die kultivierten Patchproben für einen histologischen Schnitt vorzubereiten, wurden sie mittels 4%igem Formalin fixiert und anschließend entwässert. Dazu wurden sie in einem 15-ml-Falcon bei Raumtemperatur für 24 Stunden vollständig mit gepuffertem Formalin umgeben. Danach wurden sie durch Überführen und Durchlaufen einer in steigender Alkoholkonzentration angeordneten Gefäßreihe entwässert. Die entwässerten Proben wurden dann bis zur Paraffin-Einbettung in Plastikkassetten aufbewahrt.

4.3.7.2 Paraffin-Einbettung

Um die Patchproben histologisch zu schneiden, wurden sie nach der Entwässerung in ein geeignetes Medium eingebettet.

Die Patchproben wurden dazu in vorgewärmte Metallschälchen überführt, damit das flüssige Paraffin nicht vorzeitig erhärtet. Für das Gelingen eines möglichst dünnen, gleichmäßigen Schnitts wurden die Patchproben in gleicher Ausrichtung eingebettet. Bei zufriedenstellender Positionierung wurde das komplette Metallschälchen mit Paraffin aufgefüllt und zum Erhärten auf eine Kühlplatte (minus 20 °C) gestellt.

Um eine gleichmäßige Ausformung des Paraffinblocks zu erreichen, wurde nach wenigen Minuten noch einmal Paraffin hinzugegeben.

4.3.7.3 Gewebeschnitte am Mikrotom

Um eine einheitliche, glatte Schnittfläche zu erreichen, wurde der Paraffin-Block zu Beginn in größerer Mikrometerdicke angeschnitten (15 µm). Anschließend wurde die Schnittdicke je nach Ausgangsmaterial auf etwa 3 µm bis 5 µm reduziert, um eine möglichst geringe Anzahl von Zellschichten anzuschneiden.

Die angefertigten Schnitte wurden in ein kaltes Wasserbad überführt, um eventuelle Überlappungen auszugleichen. Zufriedenstellende Schnitte wurden dann in ein mit destilliertem Wasser befülltes und beheiztes Wasserbad überführt, sodass sich die Schnitte durch die Wärme glattzogen. Nach Trocknung wurden sie in einen Objektträgerkasten überführt.

4.3.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Die H.E.-Färbung ist eine allgemein verwendete Übersichtsfärbung. Durch die Kombination von zwei Farbstoffen (Hämatoxylin/rot und Eosin/bläulich-violett) entsteht die typisch rötlich-bläulich-violette Färbung.

Für die Färbung wurde schrittweise von oben nach unten wie folgt vorgegangen (verändert nach Lang 2013)³⁰:

Histo-Schnitte in Xylol, entparaffinieren in Xylol	→ 3 x 10 Min.
Absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %)	→ Je 5 Min.
Aqua dest.	→ 5 Min.
Mayer's Hämalaun-Lösung	→ 3-5 Min.
Bläuen der Schnitte (unter fließendem Leitungswasser)	→ 20 Min.
Eosin-G-Lösung 1 %	→ 3-5 Min.
Aqua dest.	→ Kurz + 2 Min.
Aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %)	→ Je 2 Min.
100 % Alkohol	→ 2 x 5 Min.
Xylol	→ 3 x 5 Min.

Mit Eukit eindecken.

4.4 Keratinozyten-Applikation im Co-Delivery-Verfahren

Nach Entnahme der Hautprobe vom Patienten und anschließender Kultivierung im Labor über drei bis vier Wochen wurden zwei 95%ig konfluente T-75-Flaschen für die Applikation benutzt. Dazu werden die Zellen mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und anschließend mit 3 ml Keratinozyten-Growth-Medium resuspendiert.

Das für die Co-Applikation notwendige Fibrin (PRF) wurde aus 150 ml Spenderblut gewonnen, aus dem etwa 5 ml Fibrin extrahiert werden können.

Vor der Beladung der Applikationskammer mit PRF, Zellen und einem pH-Stabilisator wurden die Zellen und das Fibrin auf das gleiche Volumen gebracht. Sind z. B. 4,5 ml Fibrin vorhanden, wurden noch einmal 1,5 ml Keratinozyten-Growth-Medium zu den Zellen hinzugegeben.

Dann wurde die Kammer mit den drei Komponenten beladen, und das System wurde gestartet. Um ein gleichmäßiges, pH-stabiles Gemisch zu erhalten, wird zunächst ein automatisch ablaufender Kalibrierungsprozess gestartet, der durch das Aufsprühen auf einen pH-Teststreifen überprüft wurde. Ändert sich die Farbe des Papiers nicht mehr, ist der Vorgang abgeschlossen. Nun konnten die Zellen im Co-Delivery-Verfahren mit PRF auf einen Patch oder Wundgrund appliziert werden.

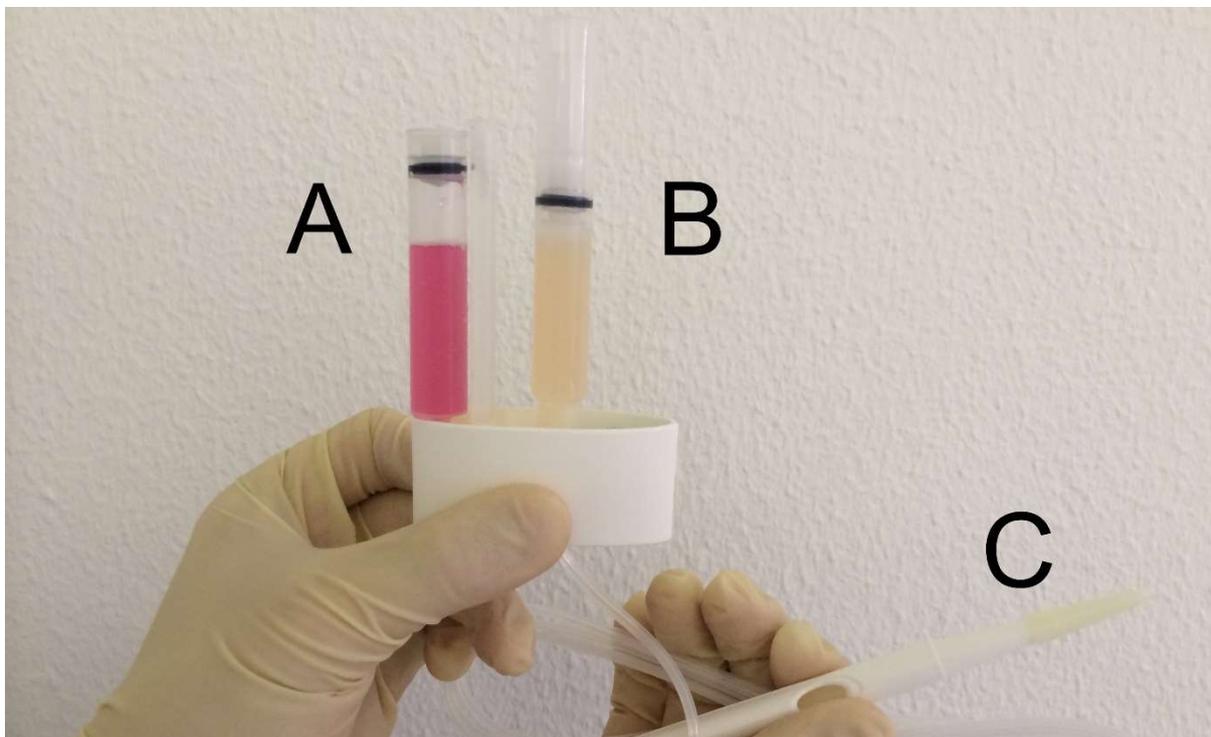


Abbildung 13: Beladung der Sprühkammer mit Keratinozyten (A) und PRF (B). Es ist der Applikations-Stift (C) zu erkennen, mit dem ein gezieltes und gleichmäßiges Auftragen ermöglicht wird.



Abbildung 14: pH-Teststreifen nach Abschluss des Kalibrierungsprozesses. Nach anfänglich hellblauer und ungleichmäßiger Verteilung (links vom dunkelblauen Areal), lässt sich eine gleichmäßige und dunkelblaue Färbung erkennen (rechts).

4.5 Klinische Anwendung der Keratinozytentransplantation

	Patient 1	Patient 2
Alter	86	99
Geschlecht	Weiblich	Weiblich
Vorerkran.	Terminale Niereninsuffizienz <ul style="list-style-type: none"> • Dialysepflichtigkeit • Renale Anämie • Sekundärer HPT Diabetes mellitus <ul style="list-style-type: none"> • Diabetische Retinopathie • Diabetische Polyneuropathie 3-Gefäß-KHK <ul style="list-style-type: none"> • Z.n. STEMI • Mönckeberg-Arteriosklerose • pAVK beidseits Arterielle Hypertonie Restless-Legs-Syndrom Hyperurikämie Hypothyreose bei Z.n. Thyreodektomie	CVI Niereninsuffizienz Stadium III Fersendekubitus °III re. Arterielle Hypertonie Demenzielles Syndrom

Beide Patienten wiesen ein Ulcus im Stadium II nach Hach auf.

Patient 2 wurde, bei Verschlechterung der Wundverhältnisse zwölf Tage nach einer bereits erfolgten Behandlung mit Hospitationsdauer von 31 Tagen, erneut aufgenommen.

Den Patienten wurden nach Aufklärung und Einverständnis in Lokalanästhesie 2 x 2 cm Hautbiopsien vom Unterschenkel entnommen. Diese wurden anschließend nach dem Keratinozyten-Isolierungsprotokoll 3 behandelt. Nach 19 (Patient 1) bzw. 23 (Patient 2) Tagen standen jeweils zwei 95%ig konfluente T-75-Flaschen zur Verfügung.

Aus dem Wundgrund der Patienten wurde zwei Tage vor dem Sprühversuch ein Abstrich entnommen, um eine Infektfreiheit der Wunde sicherzustellen. Zudem war bei beiden Patienten am Wundrand bereits eine beginnende langsame Epithelialisierung zu erkennen.

Die Zellen und das Applikationssystem wurden, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, vorbereitet.

Die Applikation der Zellen im Co-Delivery-Verfahren erfolgte auf Stationsebene. Dazu wurde das Bein auf eine Wundunterlage gelegt und der Verband entfernt. Nach Inspizierung der Wunde wurden etwa 5 ml Fibrin und 5 ml Keratinozyten-Medium-Gemisch auf den Wundgrund appliziert. Dabei wurde visuell auf eine gleichmäßige Verteilung der Fibrin-Zell-Matrix geachtet. Die Matrix trocknete für fünf Minuten an der Luft und wurde mit Mepitel® abgedeckt sowie anschließend normal verbunden. Zusätzlich wurde die gesprühte Fibrin-Zell-Matrix im Labor kultiviert, um das Zellwachstum gleichzeitig unter Laborbedingungen zu untersuchen. Ein vorsichtiger Verbandswechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Bei Patient 1 erfolgte nach sechs Tagen ein weiterer Sprühversuch, um den Zellgehalt auf dem Wundgrund zu erhöhen. Bei Patient 2 war sieben Tage vor dem Sprühversuch bereits PRF ohne Keratinozyten aufgesprüht worden. Der Progress der Wundheilung wurde im Anschluss durch Fotodokumentation und regelmäßige Kontrolle der Verkleinerung der Wundfläche objektiviert und dokumentiert.

5 Ergebnis

5.1 Etablierung und Optimierung der Keratinozytenkultur

Um die Isolierung und Kultivierung von Keratinozyten für den klinischen Alltag praktikabel zu machen, liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Optimierung, Erweiterung und Verbesserung des Isolierungsprotokolls für Keratinozyten.

Die Anzuchtzeit der Keratinozyten von der Entnahme der Hautprobe bis zur 95%-igen Konfluenz innerhalb der ersten T-75-Flasche beträgt im Mittel 19,89 Tage und ist im Vergleich zu anderen gängigen Protokollen damit teilweise deutlich verkürzt.

Dies gelingt vornehmlich durch die schrittweise Veränderung des Isolierungsprotokolls. Die Verwendung der Collagenase-I-Lösung sowie des Trypsins bei 37 °C im Wasserbad (anstelle von 4 °C oder Raumtemperatur) kann die Enzymaktivität gesteigert werden. Gleichzeitig verringert sich die Einwirkdauer der Enzyme auf 60 bzw. 20 Minuten, um zu große Zellschäden und damit die Einleitung der Apoptose bei den Zellen zu vermeiden. Durch das mechanische Herauslösen der enzymatisch behandelten Zellen kann die Anzahl der gewonnenen Zellen ebenfalls gesteigert werden.

Während der Kultivierung der Zellen zeigt sich kein Wachstumsvorteil von mit Fibronectin beschichteten 6-Well-Platten im Vergleich zu 6-Well-Platten ohne Beschichtung.

Die Verwendung eines Cell Strainers (70 µm) während des Isolierungsvorgangs im Vergleich zu einer Isolierung ohne einen Cell Strainer erweist sich ebenfalls nicht als effektiver. Es zeigen sich mikroskopisch weniger isolierte Zellen, und diese sind zudem kaum bis gar nicht adhärent. Folglich kommt es bei Verwendung eines Cell Strainers häufiger zu einem Versuchsabbruch.

Es gelingt außerdem, Keratinozyten zu kryokonservieren und anschließend nach dem Auftauen wieder anzuzüchten. Hier zeigt sich ebenfalls wie in der nicht konservierten Kultur der in Abbildung 15 dargestellte Gipfel der Mitoserate mit anschließendem Abfall. Der Zeitpunkt des Auftretens ist durch die Kryokonservierung nicht verändert.

Die erste Wachstumsphase bis zum Wechsel vom 6-Well auf die T-25-Flasche dauert mit durchschnittlich 8,44 Tagen am längsten. Die Wachstumsdauer von T-25-

auf T-75-Flasche beträgt im Mittel 6,67 Tage. Bis zur 95%igen Konfluenz der T-75-Flasche sind es im Mittel 4,78 Tage.

Es kann weiterhin gezeigt werden, dass die Verdopplungszeit der einmal angewachsenen Keratinozyten bis zu einem Peak Point deutlich zunimmt und sich dann wieder verlangsamt, bis keine Mitosen mehr stattfinden.

So kann die Konfluenz einer T-75-Flasche mit durchschnittlich 2,89 Tagen bei maximaler Mitoserate deutlich schneller erreicht werden als die eines 6-Wells mit im Mittel 8,44 Tagen.

Die in Abbildung 15 gezeigte maximale Mitoserate der Keratinozyten liegt zwischen Passage 5 und 6 am höchsten und steigt dann kontinuierlich an. Alle Proben zeigen bis Passage 10 ein Zellwachstum, in den Proben 1, 2, 5 und 8 zeigt sich bis Passage 11 mikroskopisch eine Zellvermehrung. Ab Passage 10 bzw. 11 sind die Keratinozyten ohne Hinzugabe von neuem Medium nach zwei bis drei Tagen apoptotisch.

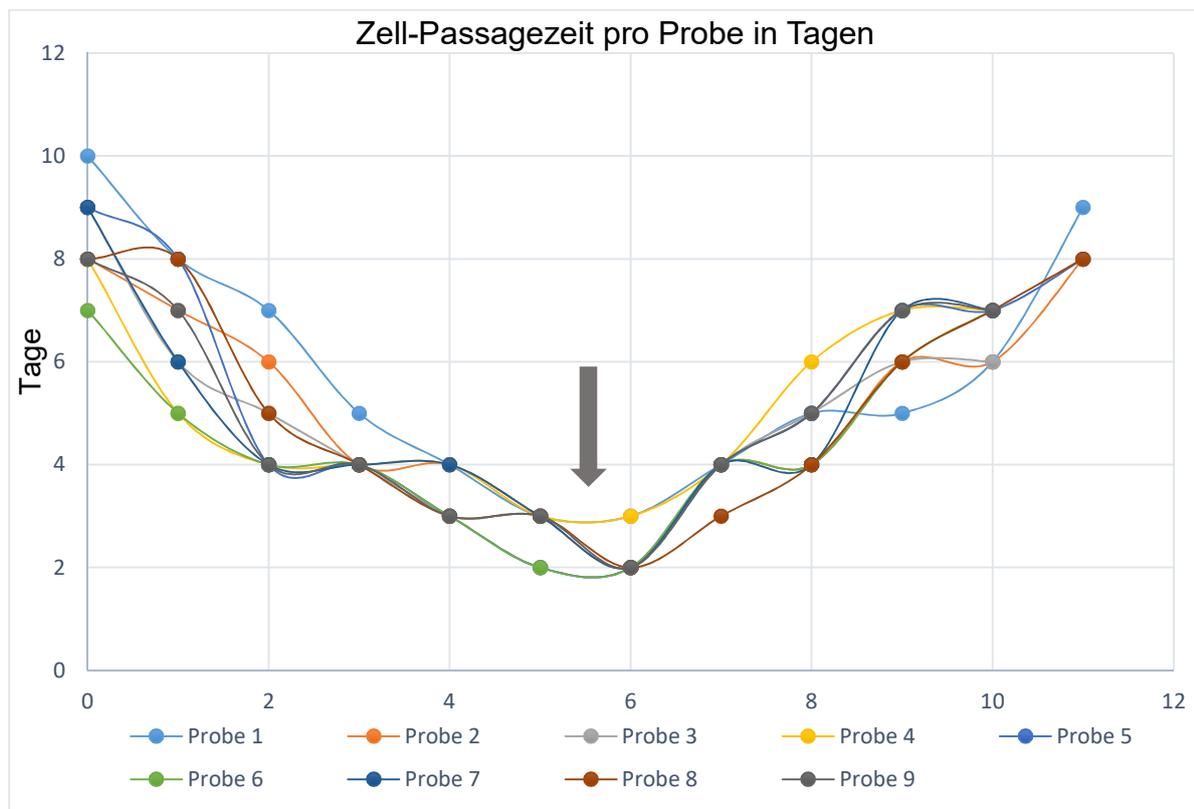


Abbildung 15: Zell-Passagezeit pro entnommener Hautprobe in Tagen. Es wird die durchschnittliche Wachstumsdauer von Zellen unterschiedlicher Proben in Tagen (y-Achse) bis zur nächsten Passagierung (x-Achse) gegeneinander aufgetragen. Dabei wird eine zunächst deutlich zunehmende Wachstumsdauer sichtbar, die ab einem Peak Point (grauer Pfeil) wieder abnimmt.

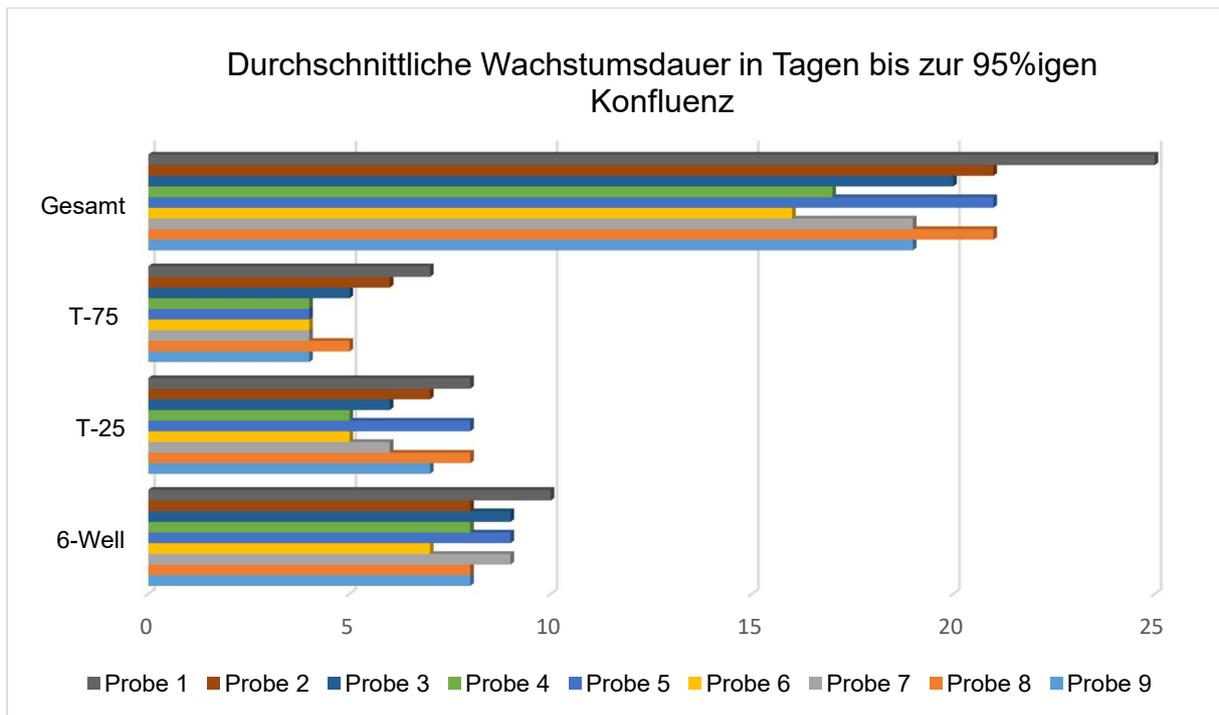


Abbildung 16: Durchschnittliche Wachstumsdauer in Tagen bis zur 95%igen Zell-Konfluenz pro Wachstumsplatte. Gezeigt wird die Wachstumsdauer einzelner Zellproben in Tagen (x-Achse) bis zur 95%igen Konfluenz. Dabei wird zwischen den unterschiedlichen Größen der Kulturflaschen unterschieden (y-Achse). Zu erkennen ist zum einen das beschleunigte Wachstum in größeren Kulturflaschen, zum anderen das unterschiedliche Gesamt-Wachstum bis zur Konfluenz der ersten T-75-Flasche der verschiedenen Proben.

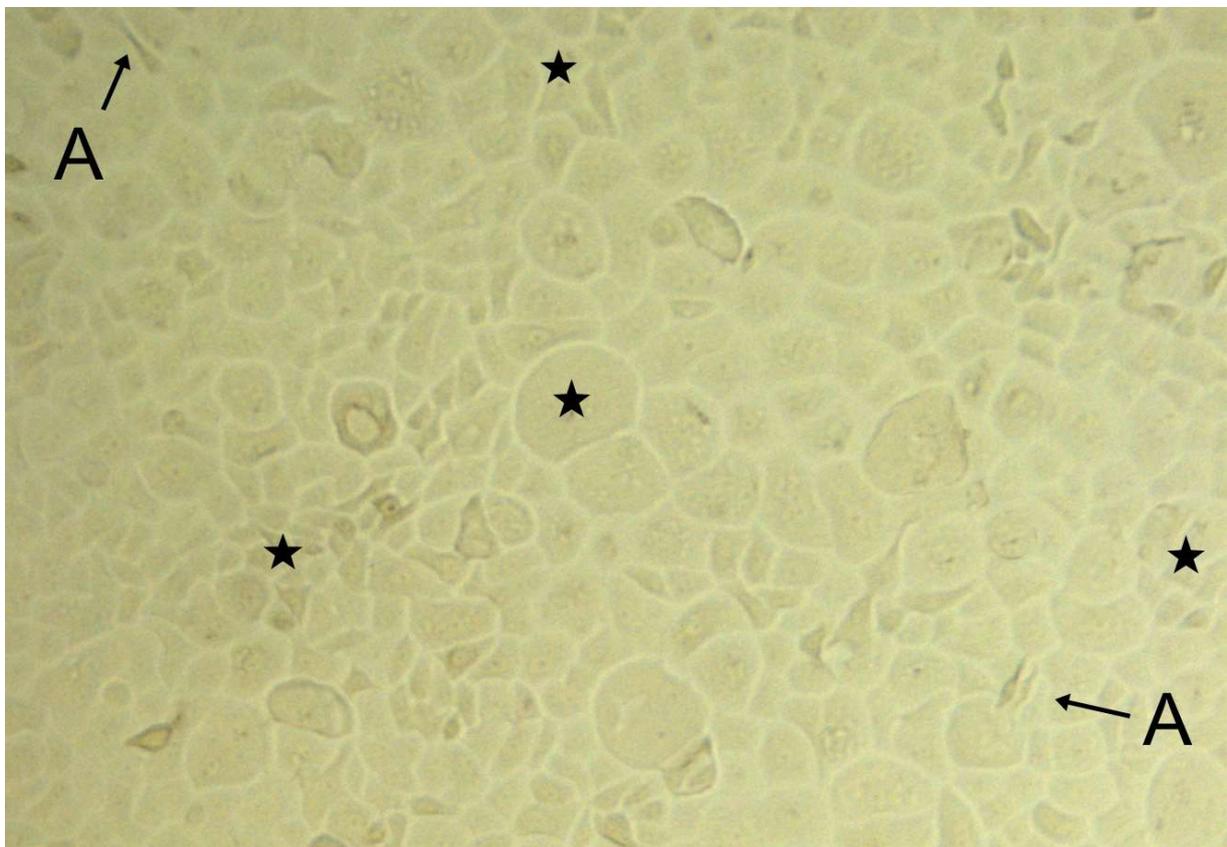


Abbildung 17: Mikroskopisches Bild kultivierter Keratinozyten. p4, T-75, PromoCell Keratinozytes-Growth-Medium 2. Geschlossene Zelllage. Es lassen sich die schollenförmigen Keratinozyten (Sterne) sowie vereinzelt Fibroblasten (A) erkennen (Zeiss ID 03, 100x).

5.2 Western Blot

Zum Nachweis der korrekten Differenzierung der aus den Hautproben isolierten Zellen zu Keratinozyten führen wir Western-Blot-Analysen durch. Als Erst-Antikörper sind dabei der α -Cytokeratin 16 rabbit, monoklonal, IgG mit einer zu erwartenden Bande bei 51 kDa sowie der α -rex rabbit, polyklonal, IgG mit einer zu erwartenden Bande bei 38 kDa genutzt worden. Als Zweit-Antikörper ist ein goat α -rabbit IgG, HRP conjugated verwendet worden. Als Positiv-Kontrolle kommen die vom Hersteller angegebenen HaCat- (α -Cytokeratin 16) bzw. Jurkat-Zellen (α -rex) zum Einsatz.

Unter den in Kapitel 4.3.6 beschriebenen Versuchsbedingungen zeigt sich folgender Western Blot:

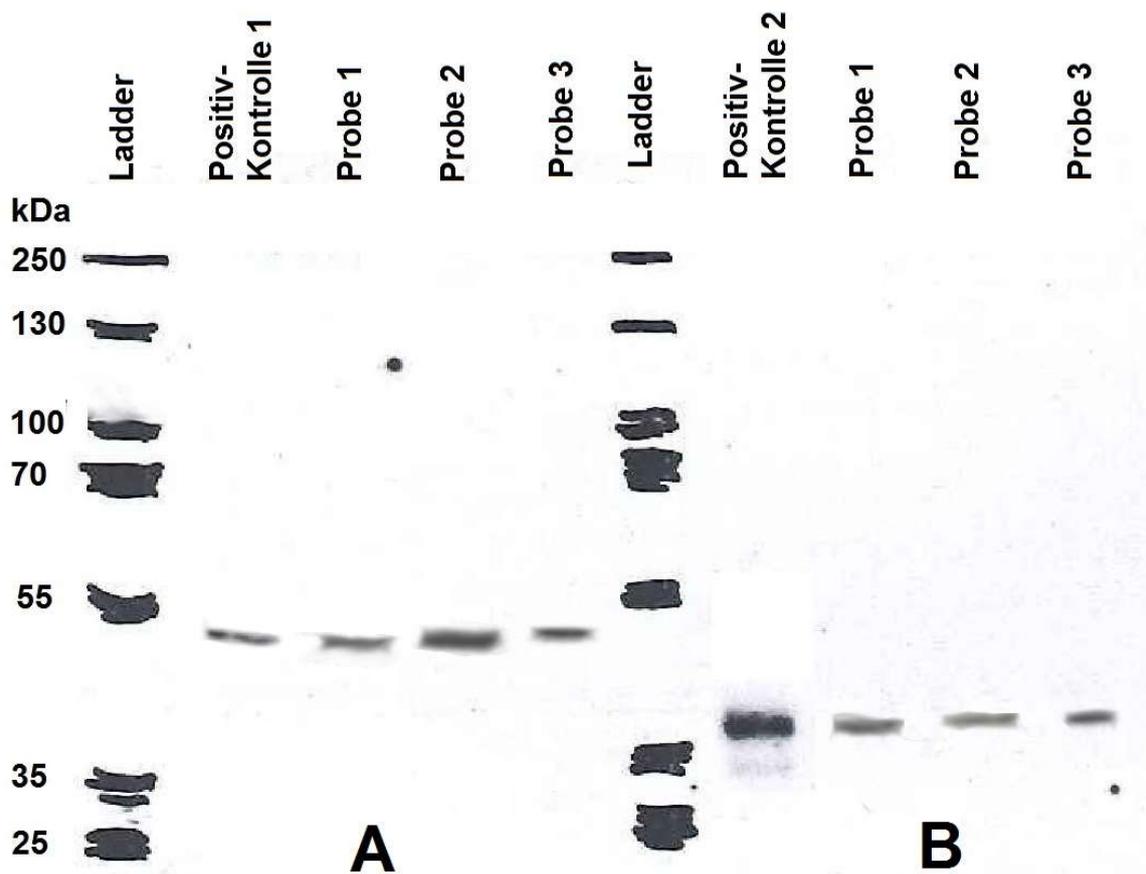


Abbildung 18: Auszug aus einem Western Blot dieser Arbeit. A: Verwendung des α -Cytokeratin 16 1. AKs, B: Verwendung des α -rex als 1. AK. Es zeigen sich jeweils positive Banden für Kontrolle und Probe bei den jeweils zu erwartenden kDa-Größen (51 kDa für A bzw. 38 kDa für B). Da sich die Ladder nicht anfärbt, wurde sie zur besseren Vergleichbarkeit der Banden mit einem Stift markiert. Blot A und B wurden zur besseren Übersicht aus zwei verschiedenen Western Blots zusammengeschnitten.

5.3 Histologie

Um die Applikation der Keratinozyten im Co-Delivery-Verfahren mit PRF, die anschließende Verteilung, das Anwachsen der Keratinozyten sowie die erforderliche Sprühdicke *in vitro* zu untersuchen, besprühen wir Patches (VascuGuard®) im Co-Delivery-Verfahren mit Keratinozyten und PRF und inkubieren sie anschließend 18 Tage lang. Danach sind die besprühten Patches geschnitten, H.E.-gefärbt und analysiert worden.

Dabei wurde eine 95%-konfluente T-75-Flasche pro Patch benutzt, bei einer im direkten Anschluss an das Aufsprühen untersuchten Auftragungsdicke von 0,5 cm bis 0,9 cm.

Nach Abschluss der Kultivierung zeigt sich im histologischen Schnitt das in Abbildung 19 gezeigte mikroskopische Bild. Es kann so nachgewiesen werden, dass die mit B2 markierten Keratinozyten eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der mit C markierten Fibrinmatrix aufwiesen. Des Weiteren sind die aufgesprühten Keratinozyten vital, was sich durch mehrere mit B1 markierte Mitosefiguren innerhalb der Fibrinmatrix zeigt.

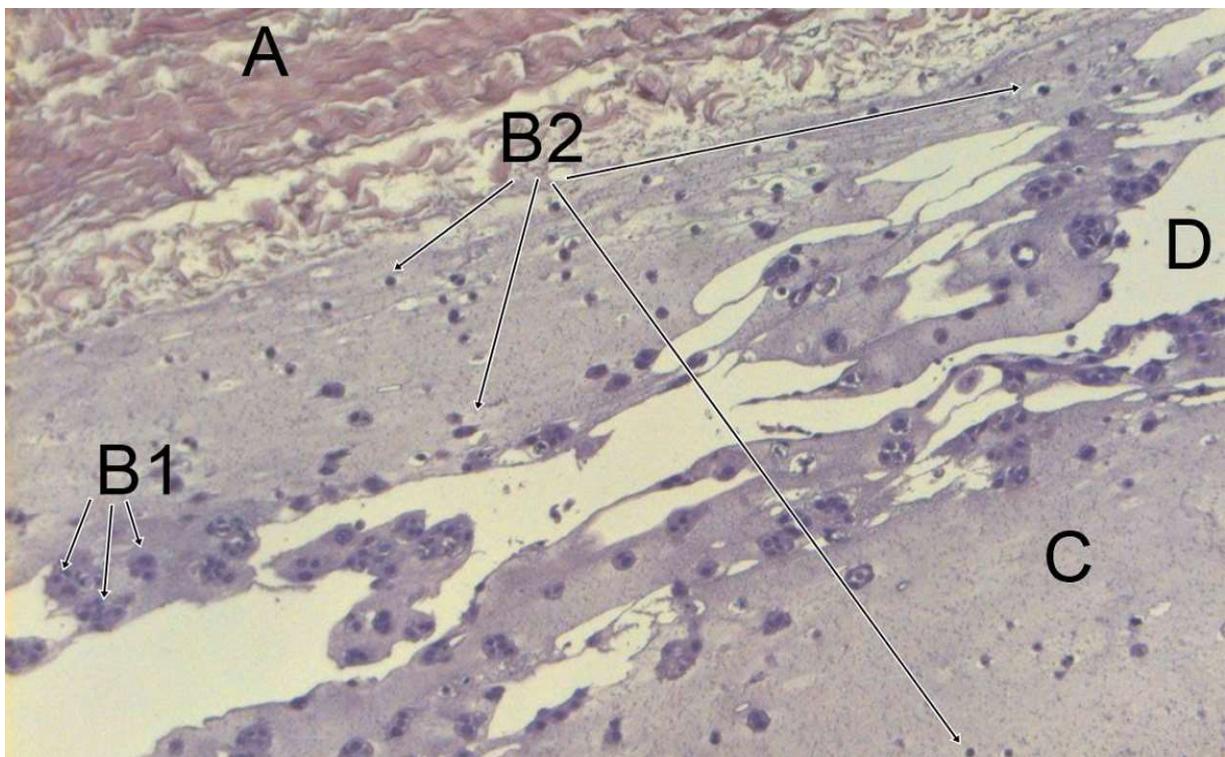


Abbildung 19: H.E.-Färbung eines kolonisierten bovines Patches (Zeiss ID 03, 100x) Trägermatrix/Patch (A), Mitosefiguren (B1), Keratinozyten (B2), Fibrin (C).

5.4 Individueller Heilversuch am Patienten

	Patient 1	Patient 2
Dokumentierte Wundgröße bei Aufnahme (Länge x Breite):	14 x 7 cm Fläche: etwa 98 cm ²	15 x 10 cm Fläche: etwa 150 cm ²
Dokumentierte Wundgröße bei Entlassung (Länge x Breite):	6,5 x 4 cm Fläche: etwa 26 cm ²	5 x 4 cm Fläche: etwa 20 cm ²
Hospitationsdauer:	53 Tage	42 Tage (+ 31 Tage Verweildauer zuvor)

Nach Abschluss der Optimierung des Keratinozyten-Isolierungsprotokolls sowie der histologischen Auswertung der im Co-Delivery-Verfahren besprühten Patches wurde bei zwei Patienten eine klinische Anwendung im Sinne eines individuellen Heilversuchs durchgeführt. Für jeden Sprühversuch wurden zwei 95%ig konfluente T-75-Flaschen verwendet.

Es zeigt sich, dass die Fibrin-Zell-Matrix nach Auftragung auf den Wundgrund dort verblieb, polymerisierte und durch nachfolgende Verbandswechsel nicht abgelöst wurde. Ferner kann die körpereigene, enzymatische Spaltung des Fibrinogens durch Verminderung der Matrixhöhe beobachtet werden.

Bei Patient 1 zeigen sich bereits elf Tage nach dem ersten bzw. fünf Tage nach dem zweiten Sprühversuch Hautinseln innerhalb des Wundgrundes und eine deutlich zunehmende Epithelialisierung am Wundrand. Zudem kann beobachtet werden, dass sich die Tiefe der Wunde deutlich verringerte und nach etwa 21 Tagen auf Niveau des umliegenden, nicht betroffenen Gewebes lag. Die Wundheilung ist zu jedem Zeitpunkt fortschreitend ohne klinischen Anhalt für eine erneute Zunahme der Ulzerationen. Anzeichen einer Wundinfektion zeigen sich über den kompletten Dokumentationszeitraum nicht.

53 Tage nach dem ersten Sprühversuch ist die Wunde deutlich verkleinert und der Zustand des Patienten verbessert im Vergleich zum Ausgangsbefund. Die maximale Ausdehnung der Wunde am lateralen Unterschenkel reduziert sich von 14 x 7 cm auf 6,5 x 4 cm (minus 73,5 %).

Bei Patient 2 ist der Prozess der Wundheilung makroskopisch durch das Auftreten von Hautzellinseln nach etwa zwölf Tagen sichtbar. Die Wundheilung zeigt sich nach

Auftreten der ersten Hautzellinseln im Vergleich zu Patient 1 beschleunigt und sehr gut voranschreitend. 18 Tage nach dem Sprühversuch stellt sich die Wunde bei Patient 2 weiterhin als nicht infektiös oder nässend dar. Die Epithelialisierung und Verringerung der Wundtiefe ist zu jedem Zeitpunkt des Aufenthalts voranschreitend. 35 Tage nach dem Sprühversuch ist die Tiefe des Wundgrunds auf dem Niveau der umliegenden, nicht defekten Haut. Die ursprüngliche etwa 15 x 10 cm große Wunde am lateralen Unterschenkel kann auf einen faustgroßen Defekt von etwa 5 x 4 cm (minus 86,7 %) reduziert werden.

5.4.1 Fotodokumentation Patient 1



Abbildung 20: Ausgangsbefund von Patient 1 am lateralen Unterschenkel links, vor dem 1. Sprühversuch.



Abbildung 21: Laterale Ansicht des li. Unterschenkels von Patient 1, Mepitel®-Abdeckung der Wunde, unmittelbar nach dem 1. Sprühversuch.



Abbildung 22: Laterale Ansicht des li. Unterschenkels von Patient 1, elf Tage nach dem 1. Sprühversuch. Zentral sind eine Hautinsel sowie die verringerte Tiefe im Vergleich zum Ausgangsbefund erkennbar. Beginnende Epithelialisierung am Wundrand.



Abbildung 23: Laterale Ansicht des li. Unterschenkels von Patient 1, 53 Tage nach dem 1. Sprühversuch. Deutlich verringerte Tiefe und Ausdehnung der Wunde im Vergleich zum Ausgangsbefund.

5.4.2 Fotodokumentation Patient 2



Abbildung 24: Ventrale Ansicht des re. Unterschenkels von Patient 2 vor dem 1. Sprühversuch. Die Poren auf der Haut und der Wunde sind bedingt durch die vorherige Mepitel®-Auflage unter dem Verband.



Abbildung 25: Leicht laterale Ansicht des re. Unterschenkels von Patient 2, zwölf Tage nach dem 1. Sprühversuch. Es stellen sich einzelne Hautzellinseln innerhalb des Wundgrundes dar.



Abbildung 26: Leicht laterale Ansicht des re. Unterschenkels von Patient 2, 22 Tage nach dem 1. Sprühversuch. Die Hautzellinseln zeigen sich im Wachstum progredient. Zudem ist eine deutliche Zunahme der Epithelialisierung am Wundgrund erkennbar.



Abbildung 27: Leicht laterale Ansicht des re. Unterschenkels von Patient 2. 35 Tage nach dem 1. Sprühversuch zeigt sich der Befund deutlich gebessert im Vergleich zur Ausgangssituation. Kleine, schollenförmige Zellen links oben und rechts unten = Keratinozyten-Inseln, Faltenbildung durch die vorher angelegte enge Wickelung.

6 Diskussion

6.1 Keratinozytenkultur

Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Optimierung und Beschleunigung des Isolierungsvorgangs von Keratinozyten aus einer menschlichen Hautprobe mit ihrer Erstbeschreibung durch Rheinwald und Green⁴⁸ (1975), um diesen für eine mögliche spätere breite klinische Anwendung zur Behandlung von Patienten mit chronischen Wunden auszurichten.

Dabei gelang es, durch Hinzunahme der Erfahrungen aus anderen Isolierungsvorgängen^{17,18,27} sowie der eigenen Kulturergebnisse ein neues Isolierungsprotokoll zu entwickeln, das die Anzuchtzeit von autolog gewonnenen Keratinozyten im Mittel auf knapp 20 Tage reduziert hat. Die korrekte Differenzierung der so isolierten Zellen zu Keratinozyten konnte mit molekularbiologischen Verfahren nachgewiesen werden. Des Weiteren erwiesen sich die im Co-Delivery-Verfahren aufgesprützten Zellen im *In-vitro*-Versuch als vital, mit einer gleichmäßigen Verteilung innerhalb der PRF-Matrix.

In zwei individuell durchgeführten Heilversuchen am Patienten zeigte sich zudem eine kontinuierliche Wundheilung mit einer deutlichen Verkleinerung der Wundfläche von bis zu 86,7 % bei gleichzeitiger Infektfreiheit.

In den ersten Isolierungsversuchen wurde dabei nach einem internen Arbeitsgruppen-Protokoll zur Isolierung von Endothelzellen vorgegangen, das bereits zuvor an Hautzellen zum Einsatz kam, und es wurde festgestellt, dass dadurch vornehmlich Fibroblasten erfolgreich aus der am Patienten entnommenen Hautprobe isoliert wurden. Dies wurde auf eine zu geringe enzymatische Herauslösung der Keratinozyten aus dem Zellverbund zurückgeführt und zu einer Veränderung des Protokolls übergegangen. Dabei wurde auf Erfahrungen aus bereits erfolgreich durchgeführten Verfahren^{17,18,27} zurückgegriffen, und es wurden einzelne Aspekte aus diesen Isolierungsvorgängen mit in die Überlegungen zur Veränderung des ersten Protokolls einbezogen.

Dabei sollte, im Gegensatz zum ersten Protokoll, durch die Hinzunahme eines zweiten Enzyms (Trypsin) sowie die Verlängerung der Inkubationszeit von Collagenase I (über Nacht bei 4 °C) die enzymatische Wirkung auf die Keratinozyten verstärkt werden.

Die in dem Isolierungsverfahren von Knebel²⁷ (2006) postulierte Verwendung eines 70 µm Cell Strainers erbrachte bei der versuchsweisen Hinzunahme in den Isolierungsvorgang keinen Vorteil. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass sich zum einen die einzelnen isolierten Keratinozyten überlagerten und dadurch zu groß für die Poren des Cell Strainers waren, und zum anderen die Collagenase-I-Lösung nach Inkubation über Nacht durch Herauslösen einzelner Hautbestandteile sehr viskös und schwer zu filtrieren war. Es wurde daraufhin in folgenden Versuchen auf den Einsatz eines Cell Strainers verzichtet.

Weiterhin konnte ein komplettes Ablösen der Epidermis von der Dermis nach alleiniger Inkubation mit Trypsin, wie durch Gauglitz¹⁷ (2007) beschrieben, nicht bestätigt werden. Dieser Ansatz der Keratinozyten-Isolierung wurde daraufhin nicht weiterverfolgt und daran festgehalten, die Hautprobe vor der enzymatischen Behandlung mit Collagenase I sowie Trypsin in kleine Stücke zu schneiden, um den Enzymen eine möglichst große Angriffsfläche zu bieten und so deren Effekt zu verstärken.

Durch die Veränderung des Protokolls konnte eine erfolgreiche Isolierung von Keratinozyten mikroskopisch bestätigt werden. Allerdings zeigten die so isolierten Zellen auch nach einigen Tagen keine Adhärenz am Boden sowie eine Tendenz des Anwachsens, sodass der Versuch daraufhin abgebrochen wurde.

Es wurde vermutet, dass die Zellen durch die Inkubation über Nacht in Collagenase I, wie in Teilen im Protokoll von Knebel²⁷ (2006) durchgeführt, zu stark geschädigt wurden und bereits den Apoptose-Vorgang eingeleitet hatten.

Um dies zu verhindern und in Hinblick auf die Enzymkinetik sowie den optimalen Wirkungsbereich eines Enzyms bei 37 °C^{19,23} wurde die Collagenase-I-Lösung ebenfalls bei 37 °C im Wasserbad (anstelle von 4 °C) eingesetzt. Gleichzeitig wurde die Einwirkdauer auf 60 Minuten verringert, um zu große Zellschäden und damit die Einleitung der Apoptose bei den Zellen zu vermeiden.

Zusammenfassend sollte die Anpassung des zweiten Protokolls zu einer erhöhten Enzymaktivität und Isolierungsrate auf der einen Seite und durch die Verkürzung der Einwirkdauer zu einer reduzierten Anzahl an Zellen, die bereits Apoptose eingeleitet hatten, auf der anderen Seite führen.

Im Anschluss an die Anpassung konnten mit dem neuen Protokoll regelhaft Keratinozyten aus Hautzellproben isoliert werden. Durch Western-Blot-Analysen sowie mikroskopische Auswertungen wurde zudem die korrekte Differenzierung der

Zellen nachgewiesen. Die Entwicklung des neuen Protokolls führte zudem zu einer Verkürzung des eigentlichen Isolierungsvorgangs und damit des Arbeitsaufwands, da zwischen dem Eintreffen der Hautzellen im Labor und der Aussaat ins 6-Well nur etwa zwei Stunden vergingen.

Gerken¹⁸ (2011) verwendete in ihrem Protokoll vornehmlich neonatale Vorhäute als Hautprobe, die durch das Alter des Probanden sowie die Unversehrtheit weitaus potenter sind und zellbiologisch eine bessere Grundlage zur Isolierung^{31,35,46} besitzen. Im Gegensatz dazu gelang es durch die Kombination aus enzymatischer und mechanischer Isolierung, aus nur kleinen Hautzellproben von 2 x 2 cm Keratinozyten zu gewinnen. Zudem waren die Hautproben, bedingt durch den Ethikantrag, in unmittelbarer Nähe der chronischen Wunde entnommen worden. Das Potenzial der Regeneration und Zellteilung^{6,35,39} sowie der Anteil an Keratinozyten-Stammzellen ist, bedingt durch die chronische Inflammation im Wundgebiet sowie das Alter des Patienten, deutlich reduziert^{6,9,21,35,39}, sodass sich hieraus durch die trotzdem erfolgreiche Verkürzung des Isolierungsvorgangs eine verbesserte Effektivität ableiten lässt. Dennoch schließt sich die Frage an, ob durch die Entnahme von Hautzellproben mit weiterem Abstand zur chronischen Wunde zum einen die Größe der zu entnehmenden Probe verkleinert und zum anderen die Anzuchtzeit bis zur Möglichkeit eines Sprühversuchs weiter verringert werden kann.

Die erreichte Verkürzung der Anzuchtzeit und damit der *In-vitro*-Zeit der Keratinozyten auf im Mittel 19,9 Tage ist gerade in Hinblick auf die von Esteban-Vives et al.¹⁵ (2015) erzielten Ergebnisse entscheidend. Die Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit dem Verlust der Progenitor-Marker während der *In-vitro*-Kultivierung von Keratinozyten sowie der Verdopplungszeit der Keratinozyten. Zur Auswertung der Ergebnisse kamen die Durchflusszytometrie, immunhistochemische Färbung sowie die Zellverdopplungszeit zum Einsatz.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme der Stammzellfaktoren K5+ sowie K15+ mit Zunahme der Zellpassagen. Es zeigte sich zudem eine Größenzunahme der einzelnen Keratinozyten mit steigender Passagezahl bei gleichzeitiger Abnahme der Verdopplungszeit. Die der Basalschicht zugehörigen Keratinozyten zeigten sich während der *In-vitro*-Kultivierung ebenfalls deutlich vermindert, was zu der Annahme durch Li et al.³² (2004) sowie nun auch Esteban-Vives et al.¹⁵ (2015) führte, dass Keratinozyten während der *In-vitro*-Kultivierung ihre Stammzellen verlieren. In

Zusammenhang mit der von Weinstein et al.⁶¹ (1984) angeführten Notwendigkeit des Vorhandenseins von Stammzellen für den physiologischen Ablauf von Hautabschilferung und Erneuerung sehen die Autoren¹⁵ dies als problematisch für die Wundheilung an.

Esteban-Vives et al.¹⁵ (2015) favorisieren daher den Einsatz von nichtkultivierten Keratinozyten anstelle einer Transplantation von langzeitkultivierten Keratinozyten. Körpereigene Stammzellen sowie die Gefäßversorgung und körpereigene physiologische Wachstumsstimulierung würden für ein optimales Anwachsen sowie eine optimale Entwicklung der Keratinozyten sorgen.

Unsere Ergebnisse lassen durch die Abnahme der Verdopplungszeit der Zellen nach einigen Zellpassagen ebenfalls den Verlust von Keratinozyten-Stammzellen vermuten. Daraus lässt sich ein optimaler Zeitpunkt für den Einsatz von kultivierten Keratinozyten ableiten. Zur Erhaltung des Differenzierungspotenzials von autolog gewonnenen Keratinozyten für eine Transplantation kommt es auf eine möglichst kurze *In-vitro*-Kultivierung sowie eine Reduzierung des auf die Zellen einwirkenden Stresses durch zu häufiges Wechseln des Mediums oder Passagieren an. Durch die erreichte Verkürzung der Anzuchtzeit kann der Schlussfolgerung von Esteban-Vives et al.¹⁵ (2015) nicht gefolgt werden, für den Einsatz *in vivo* nichtkultivierte statt kultivierte Keratinozyten zu verwenden. Autolog gewonnene Keratinozyten sind patientenspezifisch, sodass auch die körpereigenen Wachstumsfaktoren dadurch effektiver sind. Diese Tatsache ist gerade in Hinblick auf Patienten mit chronischen Wunden, die zum größten Teil älter sind, entscheidend. Bedingt durch die vermehrte Komorbidität^{7,12,44} sowie oftmals schlechte Durchblutungsverhältnisse¹⁰ ist die Wundheilungsfähigkeit deutlich reduziert, sodass die vorhandenen körpereigenen Ressourcen optimal ausgenutzt werden müssen.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um A. L. Clement et al.⁸ (2013), die sich mit der Entwicklung von Keratinozyten in einem dreidimensionalen *In-vitro*-Modell befasste, um Unterschiede in der epidermalen Topografie und Morphologie zu untersuchen, unterstützen ebenfalls den Standpunkt, autologe Keratinozyten zu verwenden.

In der Studie⁸ wurden spezielle Wachstumsplatten angefertigt, die mit unterschiedlich weiten Kanälen bei gleicher Länge und Tiefe bestückt waren. Des Weiteren wurde eine Fibroblasten-Co-Layer-Schicht in die Wachstumsplatten integriert und eine Vergleichsreihe ohne Fibroblasten-Co-Layer angelegt. Die Platten wurden mit aus juvenilen Vorhäuten gewonnenen Keratinozyten kultiviert und nach drei- bzw. sieben-

tägiger Inkubation morphometrisch, histologisch und immunhistochemisch untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Keratinozyten unter dem Einfluss der Fibroblasten-Co-Layer eine erhöhte epidermale Dicke sowie robustere Basalschicht im Vergleich zu denen ohne Einfluss von Fibroblasten aufwiesen. Zudem zeigte sich die epidermale Schichtdicke in den Wachstumsplatten mit geringerer Weite der Kanäle vergrößert, was auf eine erhöhte Dichte an ki67-positiven Zellen zurückgeführt wurde. Auch fand sich hier eine größere Ansammlung an Keratinozyten-Stammzellen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den weiten Kanälen eine erhöhte Laminin-332-Ablagerung und damit verbundene Dicke der Basalschicht, sodass A. L. Clement et al.⁸ (2013) eine Aufteilung der Keratinozyten in verschiedene Subpopulationen je nach Weite der Kanäle auf den unterschiedlichen Wachstumsplatten vermuteten. Des Weiteren wurde der positive Einfluss der Fibroblasten-Co-Layer hervorgehoben.

Die von A. L. Clement et al.⁸ (2013) erzielten Ergebnisse unterstützen die Haltung, autologe Keratinozyten zu verwenden. Durch die unterschiedlich weiten Kanäle auf den Wachstumsplatten wird die Struktur der papillären Dermis^{35,39} imitiert. Dadurch kann die Anzahl an Keratinozyten-Stammzellen erhöht werden, sodass ein Verlust eben dieser im Verlauf der *In-vitro*-Kultivierung, wie durch Esteban-Vives et al.¹⁵ (2015) postuliert, in Kauf genommen werden kann.

Die von A. L. Clement et al.⁸ (2013) gezeigte erhöhte epidermale Dicke und Robustheit durch den Einsatz von Fibroblasten-Co-Layer zeigte sich in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen nicht. So ergaben sich in Hinblick auf eine beschleunigte Adhärenz sowie das Anwachsen der Zellen keine Vorteile unter Verwendung von mit Fibronectin beschichteten Wachstumsplatten. Ein möglicher Grund dafür könnte die fehlende Präsenz vitaler Fibroblasten sein, die die Bildung von Fibronectin regulieren³⁵. *In vivo* bilden diese eine Art Gitternetz für die Keratinozyten und schaffen dadurch optimale Wachstumsbedingungen. Zudem findet eine ständige gegenseitige Stimulierung über verschiedene Chemokine^{3,9,35,39} statt. Obwohl in allen zum Vergleich einbezogenen Protokollen^{17,18,27} das Wachstum der Keratinozyten durch die Präsenz einer aus Fibroblasten-Co-Layer bestehenden Feeder-Schicht unterstützt wurde, wurde in den hier beschriebenen Kulturen bewusst darauf verzichtet. Grund dafür war zum einen, dass sich unter Verwendung von fibronectin-beschichteten Wachstumsplatten kein Vorteil ergab und zum anderen die

Effektivität des neuen Protokolls ohne weitere Faktoren beurteilt werden sollte. So spricht das erfolgreiche Anwachsen der durch das neue Protokoll isolierten Keratinozyten *in vitro* ohne die *in vivo* vorhandenen und wichtigen Fibroblasten für einen schonenden und zugleich effektiven Isolierungsprozess.

Trotzdem sollte diese gegenseitige physiologische Stimulierung auch *in vitro* erhalten bleiben, um während der Kultivierung so eng wie möglich an den im Körper ablaufenden Wachstumsvorgängen zu bleiben. Hierdurch würde sich die unmittelbare Frage anschließen, wie dieses Potenzial der physiologischen *In-vitro*-Kultivierung noch besser ausgeschöpft werden kann und ob es auf diese Weise zu einem noch einmal verbesserten Anwachsen der autolog gewonnenen Keratinozyten führt. Die gemeinsame Kultivierung von isolierten Keratinozyten und Fibroblasten sollte demnach zeitnah unternommen werden.

Von größerer Bedeutung sind allerdings der richtige Einsatz und die Rolle des PRF. Der Effekt des Einsatzes von PRF in der Behandlung von chronischen Wunden ist Thema aktueller Forschungen. Der klinische Nutzen dieser Therapie konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden. Unter anderem zeigte sich ein positiver Einfluss auf die Epithelialisierung und Angiogenese nach Spalthauttransplantation (Kakudo et al.²⁴, 2011), eine erhöhte Wundangiogenese durch vermehrte Endothelzellproliferation (Roy et al.⁵⁰, 2011) sowie eine erhöhte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (Yang et al.⁶³, 2011). Eppley et al.¹⁴ (2006) sowie Löndahl et al.³⁴ (2015) konnten zudem den therapeutischen Benefit der PRF-Therapie beim Einsatz in der plastischen Chirurgie bzw. zur Therapie von chronischen Wunden zeigen.

Xian et al.⁶² (2015) beschäftigte sich mit der konzentrationsabhängigen Wirkung von PRF auf Keratinozyten und Fibroblasten während der Wundheilung.

Dazu wurden Keratinozyten und Fibroblasten isoliert und anschließend zusammen mit unterschiedlicher PRF-Konzentration in Höhe von 5 %, 10 % und 20 % co-kultiviert, um die *In-vivo*-Keratinozyten-Fibroblasten-Interaktion *in vitro* zu imitieren. Nach dreitägiger Kultivierung ohne Mediumwechsel wurden die Zellen in Hinblick auf ihr Wundheilungspotenzial untersucht. Dabei wurden vor allem die Wachstums- und Migrationsfähigkeit, das Ausschütten von Chemokinen sowie die Genexpression in der Extrazellulärmatrix untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass ein gutes Anwachsen sowie eine gute Konfluenz von Keratinozyten und Fibroblasten in der Co-Kultivierung zu beobachten war.

In der Wachstumsgruppe mit einer 10%igen PRF-Konzentration zeigte sich eine erhöhte Keratinozyten-Wachstumsrate sowie eine vermehrte Ausschüttung von wachstumsrelevanten Enzymen wie z. B. VEGF. In der Wachstumsgruppe mit einer 20%igen PRF-Konzentration konnte eine Expression von Kollagen Typ 1 und 3 gezeigt werden. Des Weiteren war der Granulozyten-Makrophagen-Stimulierungsfaktor erhöht, sodass sich je nach Konzentration eine erhöhte Wachstumsrate der Keratinozyten oder eine vermehrte Kollagenneubildung und Ausschüttung antiinflammatorischer Chemokine zeigte.

Es kann daraus geschlossen werden, dass es neben der möglichst kurzen *In-vitro*-Kultivierung der Keratinozyten vor allem auch auf den richtigen Einsatz des PRF ankommt. Mit Blick auf die Ergebnisse dieser Arbeit, das Patientengut und die Eigenschaften der chronischen Wunde^{7,9} scheint eine Verwendung beider Konzentrationen in zwei zeitlich voneinander getrennten Sprühvorgängen sinnvoll. So könnte mit der erhöhten Ausschüttung von antiinflammatorischen Chemokinen in der 20%igen PRF-Lösung die Basis für eine infektfreie Wundheilung⁵³ gelegt werden. Die Infektfreiheit der im Co-Delivery-Verfahren behandelten Patienten im individuellen Heilversuch legt ebenfalls die antiinflammatorische Wirkung dieser Therapieoption nahe. Durch den Einsatz der 10%igen PRF-Lösung würden das Wachstum sowie die generelle Wundheilung angeregt werden. Die erhöhte Präsenz von Wachstumsfaktoren könnte zudem zu einer vermehrten Stimulierung der *in vitro* kultivierten Keratinozyten führen, sodass der von Esteban-Vives¹⁵ (2015) beschriebene Nachteil des Einsatzes von *in vitro* gezüchteten Keratinozyten abermals verringert würde. Das enge Zusammenspiel aus für die Wundheilung^{21,29,33} verantwortlichen verschiedenen Zellen³ und Signalstoffen^{5,35,47} ist bei Patienten mit chronischen Wunden oftmals gestört^{13,65}, sodass es von großer Bedeutung ist, dieses System von extern so gut wie möglich zu imitieren und zu unterstützen.

In weiteren Heilversuchen an Patienten könnte die so aufgestellte Hypothese eines vorteilhaften zweizeitigen Vorgehens mit unterschiedlichen PRF-Konzentrationen untermauert und belegt werden. In Hinblick auf die beiden durchgeführten Heilversuche stellt sich ebenfalls die Frage, ob und in welcher Form ein zweimaliger Sprühvorgang die Wirksamkeit erhöht. So wurde Patient 1 zweimal im Co-Delivery-Verfahren mit PRF und Keratinozyten behandelt, Patient 2 wurde sieben Tage vor

dem Sprühversuch nur mit PRF behandelt. Bei beiden zeigte sich im Anschluss eine deutliche Verkleinerung der Wundfläche. Bedingt durch das unterschiedliche Alter sowie die erhöhte Komorbidität von Patient 1 lässt sich hieraus aber kein offensichtlicher Vorteil für die eine oder andere Vorgehensweise schließen. Da das jüngere Alter von Patient 1 eine bessere Wundheilung erwarten lässt hat Patient 2 aber durch eine geringere Komorbidität voraussichtlich mehr körperliche Kapazitäten zur Wundheilung. Es sollte demnach ein breiter und besser ausgeglichener Vergleich beider Ansätze vorgenommen werden, um eine Empfehlung für den klinischen Einsatz aussprechen zu können.

6.2 Histologische Analyse

Die Ermittlung der notwendigen Anzahl an Keratinozyten, die benötigte Schichtdicke des Fibrins für einen möglichen späteren Heilversuch am Patienten unabhängig von der Konzentration⁶² sowie das generelle Verhalten der Zellen in der Fibrinmatrix sollten durch einen *In-vitro*-Sprühversuch untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigten eine gleichmäßige Verteilung der Keratinozyten in der aufgesprühten Fibrinmatrix bei ausreichender Schichtdicke.

Die hierbei bestimmte Schichtdicke wurde allerdings durch Stichprobenmessungen nach Aufsprühen der Matrix ermittelt und konnte nur durch die gleichmäßige Verteilung der Zellen in den anschließenden histologischen Analysen bestätigt werden. Um die optimale Schichtdicke weiter zu quantifizieren, sollte ein Versuchsaufbau mit dem Aufsprühen unterschiedlicher Dicken und Zellkonzentrationen vorgenommen werden. Die für die Ausbildung einer histologisch korrekten Hautschichtung benötigte Konzentration an Keratinozyten in der Sprühmatrix könnte durch die Verwendung einer unterschiedlichen Anzahl an Zellkulturflaschen mit unterschiedlichen Größen im *In-vitro*-Versuch gelingen. Zudem sollte die genaue Anzahl an Keratinozyten mithilfe eines Zellzählgeräts (Casy) ermittelt werden.

Anzumerken an dieser Stelle ist, dass die in unseren Ergebnissen optimale Sprühdicke von 0,5 cm bis 0,9 cm bei Auftragung der Fibrin-Zell-Matrix am Patienten nicht an allen Stellen des Wundgrundes exakt einzuhalten ist. Zum einen bedingt durch die dynamische Applikationstechnik des Sprühsystems, zum anderen durch die Anwendung durch ärztliches Personal an sich, da sich hier durch das subjektive

Augenmaß Unterschiede in der Auftragungsdicke ergeben. Letztere Ungenauigkeit könnte durch eine gezielte Schulung des Personals zumindest teilweise vermindert werden.

Das Fibrin wird *in vivo* durch körpereigene Enzyme aufgelöst⁴⁷, was zu einem Absinken der Keratinozyten auf den Wundgrund führt. *In vitro* muss dieser Vorgang durch die Hinzunahme von Plasmin gestartet werden, die in unserer Versuchsreihe nicht durchgeführt wurde. Grund dafür war, dass zunächst das biologische Verhalten sowie ein mögliches Anwachsen der Zellen innerhalb der PRF-Matrix untersucht werden sollte, um zu zeigen, dass die Keratinozyten auch während dieser Phase aktiv und vital sind.

Diese Aktivität und Vitalität der Keratinozyten innerhalb der Matrix konnte durch den Nachweis von Mitosefiguren gezeigt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Zellen durch den Sprühvorgang über ein Applikationssystem auf den Wundgrund keinen Schaden nehmen und erneut adhärent und mitotisch aktiv werden. Die Fähigkeit zur Regeneration bleibt folglich erhalten. Des Weiteren zeigt sich, dass die applizierten Keratinozyten auch nach *In-vitro*-Kultivierung, Applikation mittels des Sprühsystems sowie Verbleiben innerhalb einer PRF-Matrix zur erneuten Vervielfältigung fähig sind und damit eine mögliche Therapieoption zur Verwendung bei chronischen Wunden bieten.

Zum Nachweis der Ausbildung einer histologisch korrekten Schichtung^{35,39} der Haut nach einem Sprühversuch schließt sich ein Sprühversuch auf einen Patch mit anschließender Auflösung des Fibrins mit Plasmin an. Des Weiteren könnte durch unterschiedliche Zeitpunkte der histologischen Analyse ermittelt werden, wie lange die Keratinozyten nach einem Sprühversuch im Mittel bis zur Ausbildung einer neuen, intakten Hautschichtung benötigen.

6.3 Individueller Heilversuch

In der Behandlung von Verbrennungswunden ist die Therapie mit Keratinozyten schon seit längerer Zeit eine Option. Die Arbeitsgruppe von Auxefans et al.⁴ (2013) beschäftigte sich deshalb retrospektiv mit dem Outcome von Verbrennungspatienten zwischen 1997 und 2012 nach der Therapie mit allogenen, kultivierten Keratinozyten („Cultured allogeneic Keratinocytes – CALloK“) im Edouard-Herriot-Hospital in Lyon. Eingeschlossen in die Studie wurden Patienten mit CALloK-Therapie nach Grad-2-

Verbrennungen sowie schwer verbrannte Patienten mit Spalthauttransplantationen (STSG). Ausgeschlossen wurden Patienten, die vor der kompletten Wundheilung verstarben, sodass insgesamt die Daten von 70 Patienten in die Studie einfließen (59 STSG, elf Grad-2-Verbrennungen).

Es zeigte sich, dass bei 58 der 59 nach STSG behandelten Patienten im Mittel innerhalb von sieben Tagen eine komplette Epithelialisierung erreicht wurde. Des Weiteren traten keine Wundinfektionen auf. Bei den behandelten Grad-2-Verbrennungswunden konnte nach durchschnittlich 6,5 Tagen eine Epithelialisierung von 80 % bis 100 % erreicht werden. Die Hospitalisierungsdauer betrug im Mittel 68,3 Tage. Es wurden weiterhin keine Unterschiede zwischen der Verwendung von frischen zu kryokonservierten Keratinozyten festgestellt.

Auxefans et al.⁴ (2013) sehen in der Therapie mit CALloK ein großes Potenzial in der Therapie von Verbrennungswunden. Zum einen durch die Vermeidung von Spalthauttransplantationen, zum anderen durch die schnellere Rückkehr des Körpers in einen physiologischen Stoffwechsel. Die erhöhten Kosten der CALloK-Therapie werden durch die verkürzte Hospitalisierungsrate sowie Vermeidung von Komplikationen kompensiert. Wichtig für den Erfolg der Therapie ist es, die Keratinozyten erst nach einigen Tagen auf die Wunde zu applizieren, um abschätzen zu können, wie tief und schwerwiegend die Verbrennung ist.

Diese Forschungsergebnisse bestärkten die Durchführung eines individuellen Heilversuchs zur Therapie von chronischen Wunden mit autologen Keratinozyten am Patienten. Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass es sich hierbei um eine sehr vielversprechende Methode handeln könnte. Die größten Unterschiede zwischen den im Heilversuch eingeschlossenen zu den von Auxefans et al.⁴ (2013) beschriebenen Patienten bestanden, neben der deutlich geringeren Anzahl, vor allem in der Art der behandelten Wunde. So ist die Physiologie der Wundheilung einer Verbrennungswunde^{4,35,39} im Vergleich zu einer chronischen Wunde^{7,13,35,39} verschieden, und die Ressourcen zur Wundheilung bei einer akuten (Verbrennungs-) Wunde sind größer^{31,33} als bei einer chronischen Wunde^{7,21,53}. Zudem sind je nach Schweregrad der Verbrennung nicht alle Strukturen der Epidermis und Dermis zerstört und müssen folglich neu aufgebaut werden. Dieser Unterschied zeigt sich auch durch die deutlich schnellere, komplette Epithelialisierung der Verbrennungswunde (80 % bis 100 % nach 6,5 bzw. 7 Tagen) im Vergleich zur chronischen Wunde im Heilversuch (70 % bis 80 % nach 35 bzw. 53 Tagen). Trotz

dieser deutlich beschleunigten Wundheilung bei akuten Wunden ist die endgültige Hospitalisierungsrates im Vergleich zu den Patienten mit chronischen Wunden im Heilversuch ähnlich. Hieraus lässt sich auf eine Beanspruchung sowie Auswirkung der Wunden auf den gesamten Organismus schließen. Die Infektfreiheit während der Wundheilung stellt damit, zur Vermeidung einer weiteren Belastung für den Körper, einen wichtigen Bestandteil der Therapie dar, der durch die Infektfreiheit unter der Therapie im Co-Delivery-Verfahren gewährleistet werden konnte.

Des Weiteren war auch hier kein Unterschied zwischen kryokonservierten und nicht-konservierten Keratinozyten zu erkennen. Keratinozyten-Inseln waren erst nach wenigen Tagen auf dem Wundgrund erkennbar. Durch die Vermeidung einer Spalthauttransplantation konnte zudem die Bildung eines neuen Wundgrundes verhindert werden. Gleichzeitig lag die neu gebildete Haut auf Niveau des umliegenden, nicht betroffenen Gewebes und ergab dadurch ein im Vergleich zur Spalthauttransplantation kosmetisch verbessertes Ergebnis. Auch die Funktionalität der neu gebildeten Haut zeigte sich, gemessen an der Dehnbarkeit sowie Rückstellendenz, erhöht.

Die später einsetzende Wundheilung bei Patient 2 lässt sich neben dem höheren Lebensalter außerdem auf nur einen erfolgten Sprühversuch zurückführen. Im Vergleich zu Patient 2 wurde bei Patient 1 sechs Tage nach dem ersten Sprühversuch eine weitere Transplantation vorgenommen, sodass die Anzahl an Keratinozyten auf dem Wundgrund von Patient 1 deutlich erhöht war und sich durch ein beschleunigtes Einsetzen der Wundheilung zeigte. Nach dem makroskopisch sichtbaren Auftreten von Keratinozyten-Inseln zeigte sich die Wundheilung bei Patient 2 im Vergleich zu Patient 1 allerdings deutlich beschleunigt und verbessert. Grund dafür könnte, neben der geringeren Komorbidität, die sieben Tage vor dem Sprühversuch erfolgte Applikation von PRF auf den Wundgrund sein. Durch die geringe Anzahl an Patienten sowie den großen Unterschied bezüglich ihres Alters, der Wundausdehnung und ihres Gesundheitszustands lässt sich daraus kein eindeutiger Vorteil für das eine oder andere zwei- bzw. mehrzeitige Vorgehen bei der Applikation von Keratinozyten im Co-Delivery-Verfahren ableiten. Dennoch lassen die Ergebnisse ein durch erhöhte Zellzahl beschleunigtes Einsetzen der Wundheilung sowie eine generell verbesserte Wundheilung unter dem weiteren Einbezug von PRF vermuten. Dies unterstützt die Wichtigkeit einer infektfreien Wunde sowie der immensen Bedeutung des PRF. Durch die bereits erwähnte

Ausschüttung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren^{36,41,50} haben die im Anschluss aufgesprühten Keratinozyten vermeintlich bessere Bedingungen zum Anwachsen.

Um eine Empfehlung für ein definitives Vorgehen bei der Therapie von chronischen Wunden im Co-Delivery-Verfahren aussprechen zu können, muss eine breit angelegte klinische Studie erfolgen.

Die Hospitalisierungsdauer von mehr als 60 Tagen bis zum vollständigen Verschluss der Wunde ist neben dem ausgedehnten Ausgangsbefund auch der Komorbidität sowie dem Alter der Patienten geschuldet.

Die allgemeinen Ressourcen für die Wundheilung^{7,33} sowie die Durchblungsverhältnisse¹⁰ stellen sich im Alter reduziert dar, sodass die zwar langsame, aber komplikationslose Abheilung des Defekts als Erfolg angesehen werden kann.

Die klinische Handhabung des Systems sowie Wundbehandlung nach dem Sprühversuch zeigten sich erfreulich unkompliziert, sodass nach erfolgreichem Anwachsen der aufgesprühten Keratinozyten auch eine ambulante Weiterbehandlung denkbar wäre.

Problematisch zeigte sich zunächst der Wundverband unmittelbar nach Applikation auf den Wundgrund. Durch die direkte Anlage eines Wundverbands würde die noch nicht vollständig polymerisierte Fibrin-Keratinozyten-Matrix zum großen Teil am Verband kleben. Hier zeigten sich das Abwarten der Polymerisation und die anschließende Abdeckung mit Mepitel® sowie Umwicklung als probate Mittel.

Die Qualität der neu gebildeten Haut war auf dem Niveau der umliegenden defektfreien Haut und zeigte keine qualitativen Nachteile, sodass von einer anatomisch-histologisch³⁵ korrekten Hautbildung ausgegangen werden kann. Durch die physiologisch induzierte Wundheilung, ohne Einsatz von Spalthaut oder Fremdmaterial, konnte der Wundgrund zudem vollständig von unten nach oben abheilen. Insgesamt erwies sich die Therapie für einen ersten individuellen Heilversuch als sehr vielversprechend für die Behandlung einer chronischen Wunde. Um den therapeutischen Benefit gegenüber aktuell gängigen Therapieverfahren zu ermitteln, würde sich zudem eine randomisierte Studie anbieten.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die durch den demografischen Wandel ständig ansteigende Inzidenz an Patienten mit chronischen Wunden stellt ein großes gesellschaftliches und gesundheitsökonomisches Problem dar. Die Spalthauttransplantation stellt durch das operationsbedingte Entstehen einer neuen Wundfläche häufig keine optimale Behandlungsoption dar, sodass das oberste Ziel die kausale Wundtherapie sein sollte. Kommt es dennoch zur Ausbildung einer chronischen Wunde, stehen verschiedene Systeme zur Behandlung zur Verfügung. So führt unter anderem die Applikation von plättchenreichem Fibrin auf den Wundgrund zu einer verbesserten Granulation und Epithelialisierung.

Ziel dieser Arbeit ist es, die PRF-Applikation mit autolog kultivierten Keratinozyten zu kombinieren, um so eine verbesserte Wundheilung zu erreichen und eine neue Behandlungsmöglichkeit bei Patienten mit chronischen Wunden zu schaffen. Um eine breite klinische Anwendung zu ermöglichen, steht die Optimierung und Beschleunigung des Isolierungsverfahrens von Keratinozyten im Mittelpunkt dieser Dissertation.

Dazu wurden versuchsweise in Lokalanästhesie kleine Hautproben vom Oberschenkel der Patienten entnommen und im Labor kultiviert. Durch Erfahrungen anderer Protokolle sowie eigene Ergebnisse wurde ein neues Isolierungsprotokoll entwickelt. Die korrekte Differenzierung der Zellen konnte molekularbiologisch bestätigt werden. Nach histologischer Auswertung zeigten sich eine gleichmäßige Verteilung und Vitalität der im Co-Delivery-Verfahren aufgesprützten Zellen. In einem letzten Schritt erfolgten zwei individuelle Heilversuche am Patienten.

Die Ergebnisse zeigen die erfolgreiche Optimierung und Verbesserung der Keratinozyten-Isolierung. Die Fragestellungen bzw. Ziele bezüglich der Verkleinerung der am Patienten zu entnehmenden Hautprobe, des verbesserten sowie regelhaften Anwachsens der isolierten Keratinozyten und vor allem der Verkürzung der Kultivierungsdauer in Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung bei Patienten mit chronischen Wunden konnten positiv beantwortet werden.

Der individuelle Heilversuch am Patienten konnte eine deutliche Verkleinerung der Wundfläche auf Niveau der intakten Haut zeigen. Zudem traten keine Infektionen auf, sodass die Applikation von Keratinozyten im Co-Delivery-Verfahren mit PRF eine vielversprechende alternative Therapieoption bei chronischen Wunden darstellt.

Ziel nachfolgender Forschungen sollte es daher sein, die in dieser Arbeit erreichten Ergebnisse weiter in Richtung regelhafter klinischer Anwendung auszurichten.

Als nächster Schritt würde sich ein *In-vitro*-Sprühversuch mit enzymatischer Auflösung des Fibrins und histologischer Auswertung anschließen, um die Ausbildung einer korrekten Hautschichtung nachzuweisen. Zudem sollte der Vorteil einer Hinzunahme vitaler Fibroblasten während der Anzucht der Keratinozyten untersucht werden. Auch die Entnahme der Hautzellprobe mit einem größeren Abstand zur chronischen Wunde sollte untersucht werden.

Weitere Fragestellungen drehen sich unter anderem um die unterschiedlichen Auswirkungen der PRF-Konzentration auf die Wundheilung, den optimalen Ablauf eines zwei- oder mehrzeitigen Vorgehens während der Therapie im Co-Delivery-Verfahren, die genaue Untersuchung und Aufzeichnung der Wundheilung unter der neuen Therapie sowie die histologische Untersuchung der neu gebildeten im Vergleich zur intakten Haut durch eine Probenentnahme.

Im weiteren Verlauf sollte eine randomisierte klinische Studie an Patienten mit chronischen Wunden durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob die neue Therapie einen signifikanten Vorteil gegenüber den bisherigen therapeutischen Verfahren hat. Des Weiteren müssen der mögliche Anwendungsbereich sowie das geeignete Patientenkontingent ermittelt werden.

Langfristig sollte zudem an die Möglichkeit eines Einsatzes von allogenen oder xenogenen Keratinozyten gedacht werden. Dadurch könnte die Keratinozyten-Isolierung aus einer Patientenprobe wegfallen und eine damit deutlich schnellere Bereitstellung der Therapie erzielt werden. Zudem lässt sich in Zukunft möglicherweise ein industrielles Produkt zur Verbesserung der Wundheilung und Defektdeckung entwickeln, wie z.B. ein Sprühpflaster mit Keratinozyten.

8 Literaturverzeichnis

1. Arenth, K. P., Blome, M., Schneider, C. & Ockert, D. Autologes thrombozytenreiches Fibrin – eine neue Möglichkeit zur Wundtherapie bei komplizierten chronischen Wunden . (2009).
2. Armstrong, D. G., Lavery, L. a & Consortium, D. F. S. Negative pressure wound therapy after partial diabetic foot amputation: a multicentre, randomised controlled trial. (Lancet, 2005).
3. Asmussen, P. D. & Söllner, B. Die Prinzipien der Wundheilung: Wundtypen, Wundheilungsvorgänge und Wundheilungsstörungen. (CM Medienverlag, 2010).
4. Auxenfans, C. *u. a.* Cultured allogenic keratinocytes for extensive burns: A retrospective study over 15 years. (Burns, 2014).
5. Behrends, J., Bischofberger, J. & Deutzmann, R. Duale Reihe Physiologie. (Georg Thieme Verlag, 2012).
6. Bleese, N., Mommsen, U. & Schumpelick, V. Kurzlehrbuch Chirurgie. (Georg Thieme Verlag, 2010).
7. Burckhardt, M. S3-Leitlinie zur Lokalthherapie chronischer Wunden (Zeitschrift für Wundheilung, 2012).
8. Clement, A. L., Moutinho, T. J. & Pins, G. D. Micropatterned dermal-epidermal regeneration matrices create functional niches that enhance epidermal morphogenesis. (Acta Biomater, 2013).
9. Danzer, S. Chronische Wunden: Beurteilung und Behandlung. (Kohlhammer, 2014).
10. Deutsche Gesellschaft für Angiologie & Gesellschaft für Gefäßmedizin. S3-Leitlinien pAVK. (2015).
11. Deutsche Diabetes Gesellschaft. Typ-2-Diabetes Präventions- und Behandlungsstrategien für Fußkomplikationen (2010).
12. Deutsche Gesellschaft für Phlebologie. AWMF Leitlinie: Diagnostik und Therapie des Ulcus cruris venosum. (2009).

13. Enoch, S. & Price, P. Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. (World Wide Wounds, 2004).
14. Eppley, B. L., Pietrzak, W. S. & Blanton, M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. (Plast. Reconstr. Surg.,2006).
15. Esteban-Vives, R. *u. a.* In vitro keratinocyte expansion for cell transplantation therapy is associated with differentiation and loss of basal layer derived progenitor population. (Differentiation, 2015).
16. Foster, T. E., Puskas, B. L., Mandelbaum, B. R., Gerhardt, M. B. & Rodeo, S. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. (Am. J. Sports Med., 2009).
17. Gauglitz, G. Histologische und funktionelle Charakterisierung von primären Keratinozytenkulturen aus dem Läsionsgebiet schwerstverbrannter Patienten. (Ludwig-Maximilians-Universität München, 2007).
18. Gerken, H. F. Etablierung der funktionellen Charakterisierung von primären Keratinozyten aus adulter Epidermis zur Untersuchung der Funktion des Transkriptionsfaktors PPAR δ in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris zur. (Charité Berlin, 2011).
19. Graefe, K.-H., Lutz, W. K. & Bönisch, H. Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie (Georg Thieme Verlag, 2016).
20. Hach, W., Gruss, J. D., Hach-Wunderle, V. & Jünger, M. VenenChirurgie: Leitfaden für Gefäßchirurgen, Angiologen, Dermatologen und Phlebologen. (Schattauer, 2007).
21. Harper, D., Young, A. & McNaught, C. E. The physiology of wound healing. (Surg. ,2014).
22. Henne-Bruns, D. Duale Reihe Chirurgie. (Georg Thieme Verlag, 2012).
23. Herdegen, T. Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie. (Georg Thieme Verlag, 2008).
24. Kakudo, N., Kushida, S., Minakata, T., Suzuki, K. & Kusumoto, K. Platelet-rich plasma promotes epithelialization and angiogenesis in a split-thickness skin graft donor site. (Med. Mol. Morphol., 2011).

25. Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie UKSH Campus Kiel. Bild: Vakuumverband.
26. Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie UKSH Campus Kiel. Bild: PRF-Therapie - Polymerisation.
27. Knebel, D. J. Kontrolle der Stratifizierung und terminalen Differenzierung von Keratinozyten durch dermale Faktoren. (Justus-Liebig Universität Giessen, 2006).
28. Knighton, D. R., Hunt, T. K., Thakral, K. K. & Goodson, W. H. Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. (Ann. Surg., 1982).
29. Kondo, T. & Ishida, Y. Molecular pathology of wound healing. (Forensic Sci. Int., 2010).
30. Lang, G. Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. (Springer Vienna, 2013).
31. Lawrence, W. T. Physiology of the acute wound. (Clin. Plast. Surg., 1998).
32. Li, A. et al. Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny. (J. Clin. Invest., 2004).
33. Lobmann, R., Schultz, G. & Lehnert, H. Molekulare Grundlagen der Wundheilung bei diabetischem Fußsyndrom. (Medizinische Klinik, 2003).
34. Löndahl, M. *u. a.* Use of an autologous leucocyte and platelet-rich fibrin patch on hard-to-heal DFUs: a pilot study. (J. Wound Care, 2015).
35. Lüllmann-Rauch, R. Taschenlehrbuch Histologie. (Georg Thieme Verlag, 2012).
36. Lundquist, R., Dziegiel, M. H. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. (Wound Repair Regen, 2008).
37. McCartan, B. & Dinh, T. The Use of Split-Thickness Skin Grafts on Diabetic Foot Ulcerations: A Literature Review. (Plastic Surgery International, 2012).
38. Molcare Consulting. Bild: Schema menschliche Epidermis /HE Färbung Epidermis.
39. Moll, I. Dermatologie. (Georg Thieme Verlag, 2010).
40. Naik, B., Karunakar, P., Jayadev, M. & Marshal, V. R. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. (J. Conserv. Dent., 2013).

41. O'Connell, S. M., Hessler, K. & Dardik, H. Platelet-Rich Fibrin Matrix in the Treatment of Chronic Leg Ulcers. (Adv. wound care, 2012).
42. Praxisklinik Sauerlach & Holzheimer, R. G. Bild: Hoch Stadium II: Dermatoliposklerose.
43. Protz, K. & Timm, J. H. Moderne Wundversorgung. (Elsevier, 2014).
44. Rabe, E. u. a. Bonner Venenstudie der Deutschen Gesellschaft für Phlebologie. (Phlebologie, 2003).
45. Rabe, E. u. a. Therapy with compression stockings in Germany - results from the Bonn Vein Studies. (Dtsch. Dermatol. Ges., 2013).
46. Rassner, G. Dermatologie: Lehrbuch und Atlas. (Elsevier, 2009).
47. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. & Deutzmann, R. Duale Reihe Biochemie. (Georg Thieme Verlag, 2012).
48. Rheinwald, J. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cell isolates. (Cell, 1975).
49. Roland, J. T. E. Gel Elektrophorese Konzentrationen. Verfügbar unter: <http://www.cytographica.com/lab/acryl2.html>.
50. Roy, S. u. a. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. (Wound Repair Regen, 2011).
51. Rüttermann, M., Maier-Hasselmann, A., Nink-Grebe, B. & Burckhardt, M. Local treatment of chronic wounds: in patients with peripheral vascular disease, chronic venous insufficiency, and diabetes. (Dtsch. Arztebl. Int., 2013).
52. Sarkar, R. Bild: Übersicht chronisch venöse Insuffizienz.
53. Schäffer, M. & Becker, H.-D. Immunregulation der Wundheilung. (Wund Forum , 2000).
54. Shimizu, R. & Kishi, K. Skin graft. (Plast. Surg. Int., 2012).
55. Sinis, N. Bild: Vollhauttransplantat. Verfügbar unter: <http://www.sinis-plastische-chirurgie.de/perforatorlappenplastiken-fuer-die-brustrekonstruktion-nach-brustkrebs/>.
56. Steenvoorde, P., van Doorn, L. P., Naves, C. & Oskam, J. Use of autologous platelet-rich fibrin on hard-to-heal wounds. (J. Wound Care, 2008).

57. Sterry, W. Kurzlehrbuch Dermatologie. (Georg Thieme Verlag, 2011).
58. Thieme. Bild: Spalthauttransplantat. Verfügbar unter:
<https://www.thieme.de/de/pflege/chirurgische-behandlung-schwer-brandverletzter-9550.htm>.
59. Tzeng, Y. S. *et al.* Treatment of nonhealing diabetic lower extremity ulcers with skin graft and autologous platelet gel: A case series. (Biomed Res. Int., 2013).
60. Uniklinik Balgrist - Zürich. Bild: Unterschenkel Amputation.
61. Weinstein, G. D., McCullough, J. L. & Ross, P. Cell proliferation in normal epidermis. (The Journal of investigative dermatology, 1984).
62. Xian, L. J., Roy Chowdhury, S., Bin Saim, A. & Bt Hj Idrus, R. Concentration-dependent effect of platelet-rich plasma on keratinocyte and fibroblast wound healing. (Cytotherapy, 2015).
63. Yang, H. S. *u. a.* Enhanced skin wound healing by a sustained release of growth factors contained in platelet-rich plasma. (Exp. Mol. Med., 2011).
64. Yazawa, M. *u. a.* Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. (Cell Transplant., 2003).
65. Zhao, G. *u. a.* Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. (Adv. wound care, 2013).
66. Zutt, M., Haas, E., Krüger, U., Distler, M. & Neumann, C. Successful use of vacuum-assisted closure therapy for leg ulcers caused by occluding vasculopathy and inflammatory vascular diseases - A case series. (Dermatology, 2007).

9 Danksagung

„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken“

(Johann Wolfgang von Goethe)

Dennoch möchte ich an dieser Stelle einige Worte des Danks an zahlreiche Personen und Institutionen für die vielfältig erfahrene Hilfe richten. Ohne diesen Rückhalt hätte meine Dissertation so nicht realisiert werden können.

Herrn Prof. Dr. Jochen Cremer, als Chefarzt der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich für die Erlaubnis zur Durchführung der Arbeit, Nutzung der Räumlichkeiten sowie für die Genehmigung und Bereitstellung der benötigten Materialien.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. Justus Groß, der meine Arbeit stets mit viel Verständnis, Enthusiasmus und eigener Begeisterung unterstützt und vorangetrieben hat.

Ausgiebig bedanken möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Herrn Dr. Rouven Berndt für die gute Begleitung über den gesamten Zeitraum des Projekts. Durch sein großes Engagement, seine fachlichen Hinweise und seinen Optimismus auch in schwierigen Wochen, hat er wesentlich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen.

Für zahlreichen Beistand und ein ständig offenes Ohr bin ich besonders Frau Beke Sarrahs, Frau Dr. Jessica Haupt und Frau Birgit Pieper aus der Forschungsabteilung der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel verbunden.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Markus Siggelkow für die inhaltliche Ausrichtung und thematische Eingrenzung.

Mein besonderer Dank gilt vielen Freunden, die mich im fachlichen Austausch gewinnbringend weitergebracht haben. Schließlich ganz besonders auch meiner Familie, die mir in all den Jahren vielseitig stützend zur Seite gestanden hat.

Anhang - *Veröffentlichungen*

Vortrag

31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin
Münster, 16. - 19.09.2015

Thema:

„Autologe menschliche Keratinozyten Hautzell-Transplantation:
Eine neue Strategie für die klinische Anwendung in Verbindung
mit Fibrin“

S.Kleen*, J. Boldt*, B. Sarrahs*, B. Pieper*, A. Bayer*, R. Berndt*, A. Metzner*,
J. Cremer*, J. Groß*

Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, UKSH – Campus Kiel