



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Lehrstuhl für Plastische Chirurgie und Handchirurgie

(Direktor: Prof. Dr. H.-G. Machens)

**Gewinnung und Analyse Hypoxie-induzierter Faktoren
aus humanen peripheren Blutzellen
zur Induktion von Angiogenese und Zellmigration**

Anna-Theresa Bauer

Vollständiger Abdruck von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr.med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. A. F. Schilling
2. Prof. Dr. St. E. Combs

Die Dissertation wurde am 24.10.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.07.2018 angenommen.

Meinen Großmüttern Anna und Theresia gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Vorfeld in Fachzeitschriften und auf Kongressen publiziert. Eine Auflistung aller in Zusammenhang mit dieser Arbeit entstandenen Publikationen und Vorträge ist im Anhang unter Publikationen aufgeführt. Es besteht und bestand kein Interessenskonflikt bei der Testung und Auswahl klinisch gebräuchlicher Wundartikel.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Grundlagen physiologischer Wundheilung	1
1.1.1 Exsudationsphase.....	2
1.1.2 Granulations-/Proliferationsphase.....	3
1.1.3 Regenerations-/Reparationsphase	4
1.1.4 Remodellierungsphase	5
1.2 Angiogenese als der Schlüssel zur Wundheilung	5
1.2.1 Stimulation der Angiogenese durch Hypoxie	6
1.2.2 Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese	7
1.3 Rolle der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) in der Wundheilung.....	11
1.3.1 Vorkommen und Gewinnungsmöglichkeit der PBMCs.....	11
1.3.2 Periphere Blutzellen als Kandidaten für die autologe Wundheilung	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 Materialien und Methoden.....	14
2.1 Zellgewinnung und Zellkultur unter Normoxie vs. Hypoxie	14
2.2 Screening angiogener Faktoren mittels Proteome Profiler Array™ ..	15
2.3 Quantifizierung pro- und anti- angiogener Faktoren mittels ELISA ..	16
2.4 Analyse der Faktor-Expression im temporären Verlauf	17
2.5 Analyse der Auswirkungen von Hypoxie auf die Zellkulturen	17
2.5.1 LDH-Viability-Test.....	18
2.5.2 pH-Test.....	19
2.6 Analyse des Einflusses des Scaffold Materials auf die Faktorproduktion.....	20
2.7 Analyse von Wundaufgaben zur Speicherung und Freisetzung von VEGF.....	21

2.7.1	Gelartige und feste Wundauflagen	23
2.7.2	Microsphere Carrier	25
2.8	Tube formation Assay zur Darstellung der Angiogenese <i>in vitro</i>	27
2.9	Invasion Assay zur Darstellung der Zellmigration <i>in vitro</i>	28
2.10	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Wundauflagen ...	28
2.11	Statistische Auswertung der Daten.....	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Faktorproduktion der peripheren Blutzellen unter Normoxie und Hypoxie.....	30
3.2	Quantifizierung angiogener Faktoren und Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie	32
3.3	Unterschiede der Faktorproduktion im temporären Verlauf	33
3.4	Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf Zell-Viabilität und pH-Wert.....	34
3.5	Einfluss des Materials und des Elastizitätsmoduls auf die Faktorexpression	35
3.6	Unterschiede der Wundauflagen in der Speicherung und Freisetzung von VEGF	38
3.7	Angiogenes Potenzial der Faktoren <i>in vitro</i>	40
3.7.1	Floureszenzmikroskopische Bilder des Tube formation Assays.....	41
3.7.2	Invasion Assay	46
3.7.3	Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Wundauflagen	50
4	Diskussion	52
4.1	Das <i>in vitro</i> Modell der Wundheilung	52
4.1.1	Periphere Blutzellen unter hypoxischer Stimulation	56
4.1.2	Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Faktorproduktion	60
4.2	Klinische Wundauflagen als bioaktive Trägermaterialien.....	62
4.2.1	Unterschiedliche Stimulation der Faktorproduktion durch die klinischen Wundauflagen	63
4.2.2	Angiogenes Potenzial der zellfreien Überstände aus den kultivierten Wundauflagen.....	64
4.3	Therapeutische Angiogenese und Ziel der Translation.....	66
4.3.1	Hypoxische Konditionierung von peripheren Blutzellen <i>in vitro</i>	68
4.3.2	Ausblick auf die Translation der bioaktiven Wundauflagen	69
5	Zusammenfassung.....	71

6	Publikationen	73
6.1	Originalarbeiten	73
6.2	Vorträge/Abstracts	74
7	Danksagung	76
8	Literaturverzeichnis	77

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abb. 1: Wundsimulationsmodell <i>in vitro</i> zur Stimulierung der Blutzellen zur Produktion von angiogenen Faktoren unter Normoxie und Hypoxie.....	15
Abb. 2: Schematische Darstellung der Faktor-Extraktion aus Wundauflagen	26
Abb. 3: (A) Quantifizierung pro-angiogener Faktoren unter Normoxie und Hypoxie (B) Quantifizierung anti-angiogener Faktoren unter Normoxie und Hypoxie (C) Quantifizierung matrix- modulierender Faktoren unter Normoxie und Hypoxie	31
Abb. 4: (A) VEGF-Konzentrationen im Vergleich Normoxie und Hypoxie (B) Angiogenin Konzentrationen im Vergleich Normoxie und Hypoxie (C) Thrombospondin-1-Konzentration im Vergleich Normoxie und Hypoxie	32
Abb. 5: Temporärer Verlauf der Sekretion von VEGF, Angiogenin, Thrombospondin-1 und Interleukin-8-Konzentrationen unter Normoxie und Hypoxie	33
Abb. 6: (A) Zellviabilität unter Normoxie und Hypoxie und (B) pH-Wert im zeitlichen Verlauf	35
Abb. 7: (A) Einfluss verschiedener Scaffold Materialien auf die VEGF-Produktion in peripheren Blutzellen (B) Einfluss von Collagen und PET auf die Faktorenexpression Angiogenin, Thrombospondin-1 und Interleukin-8 in peripheren Blutzellen.	36
Abb. 8: Übersicht der Expression von EZM-assoziierten Proteinase von PBMC auf unterschiedlichen Scaffold Materialien	37
Abb. 9: Unterschiedlich feste Collagen-Hydrogele bewirken eine signifikant unterschiedliche VEGF Produktion der kultivierten Blutzellen.....	38
Abb. 10: VEGF-Konzentration nach Aufnahme und Abgabe aus den gelartigen (grau) und festen (schwarz) Wundauflagen	39
Abb. 11: VEGF-Konzentration (pg/ml) aus den Microsphere Carriers nach 12, 24, 36 und 48 Stunden Inkubationszeit.....	40
Abb. 12: Fluoreszenzfärbung Calcein-AM der Tube formation nach 12 h in 5 x Vergrößerung von AIM Kontrolle (A) und HUVEC Medium (B)	

	sowie der Gelwundauflagen Collagen Gel (C) und Hydrosorb Gel® (D) und Polyhexanid Gel® (E) und Fibrin Gel® (F)	43
Abb. 13:	Floureszenzfärbung Calcein-AM der Tube formation nach 12 h in 5 x Vergrößerung: Nu Derm (A), Permafoam (B) , Aquacel (C) und Mepilex (D) Collagen/Collagen coated beads (E) Pronectin coated beads (F).	44
Abb. 14:	Durchschnittliche Anzahl der Nodes, Tubules und Länge der Tubules pro Gesichtsfeld.....	45
Abb. 15:	Durchschnittliche Anzahl der Tubules, Nodes und Längen der Tubules der Microsphere Carrier in logarithmischer Darstellung.	45
Abb. 16:	Invasion Assay nach Färbung in 5 x nach 24 h: Collagen Gel (A) Hydrosorb™ Gel (B), Polyhexanid™ Gel (C), Fibrin Gel (D)	47
Abb. 17:	Invasion Assay nach Färbung in 5-fach Vergrößerung nach 24h: Mepilex™ (A), Permafoam™ (B), Nu-Derm™ (C), Aquacel™ (D), Collagen Beads (E) und Pronectin Beads (F).....	48
Abb. 18:	Induzierte Zellmigrationsraten durch die Überstände der Kulturen mit gelartigen Wundauflagen (A), sowie festen Wundauflagen (B) und der Microsphere Carrier Beads (C) im Verhältnis zu AIM	49
Abb. 19:	Mepilex® Border im Rasterelektronenmikroskop.....	50
Abb. 20:	Aquacel extra™ im Rasterelektronenmikroskop	51

Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tab. 1: Übersicht über die Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese ..	8
Tab. 2: Inhibitoren der Angiogenese und ihre Funktionen	10
Tab. 3: Übersicht der getesteten Wundauflagen.....	22

Abkürzungsverzeichnis

AIM	Serum freies Medium von Invitrogen®
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
DMEM	Dulbecco'S Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM/EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotheliale Stickstoff Monoxid Synthase
FGF	Fibroblast Growth Factor
GPIb/IX	Glykoprotein Ib/IX
HIF-1	Hypoxia Inducing Factor 1
HUVECS	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IGF-1	Insulin like Growth Factor 1
IGFBP	Insulin like Growth Factor binding Protein
IL-8	Interleukin-8
MMPs	Matrix-Metallo-Proteinasen
Pa	Pascal (SI Einheit)
PAF	Platelet Activating Factor
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
ml	Milliliter
SF	Serum frei
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PET	Polyethylen
PF- 4	Platelet Factor 4
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	Von Willebrand Faktor

1 Einleitung

Die Wundheilung des Menschen ist ein wichtiges Themengebiet in der Medizin, da sie die Voraussetzung zur vollständigen Wiederherstellung des Körpers nach Operationen oder nach Traumata bildet (29). Ob eine Wunde gut und vollständig heilt, oder ob sich Komplikationen ergeben, hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab (92,76,75). Ein gut durchblutetes Gewebe heilt in der Regel besser als schlecht durchblutetes Gewebe (43).

1.1 Grundlagen physiologischer Wundheilung

Die primäre Wundheilung ist ein komplexer Stoffwechselfvorgang, der ein reibungsloses Zusammenspiel von zellulären und extrazellulären Komponenten beansprucht (65,186). Das Ziel jeder Wundheilung ist die morphologische und funktionelle Reparation zerstörten Gewebes (74). Um die Probleme einer pathologischen Wundheilung, sogenannte Wundheilungsstörungen, zu verstehen, muss man die Grundlagen der physiologischen Wundheilung näher beleuchten. Jegliche Verletzung der Haut führt zu Zellnekrosen in der Epidermis und der Dermis, sowie zur Eröffnung von Blutgefäßen (162). Diese Verletzung des Gefäßendothels ist der Auslöser für die primäre Hämostase und für die Einleitung der physiologischen Wundheilung (56). Durch das Einströmen des Blutes kommt es zu einem Eindringen von Thrombozyten, Leukozyten und Monozyten in den Gewebsspalt. Diese Zellen dienen nicht nur der Entfernung von zellulärem Debris, sondern stellen auch einen wichtigen Speicher für Zytokine und Wachstumsfaktoren (42) dar, die für den Ablauf der Wundheilungsphasen entscheidend sind (12). Die primäre Wundhei-

lung erfolgt in mehreren Phasen, die sich teilweise überlappen oder parallel ablaufen (59). Die Exsudationsphase, die Granulationsphase, die Regenerationsphase und die Remodellierungsphase führen unter physiologischen Bedingungen zur vollständigen Wundheilung.

1.1.1 Exsudationsphase

Bei der Verletzung eines Gefäßes werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt, an welchen sich die Thrombozyten mithilfe, des vom Endothel gebildeten Von-Willebrand-Faktors (vWF) anheften (75). Dieser bildet zusammen mit Fibronectin und Laminin eine Brücke zwischen Kollagenfasern und dem Rezeptorkomplex GPIIb/IX auf der Thrombozytenoberfläche (40).

Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Sekretion der Proteine aus den Thrombozytengranula (u.a. Fibrinogen, Fibronectin, Thrombospondin-1, TGF- β , PDGF, bFGF) und zur Anlagerung weiterer Thrombozyten (40).

Außerdem bilden aktivierte Thrombozyten Vasokonstriktoren wie Thromboxan A₂ und Platelet Activating Factor (PAF), die synergistisch mit dem Hormon Serotonin eine Vasokonstriktion der verletzten Gefäßregion bewirken (130). Durch die Thrombozytenaggregation und die Vasokonstriktion kommt es zur Bildung des „weißen Thrombus“ (190). Diese primäre Hämostase bewirkt den ersten provisorischen Wundverschluss (15). In der Exsudationsphase findet ebenfalls eine Aktivierung des Immunsystems statt (154,149), weshalb sie auch als Inflammationsphase bezeichnet wird. Dies geschieht über die molekularen Wechselwirkungen von Immunzellen und Zytokinen (142), die von den Thrombozyten freigesetzt werden (130).

Durch die Bildung eines Fibrinnetzes wird der initiale Thrombus widerstandsfähig und da sich in das Fibrinnetz auch Erythrozyten einlagern als „roter Thrombus“ bezeichnet (61). Diese sekundäre Hämostase resultiert in der Bildung von mechanisch stabilem Fibrin, welches ein Verkleben aneinander liegender Wundränder ermöglicht (158). Im Verlauf dieser mehrtägigen Phase nimmt die Mitoserate im Wundgebiet zu (21). Die Zellen des mononukleären Phagozytose-Systems (MPS) wandern ein und proliferieren, ebenso wie die ortständigen Fibroblasten (105).

1.1.2 Granulations-/Proliferationsphase

Die Granulationsphase ist gekennzeichnet durch die Bildung von Granulationsgewebe durch Proliferation der zuvor eingewanderten Fibroblasten, deren Migration durch Fibrin, Fibronectin, Vitronectin und Hyaluronsäure der Extrazellulären Matrix (EZM) geleitet wird (38).

Zur Erleichterung der Migration werden Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gebildet welche Bestandteile der EZM spalten können (131).

Ihre Gegenspieler, wie z.B. die Proteine der Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) Gruppe, dienen dazu, das Gegengewicht herzustellen, was im physiologisch gesunden Gewebe gelingt (165). Hypertrophe Narben, Keloide und andere fibrotische Erkrankungen sowie chronische Wundheilungsstörungen sind mit einer gestörten Ratio von TIMPs zu MMPs gekennzeichnet (38).

Die Fibroblasten produzieren die EZM mit kollagenen Bindegewebsfasern (101). Der Prozess ist zeitlich sehr variabel und unterliegt dem Einfluss zahlreicher Wachstumsfaktoren (128).

Zugleich kommt es zu einem Abbau des Fibrinnetzes durch Plasmin und zur Neovaskularisation (109). Die Durchblutung des Granulationsgewebes spielt hierbei eine wichtige Rolle für den Fortschritt der Wundheilung (39). Die Angiogenese wird durch die in der Wunde herrschenden Bedingungen (erniedrigter pH-Wert, erhöhter Laktatgehalt sowie Hypoxie) beeinflusst, sowie durch eine Vielzahl von angiogenen Faktoren, z. B. durch VEGF, FGF, Angiopoetin, oder TGF- β (109). Die neu gebildeten Kapillaren sind zunächst, durch VEGF stimuliert (129), eher porös und zart sowie durchlässig, nehmen aber im Verlauf an Stärke und Widerstandsfähigkeit zu. Abhängig von der Wundgröße dauert diese Phase bis zur Ausbildung von Granulationsgewebe wenige Stunden bis mehrere Tage (109,173). Die Granulationsphase ist gekennzeichnet durch die Proliferation von Kapillaren und Fibroblasten und leitet die Reparationsphase ein (173,101).

1.1.3 Regenerations-/Reparationsphase

Die Umwandlung des Granulationsgewebes in Narbengewebe erfolgt durch den zunehmenden Ersatz von Granulationsgewebe durch stabile Kollagenfasern sowie durch Epithelisierung der Oberfläche (62). Diese Phase kann bis zu mehrere Wochen in Anspruch nehmen (173).

In der Narbenregion wird zunächst Typ-III-Kollagen gebildet, welches im Verlauf durch Typ-I-Kollagen ersetzt wird (170). Da vorwiegend Kollagenfasern gebildet werden, verfügt das Narbengewebe über eine geringe Elastizität (48). Der Durchmesser einer Granulationsfläche schließt sich zu einem Drittel durch Schrumpfung, zu zwei Dritteln durch Neo-Epithelisierung (116).

Aus der Basalzellschicht der Epidermis differenziert sich ein mehrschichtiges Neo-Epithel, welches aber im Gegensatz zur physiologischen Epidermis zunächst über keine Melanozyten und Hautanhangsgebilde verfügt (62). Eine unkomplizierte Wundheilung mit nur geringer Narbenbildung wird als *Heilung per primam intentionem* bezeichnet. Primäre Wunden epithelisieren meist innerhalb von 6–12 Tagen und haben eine geringe Narbenbildung zur Folge (99).

1.1.4 Remodellierungsphase

Nach Abschluss der Reparationsphase bedeckt eine Schicht von Epithelzellen das noch unfertige Bindegewebe. Diese einfache Epithelisierung beginnt bei kleinen Wunden bereits wenige Stunden nach der Läsion (175) vom Wundrand aus. Die Fibroblasten beginnen sich in Myofibroblasten umzuwandeln und es erfolgt die Kontraktion des Gewebes und die Maturation in Narbengewebe (79). Die maximale Zugfestigkeit erhält die Wunde erst nach 8 Wochen (106). Die Wundheilung und Narbenbildung kann Monate bis Jahre in Anspruch nehmen, bis die Narbe eingesunken und verblasst ist (65).

1.2 Angiogenese als der Schlüssel zur Wundheilung

Die endgültige Heilung einer Wunde kann nur durch ein funktionierendes Gefäßnetz und die langfristige Adaptation von Blutgefäßen durch sogenannte Angiogenese entstehen (26). Der Angiogenese geht eine Gefäßerweiterung durch die Aktivierung von eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) voraus. Die Gefäßpermeabilität erhöht sich und Plasmaproteine treten aus den Gefäßen in das Gewebe über und bilden Leitbahnen für die später migrierenden Endothelzellen

(4,114). Über 20 verschiedene Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) schaffen durch den Abbau der EZM Raum für die migrierenden Endothelzellen (186).

Im Rahmen des proteolytischen Abbaus der EZM und des Umbaus der bestehenden Gefäßwände kommt es zur sogenannten „Tube formation“, der Ausbildung kleiner Gefäßröhrchen aus Endothelzellen. Unter dem Einfluss von VEGF (129) und FGFs und ihrer Rezeptoren wachsen die Endothelzellen sehr schnell, wobei die Weite der Gefäßlumina durch die kürzeren Splicevarianten von VEGF (VEGF 121 und VEGF 165) und Angiopoetin-1 erhöht und durch VEGF 189 vermindert wird (36). Die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen stellt die Voraussetzung für vollwertige Gefäßwände dar. Die einzelnen Schritte der Angiogenese unterliegen einer kontinuierlichen Kontrolle durch endogene Inhibitoren. So kann z. B. Thrombospondin-1 (TSP-1) die Gefäßbildung inhibieren (32).

1.2.1 Stimulation der Angiogenese durch Hypoxie

Die beiden stärksten Aktivatoren der Angiogenese sind die akute Hypoxie im Gewebe und die Freisetzung aktivierender Faktoren aus der EZM nach einer Verletzung (27). Angiogenese, die für die Behebung der Ischämie notwendig ist, wird durch die Stabilisierung von HIF-1 Alpha Protein (28,104) und der konsekutiven Expression von angiogenen Proteinen wie VEGF, ANGPT2 und vielen weiteren Faktoren eingeleitet (82,127).

Die permanente Hypoxie in peripherem Gewebe stellt eines der großen Probleme der gestörten Wundheilung dar (160,140). Aufgrund der Überstimulation des HIF-1-Alpha Pathways kommt es zu einer überschießenden Fibrosierung ohne adäquate Durchblutung des Gewebes (151,38).

Weiters können lokale Umgebungsbedingungen, wie z.B. bakterielle Kontamination, zu einer Inhibierung der Wundheilung führen. Dadurch bleibt die chronische Wunde im Arrest (186).

1.2.2 Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Ausbildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Kapillaren (62). Sie erfolgt in mehreren Phasen, welche die Migration, Proliferation und Differenzierung von vaskulären Endothelzellen umfassen (45). Dieser Vorgang wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Aktivatoren und Inhibitoren orchestriert (128). Die Tabellen 1 und 2 geben eine Übersicht der bisher bekannten pro- und antiangiogenen Faktoren und ihrer bekannten Eigenschaften und Funktionen:

Tab. 1: Übersicht über die Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese

Aktivatoren der Angiogenese	Funktion
Angiopoietin-1 Angiopoietin-2 (ANG-1/-2)	Stabilisierung der Gefäße durch Verstärkung der Interaktion zwischen Endothel und glatten Muskelzellen, Destabilisierung der Gefäße vor dem Aussprossen und Aktivierung des Tie2 receptor signalling Pathways (172)
Endothelial Nitric-Oxide-Synthase (eNOS)	Angiogenese und Vasodilatation (96)
Fibroblast Growth Factor Hepatocyte Growth Factor Monocyte Chemoattractant Protein-1 (FGF, HGF, MCP-1)	Stimulation der Angiogenese (FGF, HGF) und Arteriogenese (FGF, MCP-1) durch Migration und Infiltration von Monozyten bzw. Makrophagen (109)
Hypoxia-Induced Growth Factor-1 Alpha (HIF-1 Alpha)	Stabilisierung und Aktivierung des HIF Komplexes, Aktivierung der Erythropoetin Expression (u.a.) sowie der Expression von weiteren Angiogenese-Aktivatoren (z. B. VEGF) (28)
Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1)	Förderung der Neovaskularisierung durch Aktivierung von α -Integrinen (28)
Integrine (INT)	Rezeptoren für Matrixmakromoleküle und Proteinasen (z.B. MMP-2) (54)
Interleukin-8 (IL-8)	Kommunikationsvermittlung zwischen Leukozyten und Makrophagen (109)
Interleukin-16 (CXCL 16, IL-16)	Verhinderung endothelialer Migration, Proliferation, Adhäsion, Inhibierung von MMP-2 und MMP- 9 (107)
Matrixmetalloproteinasen (MMPs) Plasminogen Aktivatoren (PA)	Migration und Matrixremodeling; Freisetzung von bFGF und VEGF aus der Matrix, Aktivierung von TGF- β , Bildung von Angiostatin (86)

Fortsetzung Tabelle 1

Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1)	Proteinase-Inhibitor; Stabilisierung entstehender Gefäße durch Verhinderung der Matrixauflösung (28)
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D)	Stimulation der Angiogenese durch Permeabilitätserhöhung {Pepper, (139)}
VE-Cadherin/ PECAM (CD31)	Junktionale Endothelmoleküle; essenziell für das Überleben des Endothels (86)

Unter physiologischen Bedingungen herrscht eine Homöostase der Inhibitoren und Aktivatoren im gesunden Gewebe, sodass Tumorbildung oder inflammatorische Prozesse ausbleiben, aber eine gut funktionierende Durchblutung des Gewebes besteht (96). Das sensible Gleichgewicht zwischen stimulierenden und inhibierenden Angiogenese-assoziierten Faktoren stellt einen kritischen Punkt in der Gefäßneubildung und konsekutiven Wundheilung dar (127).

Tab. 2: Inhibitoren der Angiogenese und ihre Funktionen

Inhibitoren der Angiogenese	Funktion
Angiostatin und verwandte proteolytische Fragmente von Plasminogen	Inhibierung der Viabilität und Migration von Endothelzellen (133)
Endostatin Fragment von Typ XVIII-Kollagen	Inhibierung der Viabilität und Migration von Endothelzellen (133)
Interferon (IFN) α, β, γ , Interleukine IL-4, 12, 18, IP-10	Inhibierung der endothelialen Migration, Downregulierung der bFGF Expression durch IFN α (28)
Plättchenfaktor-4 (PF-4)	Verhindert Bindung von bFGF und VEGF(28)
Prothrombin kringle-2, Antithrombin III-fragment (AT III) (=Fragmente der hämostatischen Faktoren)	Unterdrückung endothelialen Wachstums (28)
Serpine (Alpha1 Antitrypsin, Antithrombin, C1-Inhibitor)	Inhibierung der Serin-Proteasen-Aktivität (16)
Thrombospondin-1(+2) (TSP-1/-2)	Wird produziert von Makrophagen im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen (187)
Tissue-inhibitors of MMP 1,2,3 (TIMPs)	Unterdrückung pathologischer Angiogenese (194)
Tumor Nekrose Factor-Alpha (TNF- α)	Multifunktionales Zytokin; in unterschiedlichen Modellen sowohl stimulierende als auch inhibierende Funktion auf Endothelzellen. <i>In vitro</i> : Inhibierung endothelialer Zellproliferation <i>In vivo</i> : Stimulation von Neovaskularisation (161)
Vasostatin (NH2-Domäne von Calreticulin)	Verhinderung endothelialen Wachstums (189)

1.3 Rolle der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) in der Wundheilung

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wie Makrophagen, Leukozyten und Thrombozyten sind durch das Einströmen von Blut im Falle einer Verletzung, neben den ortsständigen Zellen, die ersten Zellen vor Ort in einer Wunde. Aufgrund ihrer vielfältigen Interaktionen (117,181) spielen sie bei der Wundheilung eine bedeutende Rolle.

Ein Beispiel für die Interaktion zwischen Thrombozyten und Lymphozyten ist der Platelet Activating Factor (PAF), der von Thrombozytengranula freigesetzt wird (15) und chemotaktisch auf Makrophagen und Granulozyten wirkt (30). Das Zusammenspiel vieler Faktoren, die von den Blutzellen freigesetzt werden, ermöglicht den korrekten Ablauf der Wundheilungskaskade (65,148).

1.3.1 Vorkommen und Gewinnungsmöglichkeit der PBMC

Als periphere mononukleäre Zellen des Blutes werden jene Zellen der lymphatischen und myeloischen Zellreihe bezeichnet, welche nach Durchlaufen der Reifungsprozesse im Knochenmark und anderen hämatopoetischen Organen in das periphere Blut ausgeschwemmt werden und überwiegend für die Produktion angiogener Faktoren in einer Wunde verantwortlich sind (44,84). Sie umfassen die lymphatische Population der B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen sowie die Zellen der myeloischen Reihe wie Monozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Durch Zentrifugation von peripherem Blut erhält man eine Trennung der Blutbestandteile in Plasma (55 %), Erythrozyten (45 %) und PBMC, letztere mit einem Anteil von < 1 %

des Gesamtvolumens. Dieser sogenannte „Buffy Coat“ kann durch Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut einfach gewonnen und die Zellen weiter *ex vivo* kultiviert werden (169).

1.3.2 Periphere Blutzellen als Kandidaten für die autologe Wundheilung

Nach einer Verletzung kommt es durch die Eröffnung peripherer Gefäße zum Einstrom frischen Blutes. Die peripheren Blutzellen leiten die erste Phase der Wundheilung durch die primäre Hämostase ein (55). Aufgrund ihres Expressionsmusters angiogener Faktoren stehen sie seit längerer Zeit bereits im Fokus der Wissenschaft. Ziel ist die Isolierung autologer Faktoren aus peripheren Blutzellen zur Wundheilungsverbesserung bei komplizierten Wunden (33,73).

Die einfache Gewinnung mittels peripher venöser Blutabnahme sowie die höchst unwahrscheinliche Infektionsrate und das erwartungsgemäße Ausbleiben einer Immunreaktion machen diese körpereigenen Blutzellen als Donor für Wundheilungsfaktoren in der translationalen Forschung interessant.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Eine große Problematik bei chronischen Wunden stellt die Ischämie des Gewebes und das Fehlen einer adäquaten Angiogenese zur Ausbildung eines stabilen Gefäßnetzes dar (108). Aufgrund der Adaptation der Zellen an die chronische Hypoxie im ischämischen Gewebe findet eine Downregulation der Expression von Angiogenese-assoziierten Faktoren auf molekularer Ebene statt (100 {Komatsu), sodass Gefäßneubildung nicht stattfinden kann (180,195).

Periphere Blutzellen spielen in der Wundheilung eine entscheidende Rolle, indem sie angiogene Faktoren sezernieren und so zur Induktion der Gefäßneubildung im Falle einer Verletzung anregen. Ziel der Arbeit war es, das temporale Expressionsmuster angiogener Faktoren in humanen peripheren Blutzellen in Abhängigkeit normoxischer versus hypoxischer Kulturbedingungen zu vergleichen. Die Beschreibung pathophysiologischer Zusammenhänge zwischen Hypoxie und Faktor-Expression der peripheren Blutzellen stand dabei im Fokus. Außerdem sollten unterschiedliche Umgebungsbedingungen und deren Auswirkungen auf die Faktor-Expression der peripheren Blutzellen *in vitro* untersucht werden. In einem weiteren Schritt sollten verschiedene Typen klinischer Wundauflagen in dem neu etablierten Wundsimulationsmodell getestet werden. Eine zukünftige klinische Translation könnte sich nach *in vitro* Isolation der Faktoren in Form eines bioaktiven Wundverbands für komplexe Wunden ergeben. Die Untersuchungen fanden im Rahmen des von der Ethikkommission genehmigten Votums 497/16 S statt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Zellgewinnung und Zellkultur unter Normoxie vs. Hypoxie

Die Zellgewinnung erfolgte mittels handels- und kliniküblicher steriler Kanülen (BD Vacutainer™ Safety Lock). Es wurden je 10 ml peripheres Blut in EDTA-beschichtete Röhrchen (BD Vacutainer™) von gesunden, freiwilligen, volljährigen Spendern zu Versuchszwecken abgenommen. Die mit Vollblut gefüllten EDTA-beschichteten Röhrchen wurden 10 min lang mit einer Geschwindigkeit von 4000 rounds per minute (rpm) (Rotanda 460 R, Hettich Zentrifuge) bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Plasma-Überstand abpipettiert und es wurde 1 ml Buffy Coat (bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten) gewonnen. Dann wurden die gewonnenen Zellen aus der Buffy Coat-Lösung mit 12 ml serum-freiem (SF) Medium (AIM V, Invitrogen) resuspendiert und je 0,5 ml dieser Zellsuspension für die Zellkulturen verwendet. Für den Aufbau der Zellkulturen wurden 6-Well-PET (Polyethylen) Platten (BD Germany) oder Collagen Typ-I beschichtete Platten (BD Germany) verwendet. In jede Vertiefung der 6-Well-Platten wurden anschließend Einsätze (Inserts), deren Unterseite aus einer semipermeablen Membran (Porendurchmesser 1,0 µm) bestand, gehängt. Folgende Inserts wurden verwendet: PET, Collagen-Typ-I-beschichtet oder Fibrin-beschichtet (Tissucol Duo S™ 1ml Immuno, Baxter Germany). Die 6-Well-Platten mitsamt den Inserts wurden im parallelen Versuchsaufbau sowohl unter Normoxie (37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂) als auch unter Hypoxie (37 °C, 3 % O₂, 5 % CO₂) in Inkubatoren unter sterilen Bedingungen kultiviert.

Das *in vitro* Wundsimulationsmodell bestand aus einem Zwei-Kammer-System. Durch dieses wurde eine kontrollierte Faktorgewinnung ermöglicht, indem die von den Blutzellen produzierten angiogenen Faktormoleküle aus der oberen Kammer in die untere Kammer durch die semipermeable Membran diffundieren konnten. Das SF Medium wurde dabei als neutrales Kulturmedium sowohl in der oberen als auch in der unteren Kammer verwendet. Beim Abnehmen der Überstände wurden die Inserts unter sterilen Bedingungen herausgehoben und die Überstände aus den Wells für die folgenden Tests verwendet.

Abbildung 1 veranschaulicht das 2-Kammer Wundsimulationsmodell mit peripheren Blutzellen in der oberen Kammer („Insert“).

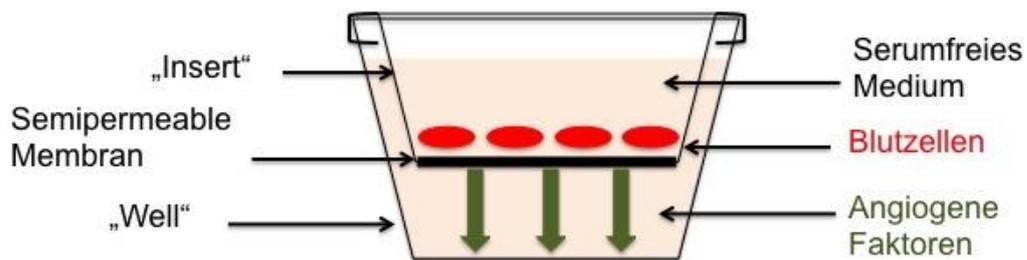


Abb. 1: Wundsimulationsmodell *in vitro* zur Stimulierung der Blutzellen zur Produktion von angiogenen Faktoren unter Normoxie und Hypoxie

2.2 Screening angiogener Faktoren mittels Proteome Profiler Array™

Um sich einen ersten Überblick über die Proteinexpression der Blutzellen zu verschaffen, wurden 10 ml peripheres Blut in einem EDTA-beschichteten Vacutainer™ - Röhrchen (BD Germany) ungerinnbar gemacht und der Buffy Coat nach Protokoll gewonnen. 1ml Buffy Coat-Lösung wurde mit 12 ml SF Medium verdünnt. Je 0,5 ml der Zellsuspension (PBMC/SF) wurde in Collagen-I-beschichtete Inserts pipettiert.

Die Inserts wurden mit weiteren 2,5 ml Medium befüllt und in die Vertiefungen der 6-Well PET Platten eingehängt. Pro Well wurden 3,0 ml SF Medium vorgelegt. Anschließend wurden die 6-Well-Platten in die Inkubatoren gestellt. Nach einer Kulturzeit von 10 Tagen unter Normoxie bzw. Hypoxie wurden die Kulturen aus den Inkubatoren genommen und das SF Medium (3,0 ml) aus den Wells entnommen. Dieses wurde mittels Proteome Profiler™ Array (Human Angiogenesis Array Kit, Cat no ARY007, R&D, USA) auf die Expression 55 verschiedener angiogener Faktoren hin analysiert. Dieser Array beruht auf dem Prinzip der Antibody/Protein Detektion und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Quantifizierung der detektierten pro- bzw. anti-angiogenen Faktoren erfolgte mittels ImageJ-Software.

2.3 Quantifizierung pro- und anti- angiogener Faktoren mittels

ELISA

Für die Quantifizierung relevanter pro- und anti-angiogener Faktoren wurden 10 ml Blut in EDTA-Vacutainer™ Röhrchen abgenommen. Es wurden 3 Wells unter normoxischen Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂) und 3 Wells unter hypoxischen Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 3 % O₂) über 7 Tage kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Überstände abgenommen und für ELISA verwendet. Folgende Proteine wurden mittels ELISA quantifiziert: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Angiogenin (ANG) und Thrombospondin-1 (TSP-1). Alle ELISA Kits waren von R&D. Pro Spender wurden 2 Proben pro Bedingung (Normoxie/Hypoxie) getestet.

2.4 Analyse der Faktor-Expression im temporären Verlauf

Um die Expression angiogener Faktoren im Verlauf der gesamten Kultivationsdauer zu quantifizieren, wurde der Buffy Coat nach Protokoll isoliert und je 0,5 ml PBC/SF-Zellsuspension in Collagen-I-beschichtete Inserts (1 μm Porendurchmesser), welche in PET-6-Well-Platten (BD Germany) eingehängt wurden, pipettiert. Anschließend wurden weitere 4,5 ml SF Medium zur Zellsuspension in die Inserts hinzugefügt und die Wells mit je 5 ml SF Medium gefüllt. Die Platten wurden für 16 Tage unter normoxischen (37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂) und hypoxischen (37 °C, 5 % CO₂, 3 % O₂) Bedingungen im Inkubator belassen.

Nach jeweils 4, 8, 12 und 16 Tagen wurden Aliquots aus den Wells entnommen und bei -20 °C tiefgefroren. Diese Überstände wurden zu einem späteren Zeitpunkt im Wasserbad (37°C) aufgetaut. Mittels ELISA wurden die Konzentrationen folgender Proteine gemessen: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Interleukin-8 (IL-8), Thrombospondin-1 (TSP-1), Angiogenin (ANG), Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) und Platelet-Factor-4 (PF-4). Pro Zeitpunkt wurden je 3 Proben getestet.

2.5 Analyse der Auswirkungen von Hypoxie auf die Zellkulturen

Zur Untersuchung der Lebensfähigkeit der Zellen unter Normoxie im Vergleich zur Hypoxie wurden zwei Parameter analysiert. Erstens, die Zellintegrität wurde anhand der Messung des Enzyms Laktatdehydrogenase, welche bei abgestorbenen Zellen freigesetzt wird, festgestellt. Als zweiter Parameter wurde der pH-Wert des

Mediums, welcher im gesunden Zellkulturmilieu annähernd neutral sein sollte gemessen.

2.5.1 LDH-Viability-Test

Um die Überlebensfähigkeit der Zellen *in vitro* unter Hypoxie vs. Normoxie zu testen, wurde ein LDH-Test (Cytotoxicity Detection Kit, Roche cat no:11644793001) durchgeführt. Dazu wurde 1 ml der Zellsuspension (PBMC/SF) in semipermeable PET inserts pipettiert. Die Inserts wurden in die 6-Well-Platten gehängt, welche zuvor mit 2 ml SF Medium/Well befüllt worden waren. Die Platten wurden ebenfalls unter normoxischen (37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂) und hypoxischen (37 °C, 5 % CO₂, 3 % O₂) Bedingungen im Inkubator belassen.

Um die Zellviabilität im temporären Verlauf zu überprüfen, wurden Zellen aus jeweils 3 Wells nach unterschiedlich langer Kultivationsdauer geerntet. An Tag 2, 4, 8 und 12 wurden die Medien aus den jeweiligen 3 Wells abgenommen und bei -20 °C eingelagert. In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss der Insert-Beschichtung auf die Faktor-Expression getestet. Dazu wurden 0,5 ml Zellsuspension in Inserts unterschiedlichen Materials pipettiert. Folgende Materialien wurden getestet: PET, Collagen-beschichtete Inserts und Fibrin-beschichtete Inserts. Die Zellsuspensionen in den Inserts wurden jeweils mit 1,5 ml SF Medium versetzt. Die Wells wurden mit je 2 ml SF Medium befüllt.

Die Zellen wurden unter Normoxie bzw. Hypoxie für die Dauer von 10 Tagen kultiviert. Anschließend wurden Aliquots des zellfreien Mediums den Wells entnommen und für 5 min bei 1200 rpm und 20 °C zentrifugiert. Danach wurden die Zellsuspensionen in den Inserts mit Triton-X-100 (Endkonzentration 1%) versetzt und für

2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Gemäß den Vorschriften des Herstellers (Roche) wurden je 100 µl des Detection Kits zu den Proben pipettiert und die gesamte Suspension in eine 96-Well-Platte überführt. Diese wurde bei 25 °C Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm mittels Plate Reader (Mithras Reader LB940, Mithras Technologies) gemessen.

Der Hintergrund-Wert (SF Medium) wurde von allen Proben-Messwerten subtrahiert. Als Kontrollwert für den maximalen Zelltod wurde der Überstand der Triton-X-lysierten Zellsuspension herangezogen. Die Zelltoxizität wurde anschließend errechnet.

2.5.2 pH-Test

Um die Änderung des pH-Werts in den Zellkulturen in Abhängigkeit von der Zeit zu bestimmen, wurde dieser mithilfe sogenannter Hydro-DishesTM mit einem pH-Reader gemessen. Dazu wurden pro Well 0,5 ml der Blutzellsuspension mit je 1,5 ml SF Medium in einer speziellen 24-Well-Platte (HydroDishTM, PreSens) unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert. Nach 2, 4, und 8 Tagen wurde der pH-Wert gemessen und mithilfe der Software (PreSens System) standardisiert ermittelt.

2.6 Analyse des Einflusses des Scaffold Materials auf die Faktorproduktion

Um die Auswirkung der Materialeigenschaft von PET (Polyethylen) auf die Zellen bzw. deren Faktorexpression zu prüfen, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt: 0,5 ml der PBMC/SF Zellsuspension wurden jeweils in ein PET, Collagen-I-beschichtetes oder Fibrin-beschichtetes Insert (1 μm Porendurchmesser) pipettiert und mit 1,5 ml SF-Medium verdünnt. Die Inserts wurden anschließend in 6-Well-Platten gehängt, die 2 ml SF Medium/Well enthielten. Die Platten wurden für 4 bzw. 10 Tage, jeweils parallel unter Normoxie oder Hypoxie in Kultur gehalten. Die Medien aus den Wells wurden nach 4 bzw. 10 Tagen abgenommen und die Faktoren (VEGF, Angiogenin, Thrombospondin1, IL-8) mittels ELISA quantifiziert (gemäß ELISA-Protokoll von R&D). Pro Versuchsbedingung erfolgten 3 Ansätze.

Um den Effekt der Festigkeit des Materials auf die Zellen und deren Faktorexpression zu testen, wurde jeweils 1 ml der PBMC/SF Zellsuspension mit 1,5 ml Medium versetzt und in Inserts unterschiedlichen Materials pipettiert. Es wurden drei unterschiedliche Materialien, die sich in ihrem Elastizitätsmodul (Pascal) voneinander unterscheiden, verwendet. Einerseits wurden Inserts aus PET verwendet, daneben erfolgte derselbe Versuchsansatz mit 5ml Collagen Gel (Bovines Collagen Typ I) beschichteten PET Inserts. Als dritte Gruppe wurden PET Inserts, die mit einem hochelastischen Collagen Gel (hohes E-Modul) beschichtet waren, verwendet.

Die Herstellung der unterschiedlich festen Collagen-Gele erfolgte durch Zugabe von 10%-10-x-MEM und 10%-NaOH nach dem Titrationsprinzip bis zum Farbumschlag des zugefügten Indikators Phenol-Rot (68).

Es wurden zwei Arten von Gelen hergestellt: Collagen Gele mit einem E-Modul von ca. 50 kPa und Gele mit einem E-Modul von 2000 kPa. Letztere wurden mittels steriler Kompression zwischen zwei Plastikoberflächen auf eine Festigkeit von ca. 2000 kPa gebracht. Hierzu wurde auf das Collagen Gel ein mechanischer Druck von außen ausgeübt, der für 5 min auf das Gel einwirkte.

Anschließend wurden die Gele aus in die PET 6-Well-Platten überführt und mit je 4 ml SF Medium/Well überschichtet. Dann wurden die Inserts mit den Zellsuspensionen in die Wells gehängt und für 10 Tage unter Normoxie bzw. unter Hypoxie kultiviert. Nach 10 Tagen wurden die Überstände gesammelt und mittels ELISA die jeweiligen VEGF-Konzentrationen quantifiziert. Pro Bedingung wurden 3 Proben getestet.

2.7 Analyse von Wundauflagen zur Speicherung und Freisetzung von VEGF

Es wurden verschiedene, klinisch gebräuchliche Wundauflagen und Wundgele sowie spezielle *Micro Beads* (Kügelchen) auf ihre Fähigkeit der Aufnahme und Abgabe der angiogenen Faktoren *in vitro* getestet.

Für diesen Versuch wurden spezielle 6-Well-Platten verwendet, deren Wells vom Hersteller (BD Germany) mit Collagen Typ I beschichtet worden waren (Collagen Coated Wells, BD Biochrom).

Für die Experimente wurden folgende unterschiedliche Materialien ausgewählt. Das verwendete bovine Collagen Gel ist identisch mit dem klinisch gebräuchlichen

Stimulen Gel™ (Southwest Technologies Inc.). Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der verwendeten Wundauflagen.

Tab. 3: Übersicht der getesteten Wundauflagen

Wundauflage/Wundgel	Funktionen (laut Hersteller)
Alginate (Sorbalgon® , Aquacef®)	Saugt Wundsekret auf, Einsatz auch nach Spalthautentnahme, reinigt die Wunde und wirkt blutstillend, bildet eine Gelschicht nach Kontakt mit Wundflüssigkeit
Hydrogele (Hydrosorb-Gel® , Polyhexanid-Gel® , Collagen Gel)	Zur Autolyse von Fibrinbelägen, zum Anfeuchten trockener Wunden bzw. freiliegender Sehnen
Hydrokolloidverbände (Nu Derm®)	Anwendung bei gering exsudativen Wunden, erhält ein feuchtes Wundmilieu in der Granulationsphase
Schaumstoffe (Mepilex® , Permafoam®)	Zur Abdeckung in der Granulationsphase, bildet feuchtes Milieu, schützt vor äußeren Einflüssen

2.7.1 Gelartige und feste Wundauflagen

Aus der Gruppe der gelartigen Wundauflagen wurden Hydrosorb Gel®, Polyhexanid Gel® und Collagen Gel und Fibrin Gel getestet.

Hydrosorb Gel® ist ein klares und visköses Gel, welches laut Hersteller für ein feuchtes Wundmilieu sorgt und bei oberflächlichen und tiefen Wunden Anwendung findet (siehe Produktinformation Firma Hartmann).

Bei Polyhexanid Gel® handelt es sich um ein antiseptisches Wundgel, welches laut Hersteller auch bei Verbrennungswunden und infizierten Wunden eingesetzt werden kann und von der Konsistenz her dem Hydrosorb Gel® sehr ähnlich ist (siehe Herstellerinformation Lavanid Gel® von Serag Wiessner).

Des Weiteren wurde Collagen Gel (bovines Kollagen Typ I) getestet, welches die Wunde ebenfalls ausfüllt und die Wundheilung laut Hersteller aktiv stimuliert und bei tiefen Wunden auch zur Förderung der Granulation eingesetzt werden kann (siehe Produktinformation Stimulen™ Collagen Gel, Southwest Technologies).

Außerdem wurde TissuCol®, ein Fibrin Gel, getestet. Wie oben beschrieben, spielt Fibrin in der Wundheilung vor allem in der ersten Phase nach der Hämostase eine entscheidende Rolle.

Die zu testenden gelartigen Wundauflagen wurden in PET-Inserts gegeben, welche in die beschichteten 6-Well-Platten eingehängt wurden. Pro Versuchsbedingung wurden 3 Inserts mit je 3 ml Gel befüllt und je 1 ml SF Medium hinzugefügt. In die darunterliegenden Wells wurde 1 ml der Zellsuspension (PBC/SF) mit zusätzlich 1 ml SF Medium gefüllt.

Die Platten wurden unter sterilen Bedingungen über 12 Tage unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert. Anschließend wurden die Gele aus den Inserts genommen und in 50-ml-Röhrchen (Greiner) mit 1,5 ml frischem SF Medium überführt. Die 50-ml-Röhrchen wurden luftdicht verschlossen und auf einer horizontal-rotierenden Plattform für 12 h belassen, um die Diffusion der Faktoren aus den Gelen in das frisch hinzugefügte SF-Medium zu ermöglichen. Die Faktor-angereicherten SF Medien werden im Folgenden auch als „Releasates“ bezeichnet. Diese wurden nach 12 h mittels ELISA auf ihren VEGF-Gehalt hin geprüft.

Aus der Gruppe der festen Wundauflagen wurde unter anderem Sorbalgon®, eine Calcium-Alginat Kompresse, getestet. Diese Kompresse wandelt sich im Austausch mit den Natriumsalzen von Blut und Sekreten in ein hydrophiles, nicht verklebendes Gel um und füllt die Wunde aus (vgl. Produktbeschreibung Hartmann).

Weiters wurde Aquacel® ausgewählt, eine sterile Wundauflage, die aus Hydrofibr-Fasern besteht und Exsudat und Bakterien schnell resorbiert. Aquacel® ist für die Behandlung von akuten und chronischen Wunden geeignet (siehe Produktinformation Hartmann).

Aus der Gruppe der Hydrokolloidverbände wurde Nu-Derm® ausgewählt, ein wasserdichter Carboxyl-Methyl-Cellulose Verband, der für gering sezernierende Wunden geeignet ist und sich ebenfalls als gelartige Schicht an die Wundoberfläche anpasst (siehe Produktbeschreibung Ethicon Johnson&Johnson, USA).

Für die Versuchsreihe wurden weiters zwei Schaumstoffe ausgewählt, Mepilex® und Permafoam®. Bei Mepilex® handelt es sich um einen absorbierenden

Schaumverband, der zur Versorgung oberflächlicher, leicht bis mittelstark exsudativer Wunden verwendet wird, nicht mit der Wundoberfläche verklebt und aus Polyurethan besteht (siehe Produktinformation Firma Mölnlycke).

Bei Permafoam® handelt es sich um einen Schaumverband mit ebenfalls wasserundurchlässiger Polyurethandeckschicht, die eine starke Saugfähigkeit bei stark exsudativen Wunden aufweist und aufgrund ihrer Beschaffenheit auch eine Polsterfunktion als Wundverband hat (siehe Produktinformation Firma Hartmann).

Es wurden je 3 cm² große Stücke aus den Wundauflagen ausgeschnitten, in die Inserts gelegt und mit je 1,5 ml SF-Medium befeuchtet 1 ml der PBMC/SF Zellsuspension wurde in die Wells einer PET 6-Well-Platte pipettiert und mit 1 ml zusätzlichem SF-Medium aufgefüllt. Nach 12 Tagen unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen (siehe oben) wurden die Wundauflagen entnommen, in 50 ml Röhrchen transferiert und mit 1,5 ml frischem SF Medium versetzt. Die Röhrchen wurden für die Dauer von 12 h auf die rotierende Plattform gestellt. Anschließend wurde das Medium abpipettiert und mittels ELISA die VEGF-Konzentration gemessen. Pro Versuchsbedingung wurden 3 Proben getestet.

2.7.2 Microsphere Carrier

Um den Einfluss von EZM Molekülen auf die Faktor-Produktion in peripheren Blutzellen zu testen, wurden Experimente mit beschichteten *Microsphere Carriers* (*Micro Beads*) durchgeführt. Dabei handelt es sich um Polystyrol Kügelchen, mit einem Durchmesser von 125–212 µm. Für die hier beschriebenen Versuche waren die *Microsphere Carriers* einerseits mit bovinem Collagen Typ I, andererseits mit Pronectin F. beschichtet (Polystyrene beads Collagen-coated; Polystyrene beads

Pronectin F-coated; beide Sigma Aldrich). Jedes Insert wurde mit 1 g eines Microsphere Carriers, versetzt mit 2 ml SF Medium, befüllt. Anschließend wurden die Inserts in Wells eingehängt, die jeweils 1 ml Zellsuspension (PBMC/SF) und 1 ml SF Medium enthielten.

Die Kulturen wurden über 12 Tage unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen belassen. Danach wurden die Carrier Suspensionen mit 2 ml Collagen-Gel Typ I bzw. Fibrin-Gel versetzt. Diese Gel/Carrier-Gemische wurden anschließend mit 2 ml SF Medium in 50 ml Röhrchen (Greiner) transferiert und auf der Plattform geschüttelt. Nach 12, 24, 36 und 48 Stunden wurden je 200 µl klarer Überstand abgenommen, welcher anschließend mittels ELISA auf den VEGF Gehalt getestet wurde. Pro Versuchsbedingung wurden 3 Proben getestet.

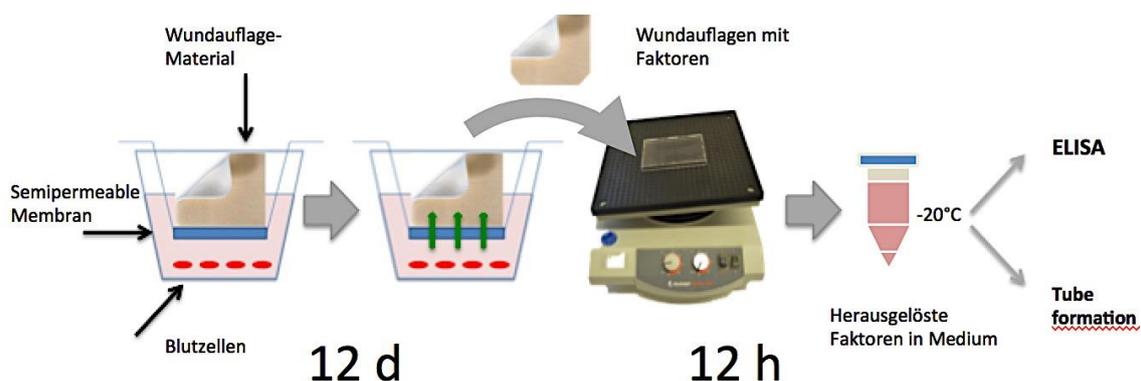


Abb. 2: Schematische Darstellung der Faktor-Extraktion aus Wundauflagen

2.8 Tube formation Assay zur Darstellung der Angiogenese *in vitro*

Um das angiogene Potenzial der zuvor gewonnenen, faktorhaltigen Überstände *in vitro* zu messen, wurden Tube formation Assays (ibidi μ -Angiogenesis System) durchgeführt. Hierzu wurden humane Endothelzellen (p0-p2) aus der Nabelschnurvene (Umbilicalvene) verwendet (HUVECs, Cell Systems). Die Zellen wurden in 25–75-cm²-Flaschen mit ausreichend Nährmedium (VascuLife™, CellSystems) bis zu 90 % Konfluenz kultiviert.

Die Wells der μ -Angiogenesis-Platten wurden mit je 10 μ l Matrigel™ (factor reduced, high density, BD, Germany) befüllt. Nach einer Stunde bei 37 °C im Inkubator gelierte das 1:8 verdünnte Matrigel™ und die Zellen konnten in einer Dichte von 10×10^3 /Well in je 50 μ l Testmedium ausgesät werden. Als positives Kontrollmedium wurde VascuLife™ Medium (full-factored) verwendet. Als negatives Kontrollmedium diente AIM Medium (Invitrogen). Die Platten wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für 12 h belassen. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit Calcein AM (PromoKine, Germany). Die Gefäßneubildung (Tube formation) konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Um die Gefäßneubildung zu quantifizieren, wurden Knotenpunkte gezählt und die Gefäßlängen zwischen den Knotenpunkten gemessen (Image-J).

Als Gefäßknoten wurden jene endothelialen Strukturen definiert, bei der zwei oder mehr Gefäßarme angeschlossen waren. Als Gefäßlänge wurde eine Strecke zwischen zwei Gefäßknoten definiert. Pro Versuchsbedingung wurden 3 Proben getestet.

2.9 Invasion Assay zur Darstellung der Zellmigration *in vitro*

Um die Fähigkeit der Zellinvasion durch BD Matrigel™ zu testen, wurde ein BD BioCoat™ Angiogenesis System benutzt (BD Falcon Fluoroblock Assay), in dem HUVECs durch eine Matrigel™ Membran migrieren, sofern ein ausreichender Stimulus durch ein darunterliegendes Medium vorhanden ist. Als stimulierendes Medium wurden die zuvor gewonnenen faktorreichen Überstände der PBMC Kulturen verwendet.

Die in frühen Passagen (p1-p3) verwendeten HUVECs wurden zuvor mit fluoreszierendem Farbstoff (DiI_{C12} Fluorescent Dye, BD, USA), welcher sich in die Zellmembranen einlagerte, behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie die Migration der Zellen festgestellt und diese mittels ImageJ-Analyse (Image J, NIH, USA) quantifiziert werden. Mindestens 5 Felder wurden pro Probe analysiert, mit 3 Proben pro Versuchsbedingung.

2.10 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Wundauflagen

Zur besseren Darstellung der unterschiedlichen dreidimensionalen Struktur der Wundauflagen wurde eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Sputtern: Gerät SCD 005 von Baltec 40sec, 40 mA, mit einem Goldtarget und einer Schichtdicke von 8 nm. (Gerät JSM 6390 von Jeol, 10kV Spannung).

2.11 Statistische Auswertung der Daten

Jede der geschilderten Versuchsmethoden bestand aus drei unabhängigen, identisch verlaufenden Versuchsreihen. Aus den Ergebnissen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen mithilfe des Programmes Microsoft®Excel berechnet. Signifikante Unterschiede wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt. Der Alpha-Fehler wurde mit 5 % angenommen und das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Darstellung der Daten erfolgte mit Microsoft®Excel und PowerPoint®.

3 Ergebnisse

3.1 Faktorproduktion der peripheren Blutzellen unter Normoxie und Hypoxie

Die Sauerstoffkonzentration ist ein entscheidender Parameter, welcher die Synthese angiogener Faktoren in kultivierten peripheren Blutzellen beeinflusst (55). Zwischen den normoxischen und hypoxischen Zellkulturen zeigten sich Unterschiede in den Faktorkonzentrationen u.a. bei den pro-angiogenen Proteinen VEGF, Angiogenin, EGF, FGFb, IGFBP-1, IGFBP-3, IL-8, IL-16 sowie bei anti-angiogenen Proteinen wie PF4, Vasohibin oder Thrombospondin-1 (Abbildung 3 A, B). Unterschiedlich war auch die Expression der matrix-modulierenden Proteine MMP-8, MMP-9 und TIMP-1 (Abbildung 3C). In den Überständen der normoxischen Kulturen konnte nach 10 Tagen ein ähnliches, aber schwächer ausgeprägtes Muster der Angiogenesefaktoren-Expression detektiert werden. Als Kontrollgruppe wurde das SF Medium AIM verwendet, in welchem sich keiner dieser Faktoren nachweisen ließ.

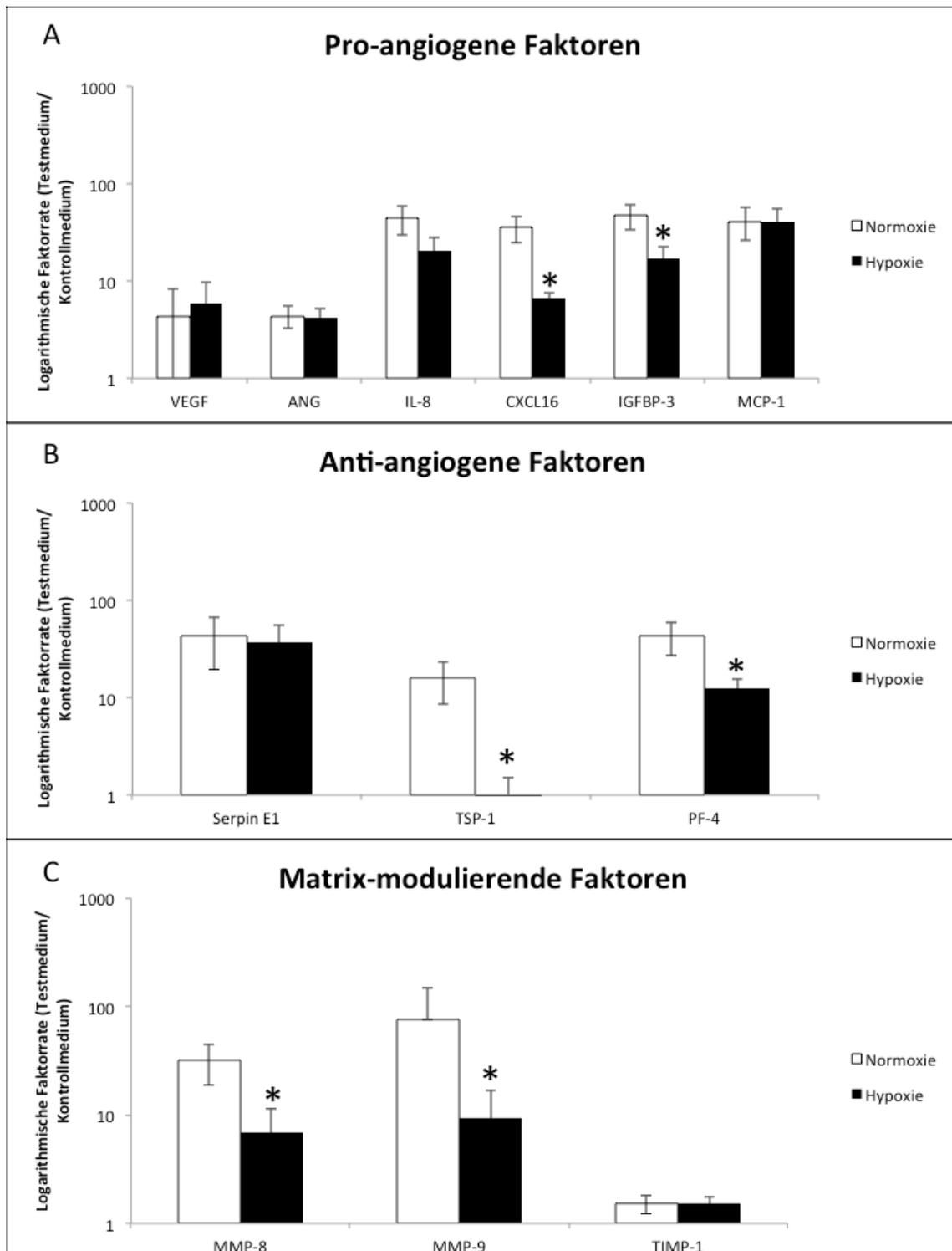


Abb. 3: (A) Quantifizierung pro-angiogener Faktoren unter Normoxie und Hypoxie (B) Quantifizierung anti-angiogener Faktoren unter Normoxie und Hypoxie (C) Quantifizierung matrix- modulierender Faktoren unter Normoxie und Hypoxie

3.2 Quantifizierung angiogener Faktoren und Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie

Um die Unterschiede der Faktorexpression zwischen normoxischen und hypoxischen Kulturen weiter zu quantifizieren und um die Ergebnisse des Proteome Profiler Assays™ zu validieren, wurden Vertreter pro- und antiangiogener sowie matrix-modulierender Faktoren mittels ELISA gemessen. Wie Abbildung 4 zeigt, wurde TSP1-1 (norm 118.7 ± 7.3 ng/ml vs hyp 226.3 ± 13.4 ng/ml bei $p < 0.05$) in den hypoxischen Kulturen im Vergleich zu den normoxischen Kulturen deutlich hochreguliert. Angiogenin wurde hingegen unter Hypoxie herunter-reguliert (norm 3938 ± 160.8 pg/ml vs. hyp 3192.5 ± 108 pg/ml bei $p < 0.05$). Im Falle von VEGF ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den normoxischen und hypoxischen Kulturen (norm 41.9 ± 6.2 pg/ml vs. hyp 50.5 ± 5.2 pg/ml bei $p < 0.05$).

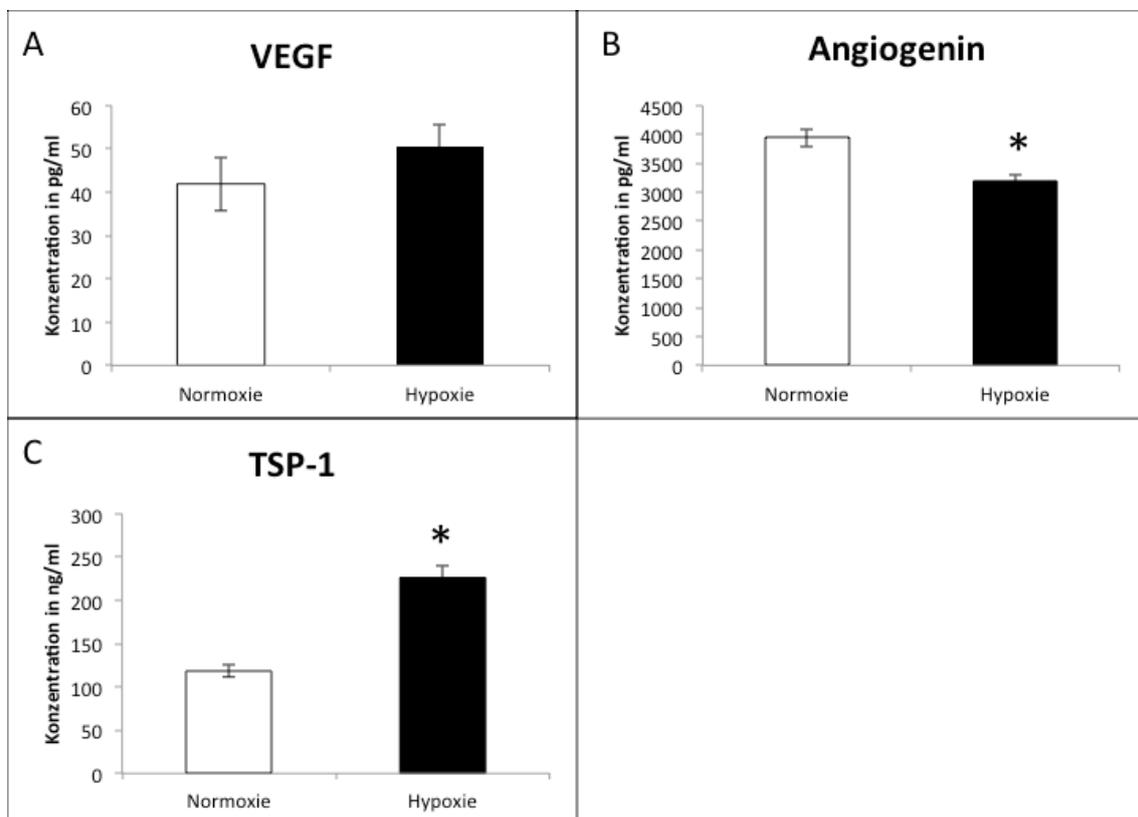


Abb. 4: (A) VEGF-Konzentrationen im Vergleich Normoxie und Hypoxie
(B) Angiogenin Konzentrationen im Vergleich Normoxie und Hypoxie
(C) Thrombospondin-1-Konzentration im Vergleich Normoxie und Hypoxie

3.3 Unterschiede der Faktorproduktion im temporären Verlauf

Um die Faktorexpression im zeitlichen Verlauf zu messen wurden in einem weiteren Versuchsansatz faktorreiche Zellkulturüberstände gewonnen, die jeweils an Tag 4, 8, 12 und 16 abgenommen wurden. Von jedem Überstand wurde die Expression der Proteine VEGF, Angiogenin, Thrombospondin-1 und IL-8 mittels ELISA quantifiziert. Aus Abbildung 5 wird ersichtlich, dass die Faktorproduktion unter beiden Versuchsbedingungen während der Kultivationsdauer keinen linearen Verlauf zeigte.

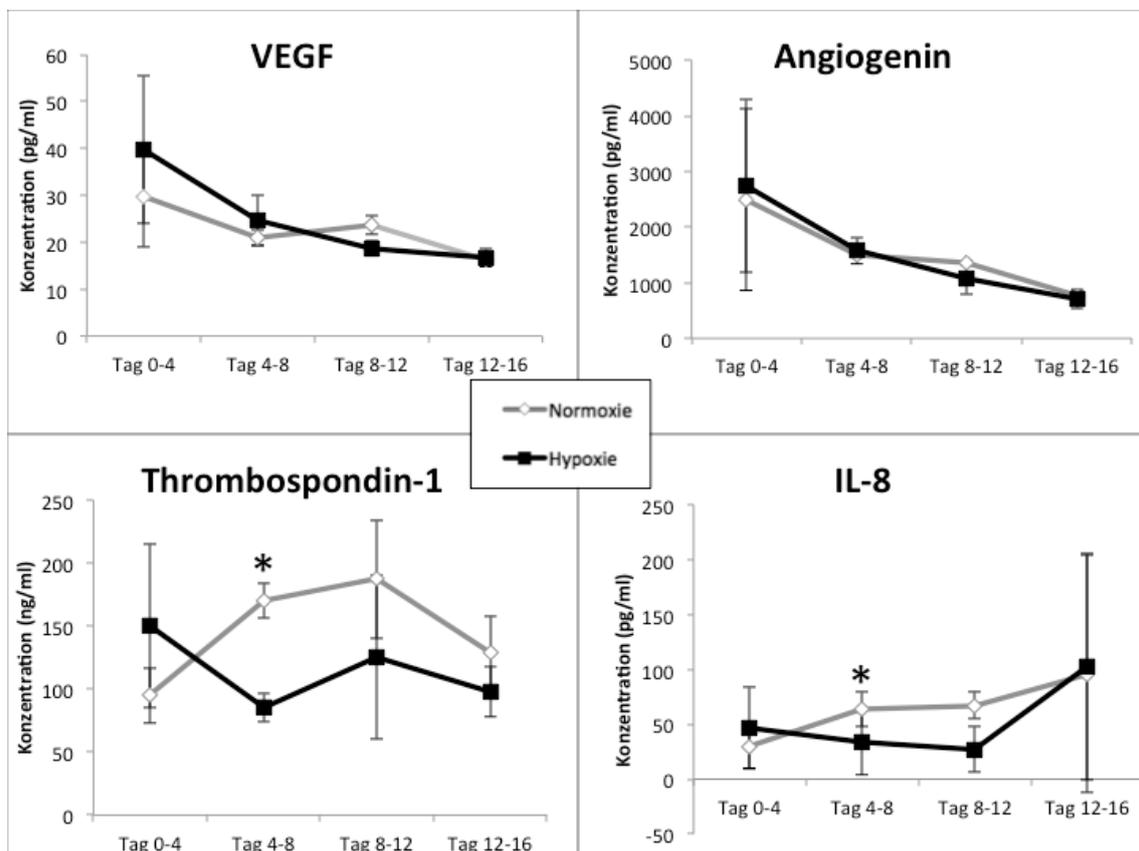


Abb. 5: Temporärer Verlauf der Sekretion von VEGF, Angiogenin, Thrombospondin-1 und Interleukin-8-Konzentrationen unter Normoxie und Hypoxie

VEGF und Angiogenin zeigten im Verlauf der Zeit eine Abnahme mit Höchstwerten zwischen Tag 1 und Tag 4 sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie. Es ergab sich eine fast doppelt so hohe Konzentration an Thrombospondin-1 in den hypoxischen Kulturen zwischen Tag 4 und 8 im Vergleich zu den normoxischen Kulturen.

Die durchschnittliche TSP-1 Konzentration an Tag 12 lag mit 359.3 ± 34.4 ng/ml in den hypoxischen Kulturen deutlich unter den Werten der normoxischen Kulturen (452 ± 45.4 ng/ml) ($p < 0.05$). Die Konzentration von IL-8 blieb hingegen sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie stabil, wobei normoxische Kulturen zum Messzeitpunkt *Tag 4-8* eine signifikant höhere IL-8 Konzentration aufwiesen als hypoxische Kulturen ($p < 0.05$)

3.4 Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf Zell-Viabilität und pH-Wert

Um die Toxizität der Hypoxie (3 % O₂) auf die Blutzellen zu analysieren, wurden LDH-Tests durchgeführt und die Rate des Zelltods in den hypoxischen im Vergleich zu den normoxischen Kulturen ermittelt. Hierbei zeigten hypoxische Kulturen eine um 5 % verringerte Zellviabilität im Vergleich zu normoxischen Kulturen am Ende der Kultivationsdauer nach 8 Tagen (Abbildung 6A).

Der pH-Wert änderte sich im zeitlichen Verlauf und zeigte am Tag 4 einen alkalischen Peak mit Werten über pH 8,0 in beiden Kulturen. Zwischen normoxischen und hypoxischen Zellkulturen konnten allerdings kein signifikanter Unterschied des pH-Werts festgestellt werden, wie Abbildung 6B veranschaulicht.

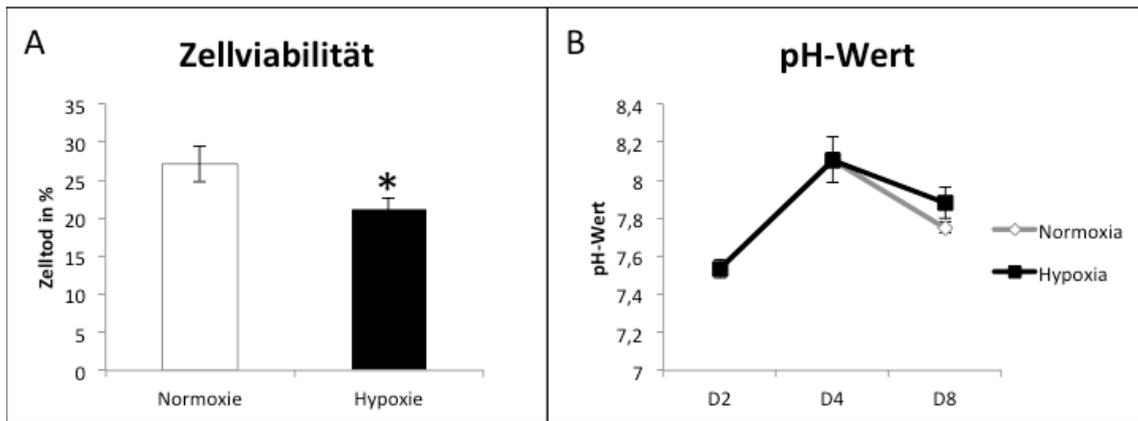


Abb. 6: (A) Zellviabilität unter Normoxie und Hypoxie und (B) pH-Wert im zeitlichen Verlauf

3.5 Einfluss des Materials und des Elastizitätsmoduls auf die Faktorexpression

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss unterschiedlicher Materialien auf die Faktorproduktion der peripheren Blutzellen verglichen. Dazu wurden Zellen auf drei unterschiedlichen Scaffold Materialien (PET, Fibrin-Beschichtung, Collagen Typ I-Beschichtung) über 10 Tage unter Normoxie und Hypoxie kultiviert und die Überstände mittels ELISA auf ihre Konzentrationen von VEGF, Angiogenin, Thrombospondin-1 und Interleukin-8 untersucht. Wie Abbildung 7 zeigt, wurde die größte Stimulation der VEGF Expression durch Fibrin-beschichtete Inserts erzielt, gefolgt von Kollagen-beschichteten Inserts und PET Inserts ($p < 0.05$).

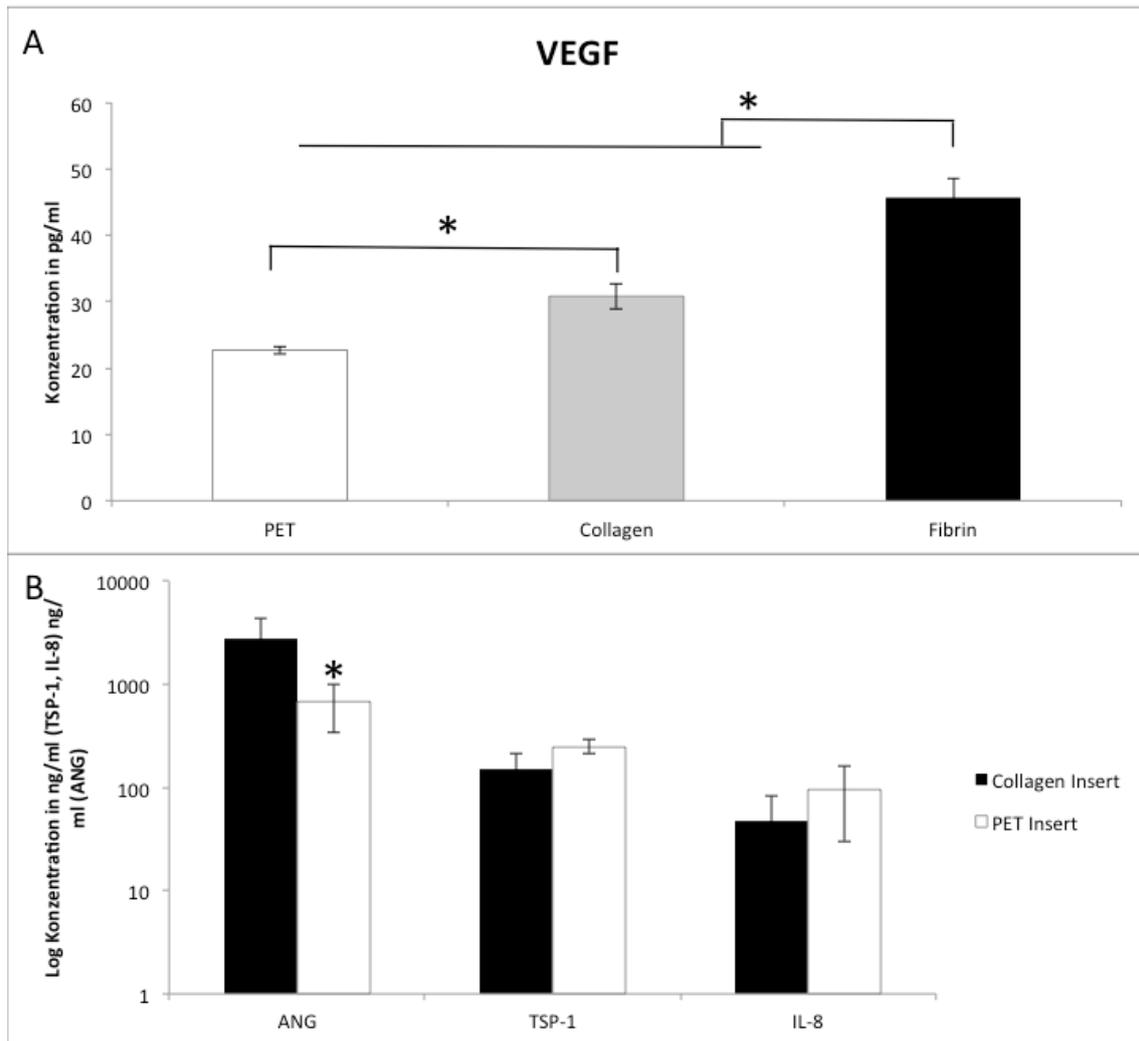


Abb. 7: (A) Einfluss verschiedener Scaffold Materialien auf die VEGF-Produktion in peripheren Blutzellen
 (B) Einfluss von Collagen und PET auf die Faktorenexpression Angiogenin, Thrombospondin-1 und Interleukin-8 in peripheren Blutzellen.

Die Produktion von Angiogenin (ANG) in peripheren Blutzellen war signifikant höher bei Kultivierung auf Kollagen-beschichteten Inserts als bei Kultivierung auf PET oder Fibrin-beschichteten PET Inserts ($p < 0.05$). Bei der Produktion von IL-8 und Thrombospondin-1 ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Materialien nachweisen (Abbildung 7).

Mithilfe eines Angiogenesis Proteome Profiler Assays™ wurden die Überstände der 3 Zellkulturen hinsichtlich der Expression von matrix-modulierenden Proteinen untersucht und verglichen. Dabei konnte in den Kulturen mit den Collagen-beschichteten Inserts die höchsten Konzentrationen an MMP-8 und MMP-9 gemessen werden. TIMP-1 zeigte keine unterschiedliche Expression zwischen den Versuchsgruppen. Eine signifikante Erhöhung der MMP-8 Expression konnte in Collagen-beschichteten Inserts beobachtet werden (Abbildung 8).

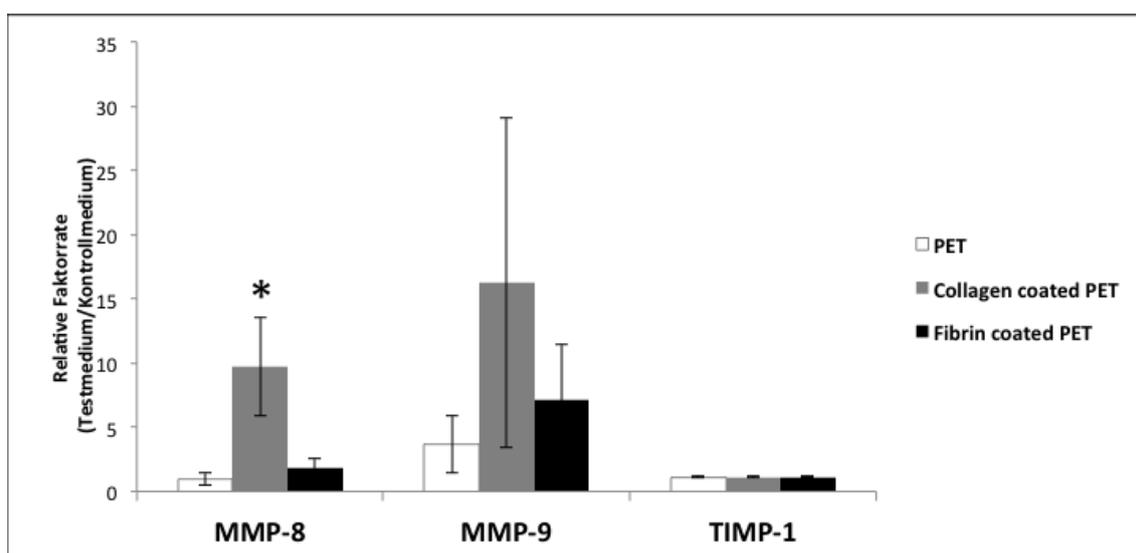


Abb. 8: Übersicht der Expression von EZM-assoziierten Proteinasen von PBMC auf unterschiedlichen Scaffold Materialien

Um den Effekt des Elastizitätsmoduls des Scaffold Materials auf die Faktorproduktion der Zellen zu messen, wurde ein Versuch angesetzt, bei dem zwei unterschiedlich feste Kollagen-Hydrogele im Vergleich zu herkömmlichen PET-Inserts getestet wurden. Die Zellen wurden dabei direkt auf den Collagen-Hydrogelen kultiviert und die faktorreichen Überstände aus den darunterliegenden Wells mittels ELISA nach 10 Tagen auf ihre VEGF-Konzentration hin getestet (Abbildung 9).

Die aus flüssigem bovines Collagen G Typ I angefertigten Hydrogele wiesen ein Elastizitätsmodul (E-Modul) von 50 kPa und 2000 kPa auf. Diese Werte wurden

anhand eines Protokolls aus Vorarbeiten geschätzt (vgl. 67). Das E-Modul von 2000 kPa wurde durch mechanische Kompression erreicht und stimulierte die VEGF-Proteinexpression um ein Vierfaches ($p < 0.05$) im Vergleich zur 50 kPa Variante und um mehr als ein Vierfaches zum Polyethylen (Abbildung 9).

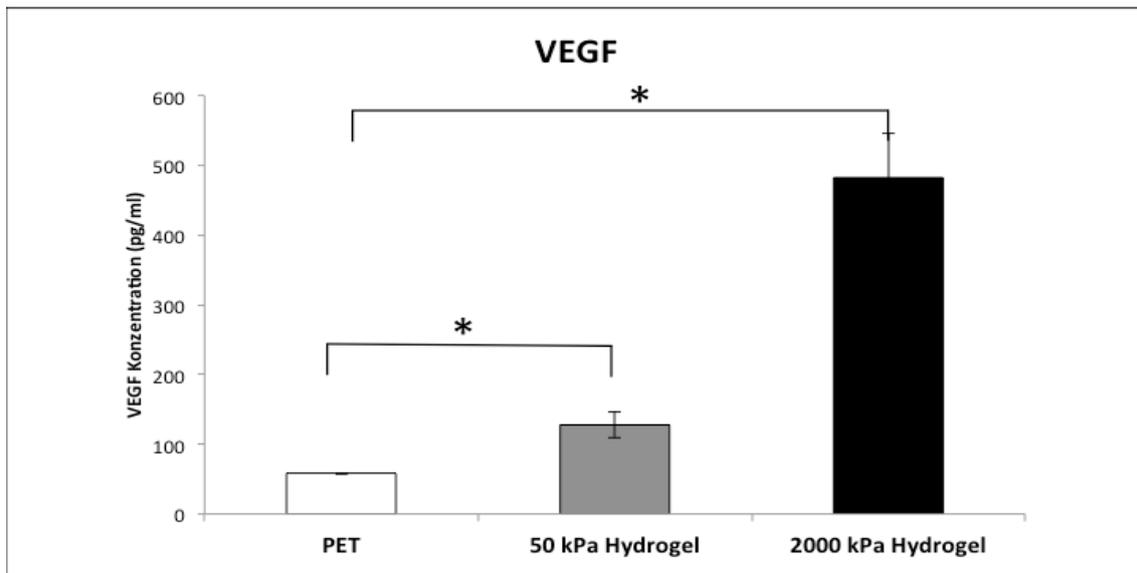


Abb. 9: Unterschiedlich feste Collagen-Hydrogele bewirken eine signifikant unterschiedliche VEGF Produktion der kultivierten Blutzellen

3.6 Unterschiede der Wundauflagen in der Speicherung und Freisetzung von VEGF

Für diese Versuche wurden Wundauflagen unterschiedlicher Beschaffenheit und aus unterschiedlichen Materialien getestet. Gemäß ihrer Konsistenz, konnten die Wundauflagen in drei Gruppen eingeteilt werden: gelartige Wundauflagen, feste Wundauflagen und Microsphere Carrier (*Micro Beads*).

Nach 12 Tagen unter Normoxie oder Hypoxie wurden die gewonnen Überstände mittels ELISA auf ihre VEGF-Konzentrationen hin getestet.

Es zeigte sich, dass die Collagen- und Fibrin-Gele signifikant mehr VEGF aufnehmen und wieder abgeben konnten als das Hydrosorb®-Gel oder Polyhexanid-Gel. Am Tag 12 zeigten die Gele eine VEGF-Retentionsrate (Verhältnis: VEGF-Konzentration im Medium/Konzentration im Hydrogel) von 26 ± 10 pg/ml (Abbildung 10).

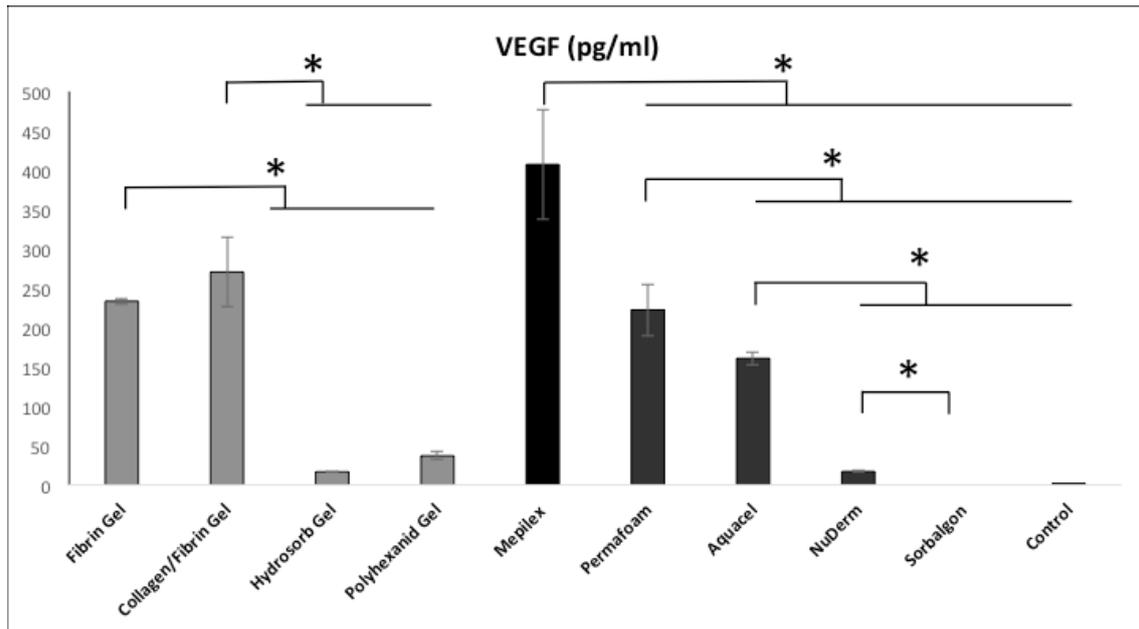


Abb. 10: VEGF-Konzentration nach Aufnahme und Abgabe aus den gelartigen (grau) und festen (schwarz) Wundauflagen

Bei den festen Wundauflagen zeigten sich im VEGF ELISA signifikante Unterschiede zwischen den Auflagen Mepilex® und Aquacel® bzw. Mepilex® und NuDerm® sowie zwischen Permafoam® und Nu-Derm®. Sorbalgon® zeigte keinerlei VEGF-Release Gehalt. Die höchste VEGF-Konzentration fand sich bei Mepilex® mit einer Konzentration von $407,16 \pm 120,46$ pg/ml VEGF. Die zweithöchste Konzentration zeigte Permafoam® mit $222,4 \pm 56,98$ pg/ml VEGF, dahinter folgten Aquacel® mit $160,83 \pm 34,37$ pg/ml VEGF und Nu-Derm® mit $17,10 \pm 2,08$ pg/ml. Die VEGF-Konzentration in den Wundgelen Hydrosorb® und Sorbalgon® lag unterhalb der Nachweisgrenze des VEGF-ELISA (R&D).

Die Extraktion der Faktoren aus den Microsphere Carriers gestaltete sich etwas komplizierter als die Extraktion aus den anderen Wundauflagen, da die Mikrometer-großen Kügelchen erst in Collagen und Fibrin-Gele eingelegt und über 48 h geschüttelt werden mussten, um die Faktoren herauszulösen. Die stärkste Faktorfreisetzung und höchste VEGF-Konzentration konnte in den Überständen nach 12 h gemessen werden (Abbildung 11).

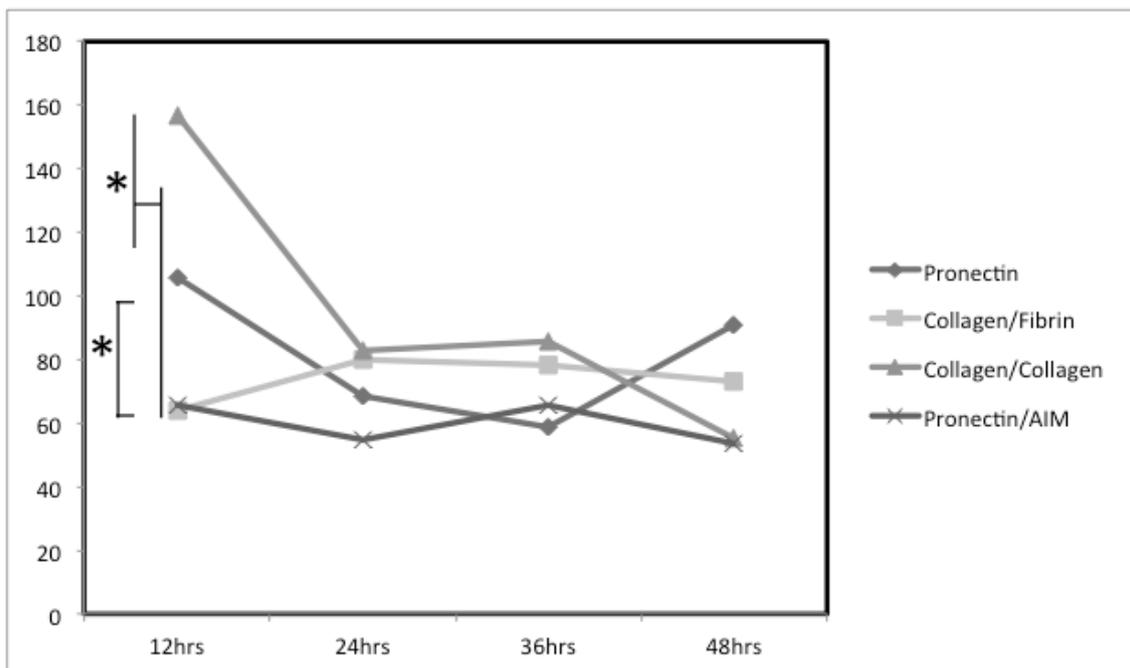


Abb. 11: VEGF-Konzentration (pg/ml) aus den Microsphere Carriers nach 12, 24, 36 und 48 Stunden Inkubationszeit

3.7 Angiogenes Potenzial der Faktoren *in vitro*

Um das angiogene Potenzial der Faktoren *in vitro* zu evaluieren wurden diese in Tube Formation Assays und Matrigel™ Invasion Assays mit humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVECs) getestet. Dabei zeigte sich, dass jene

Releasates, die nach Kultivierung der PBMC auf Collagen-Gelen gewonnen worden waren, eine doppelt so hohe Gefäßneubildung (ca. 2 Mal mehr Tubules, ca. 3 Mal mehr Nodes, $p < 0.05$) induzierten wie das Kontrollmedium AIM. Außerdem waren die neu gebildeten Gefäße doppelt so lang wie die der Kontrollmedien ($p < 0.05$) (Abbildung 12).

Im Gegensatz zu den Releasates aus den Collagen-Gel-Versuchen zeigten die Releasates der Polyhexanid-Gele und HydrosorbTM-Gele keine Erhöhung der angiogenen Aktivität von HUVECs im Vergleich zur Kontrollgruppe AIM und lagen in allen drei Parametergrößen (Anzahl der Tubules, Anzahl der Nodes, Länge der Tubules) deutlich unterhalb des Kontrollwerts ($p < 0.05$) (Abbildung 12).

Releasates, die aus den Kulturen mit Collagen-beschichteten Microsphere Carriers gewonnenen wurden, erhöhten signifikant (2-fach) die Länge der neugebildeten Gefäße ($p < 0.05$). Weder die Anzahl der Gefäßvorläufer noch die der Gefäßknoten war verändert (Abbildung 13).

3.7.1 Fluoreszenzmikroskopische Bilder des Tube formation Assays

Als Kontrollmedium für diese Versuche wurde wieder SF Nährmedium AIM (Invitrogen) verwendet. Im Vergleich zu den Wundauflagen Mepilex®, Nu Derm® und Permafoam® zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Gefäßneubildung. Die Wundauflage Aquacel® zeigte allerdings eine signifikant verringerte Anzahl an Tubules im Vergleich zum Kontrollmedium.

Als Positivkontrolle für die Gefäßneubildung diente das HUVEC-Full-Supplement-Medium, welches normalerweise die volle Stimulation der Gefäßneubildung *in vitro* bewirkt (Abbildung 12).

Im Falle der Collagen Gel® konnte eine signifikant höhere Ausbildung an Primärgefäßen (Tubules) und eine höhere Dichte an Gefäßknoten beobachtet werden. Auch die Länge der Tubules war signifikant größer als bei anderen getesteten Wundauflagen (Abbildung 12).

Hydrosorb-Gel®, Polyhexanid® und Fibrin-Gel® zeigten nur eine geringe angiogene Wirkung auf HUVECs im Vergleich zu AIM SF Medium. Die Ausprägung von Gefäßprimärstrukturen war signifikant niedriger als unter Collagen-Gel®-Stimulation oder in SF Medium (Abbildung 12).

Die Releasates aus den festen Wundauflagen ergaben keine signifikante Aktivierung der Ausbildung von Gefäßvorläuferstrukturen im Vergleich zum serumfreien Testmedium. Bei Aquacel® zeigte sich eine signifikant geringere Ausbildung wie Abbildung 13 und 14 zeigen.

In der Gruppe der Collagen-beschichteten Microsphere Carrier konnten signifikant längere Tubules beobachtet werden im Vergleich zur Kontrolle (AIM Medium) sowie im Vergleich zu den Pronectin-beschichteten Carriern (Abbildung 13 und 14).

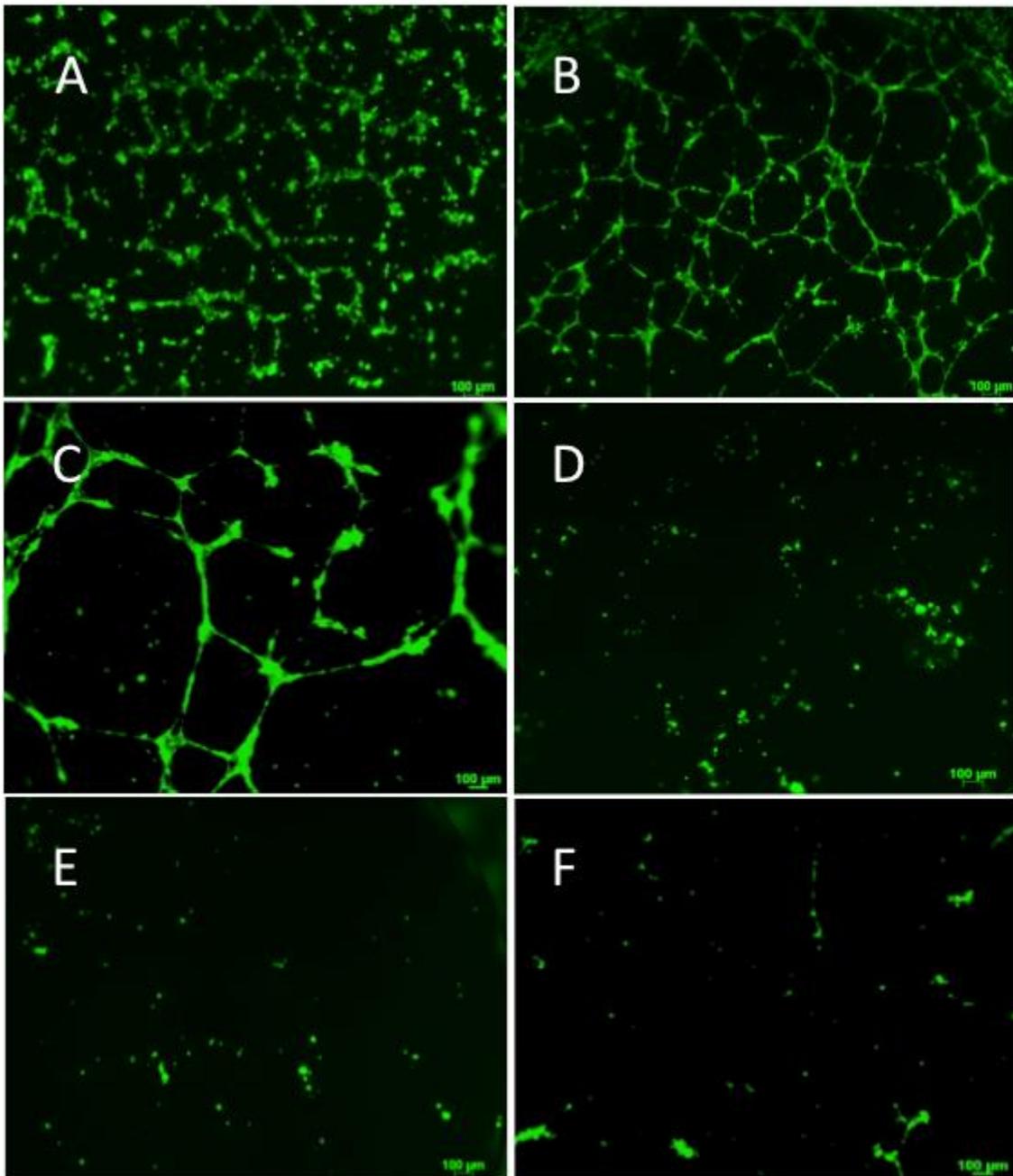


Abb. 12: Fluoreszenzfärbung Calcein-AM der Tube formation nach 12 h in 5 x Vergrößerung von AIM Kontrolle (A) und HUVEC Medium (B) sowie der Gelwundauflagen Collagen Gel (C) und Hydrosorb Gel® (D) und Polyhexanid Gel® (E) und Fibrin Gel® (F)

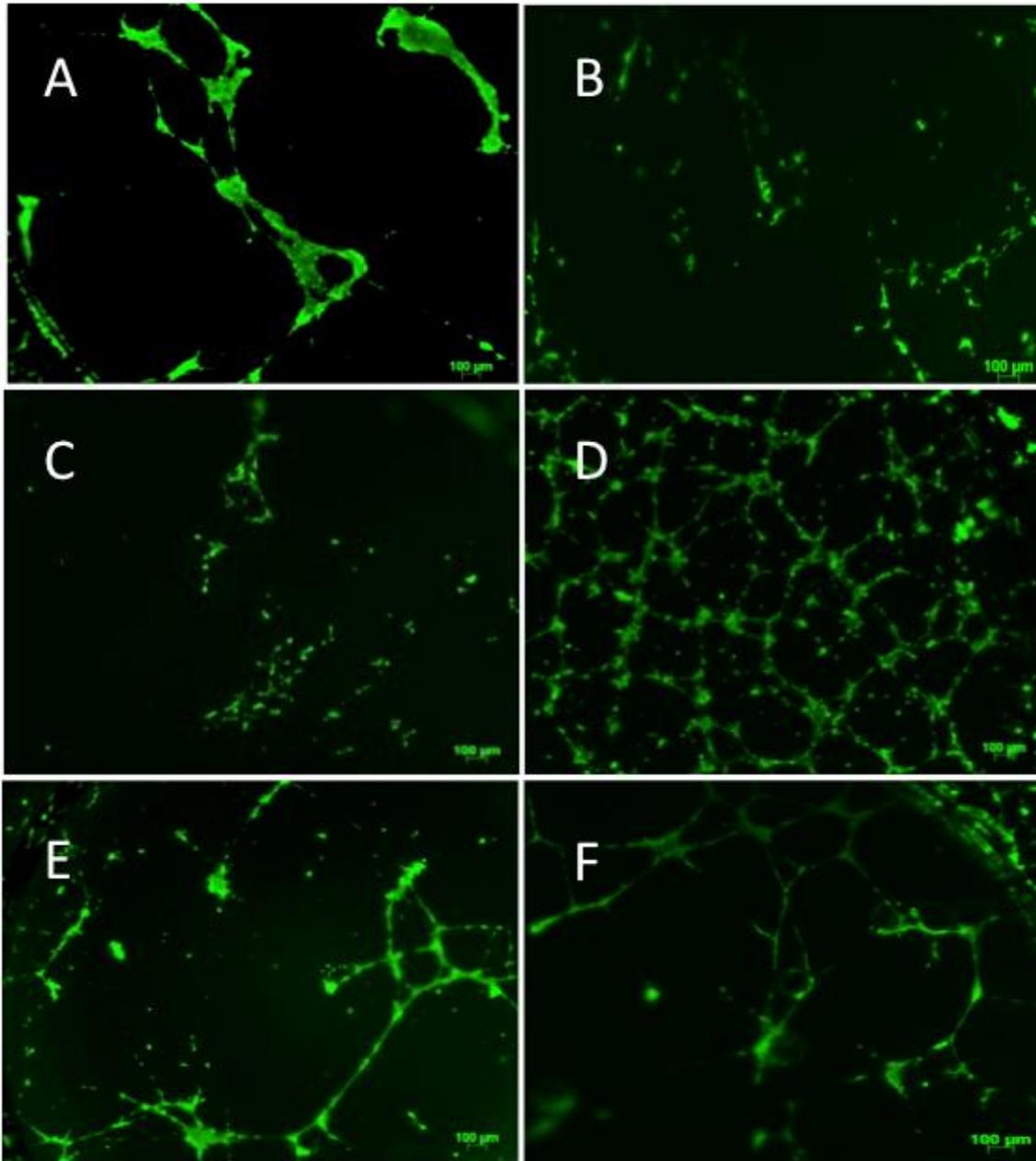


Abb. 13: Fluoreszenzfärbung Calcein-AM der Tube formation nach 12 h in 5 x Vergrößerung: Nu Derm (A), Permafoam (B), Aquacel (C) und Mepilex (D) Collagen/Collagen coated beads (E) Pronectin coated beads (F).

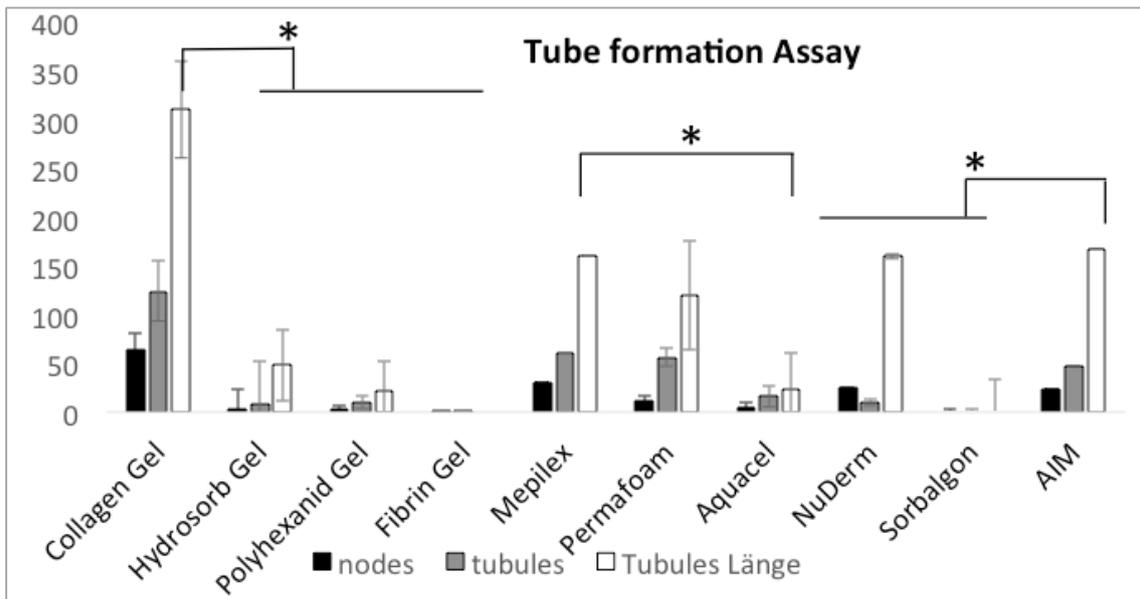


Abb. 14: Durchschnittliche Anzahl der Nodes, Tubules und Länge der Tubules pro Gesichtsfeld

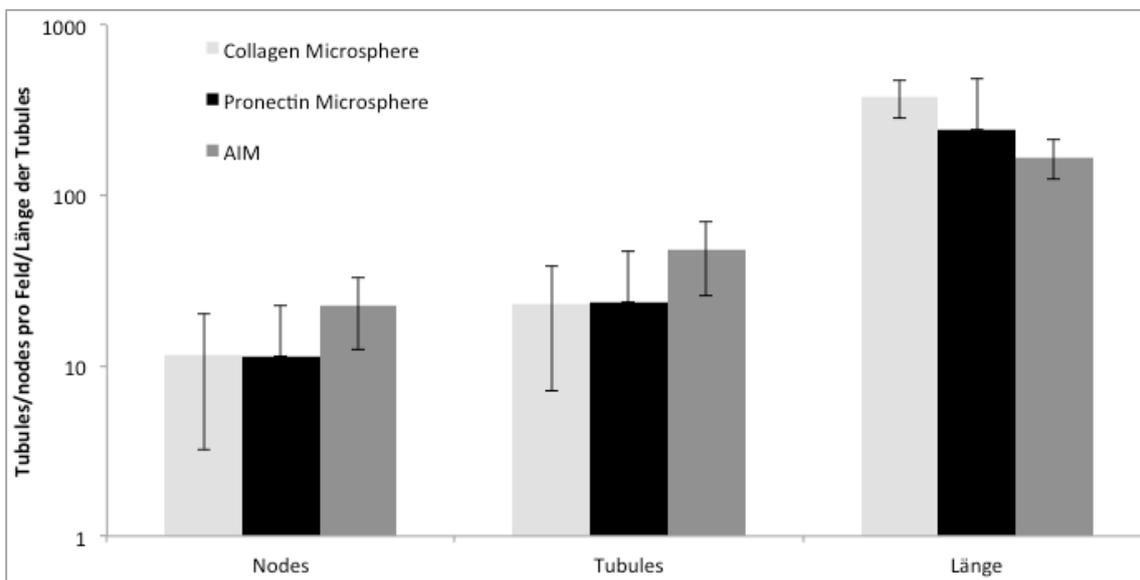


Abb. 15: Durchschnittliche Anzahl der Tubules, Nodes und Längen der Tubules der Microsphere Carrier in logarithmischer Darstellung

3.7.2 Invasion Assay

Um zu testen, ob die Faktormedien die Zellmigration der HUVECs *in vitro* beeinflussen, wurden Matrigel® Invasion Assays durchgeführt. In diesen zeigten die Medien der Collagen-Gel-Kulturen eine doppelt so hohe Aktivität wie das Kontrollmedium AIM (Abbildung 15). Medien von Polyhexanid-Gel® Kulturen bewirkten eine Hemmung der Endothelzellinvasion (50 % geringer als die Kontrollmedien, $p < 0,05$) und Hydrosorb-Gel®-Medien erbrachten ähnliche Ergebnisse wie die Kontrollmedien ($p < 0,05$). Bei den Microsphere Carrier-Überständen zeigten lediglich die Releasates der Collagen-beschichteten Microsphere Carriers höhere Werte als die Kontrollmedien (1,5-fach höher, $p < 0,05$), die Pronectin-beschichteten Überstände von Microsphere Carrier-Kulturen zeigten geringere Aktivität als die Kontrollmedien ($p < 0,05$).

Abbildung 17 zeigt die fluoreszenzmarkierten Endothelzellen (HUVECS), die nach 24 h in die Membran des Invasion Assays eingewandert waren. Dabei ergab sich in der Gruppe der Wundgele eine Signifikanz von Collagen Gel gegenüber Hydrosorb Gel®, Polyhexanid Gel® und Fibrin Gel, wobei die Releasates des Fibrin Gels kaum eine Zellmigration der HUVECS induzierten. Ein signifikanter Unterschied konnte auch zwischen den Releasates von Hydrosorb Gel® und Polyhexanid Gel® beobachtet werden. Dabei zeigten sich die Releasates der Hydrosorb Gel® Gruppe deutlich stimulierender für die Zellmigration.

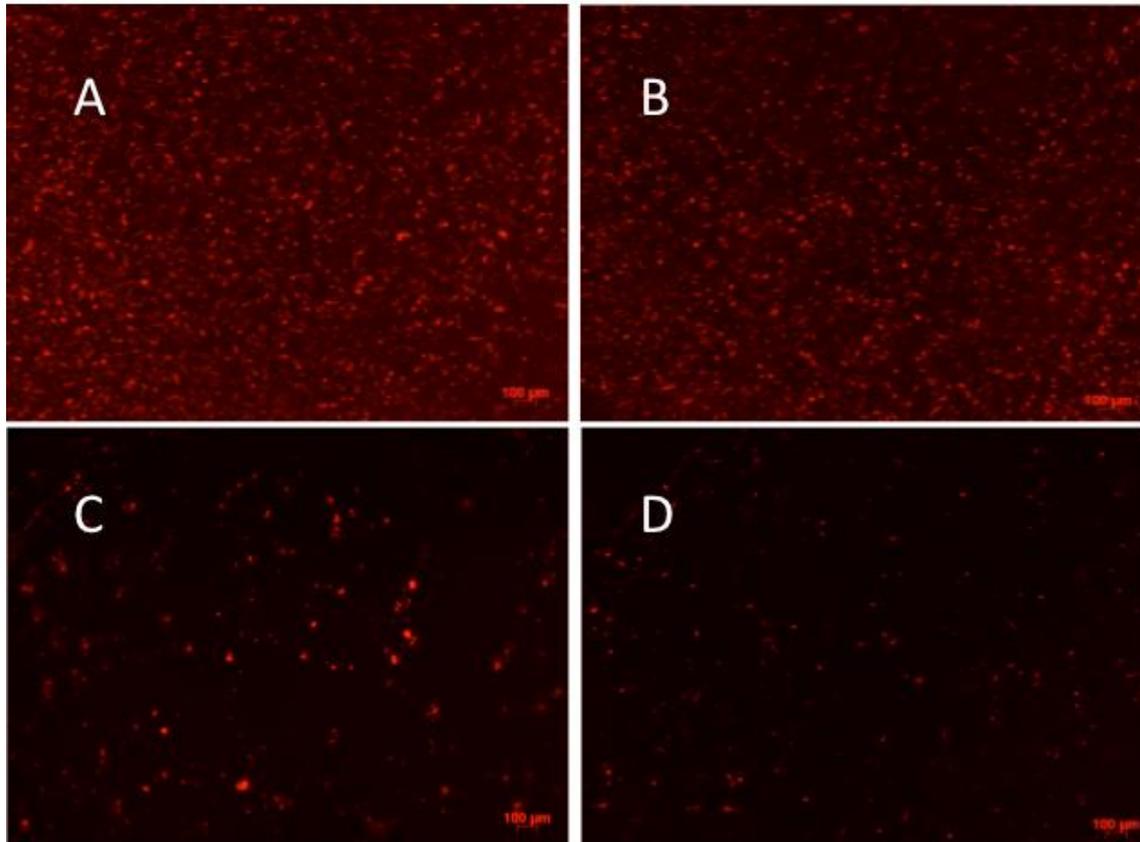


Abb. 16: Invasion Assay nach Färbung in 5 x nach 24 h: Collagen Gel (A) Hydrosorb™ Gel (B), Polyhexanid™ Gel (C), Fibrin Gel (D)

Die eingewanderten Zellen zeigten sich im Invasion Assay nach 24 h als Korrelat für die angiogene Stimulation durch die gebildeten Faktoren. Wie Abbildung 16 zeigt ergaben sich große Unterschiede in der Zellmigrationsrate der verschiedenen Wundauflagen Releasates im Vergleich zur Kontrolle AIM.

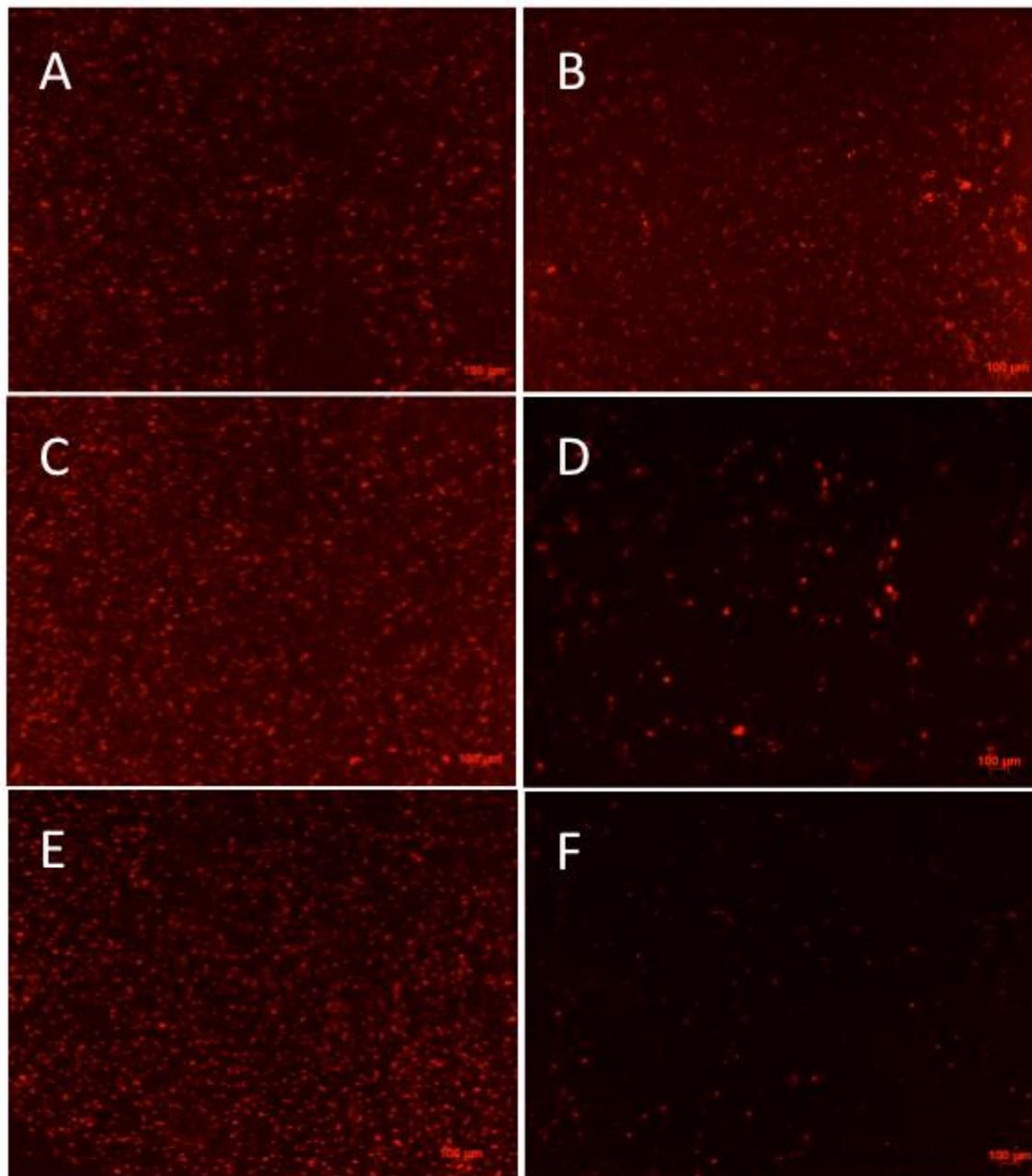


Abb. 17: Invasion Assay nach Färbung in 5-fach Vergrößerung nach 24h: Mepilex™ (A), Permafoam™ (B), Nu-Derm™ (C), Aquacel™ (D), Collagen Beads (E) und Pronectin Beads (F)

Die Wundauflagen Mepilex® und Permafoam® zählen zu den Schaumstoffverbänden und verfügen somit über eine ähnliche dreidimensionale Struktur, die sich im Vergleich zu anderen Wundauflagen insbesondere bei der Aufnahme von angiogenen Faktoren aus der PMBC Kultur unterscheidet.

Überstände (Releasates) der PBMC/Collagen-beschichteten Beads Kulturen induzierten ähnliche hohe Migrationsraten in HUVECs wie Überstände aus den Kulturen mit festen Wundauflagen.

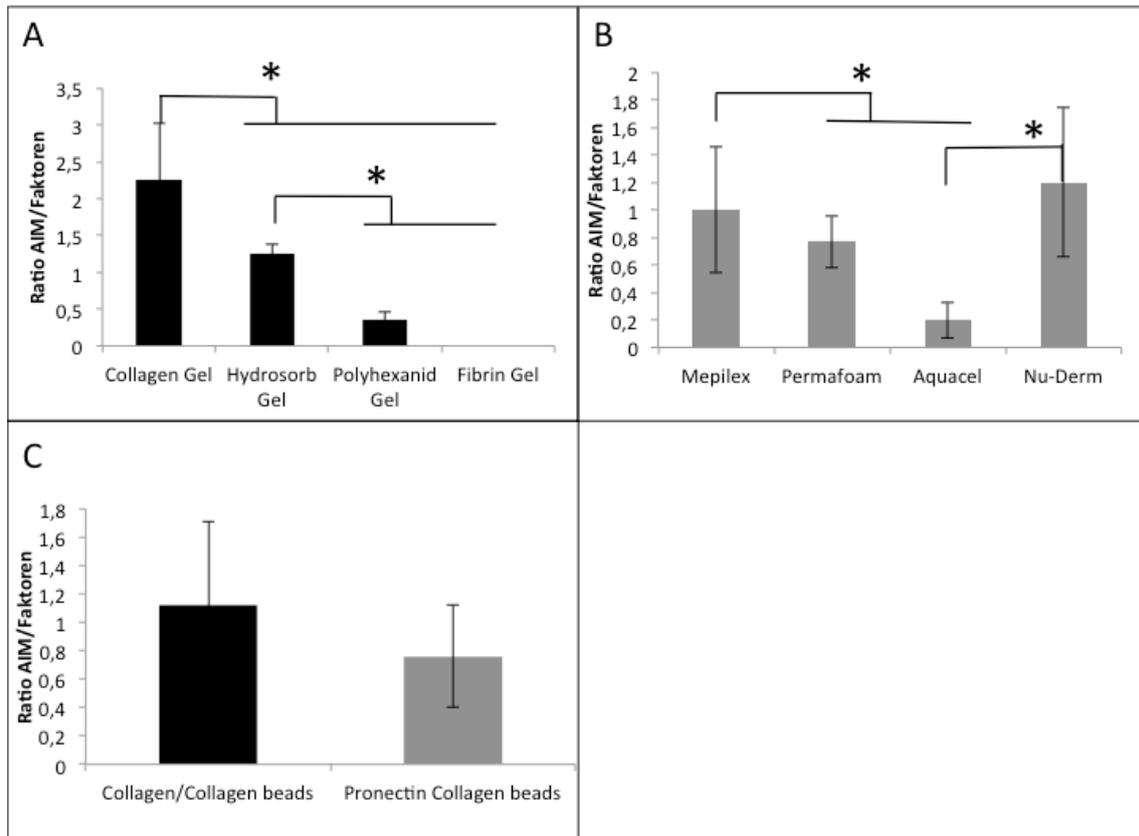


Abb. 18: Induzierte Zellmigrationsraten durch die Überstände der Kulturen mit gelartigen Wundauflagen (A), sowie festen Wundauflagen (B) und der Microsphere Carrier Beads (C) im Verhältnis zu AIM

3.7.3 Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Wundauflagen

Die elektronenmikroskopische Darstellung zweier unterschiedlicher Wundauflagen diente zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur, welche für die Unterschiede in der Resorptionsfähigkeit und der Abgabefähigkeit verantwortlich sein könnte. Hierbei wurde, wie die Abbildungen 18 und 19 zeigen, ein Alginat (Aquacel®) und ein Schaumstoff Verband (Mepilex®) ausgewählt. Die gelartigen Wundauflagen konnten aus technischen Gründen nicht untersucht werden, da die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung im Vakuum stattfindet und die Probe daher vakuumstabil und wasserfrei sein müsste.

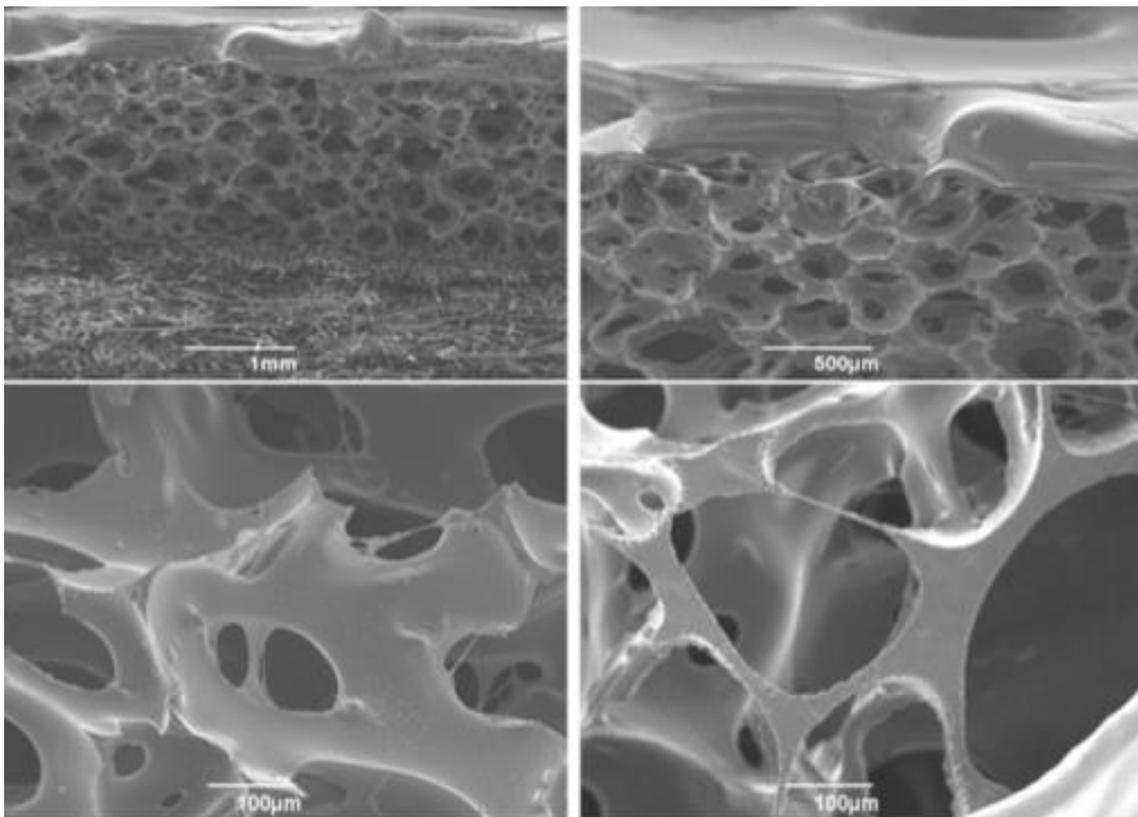


Abb. 19: Mepilex® Border im Rasterelektronenmikroskop

Abbildung 19 zeigt die großen Hohlräume im Schaumstoffmaterial der Wundauflage Mepilex® Border in unterschiedlichen Vergrößerungen.

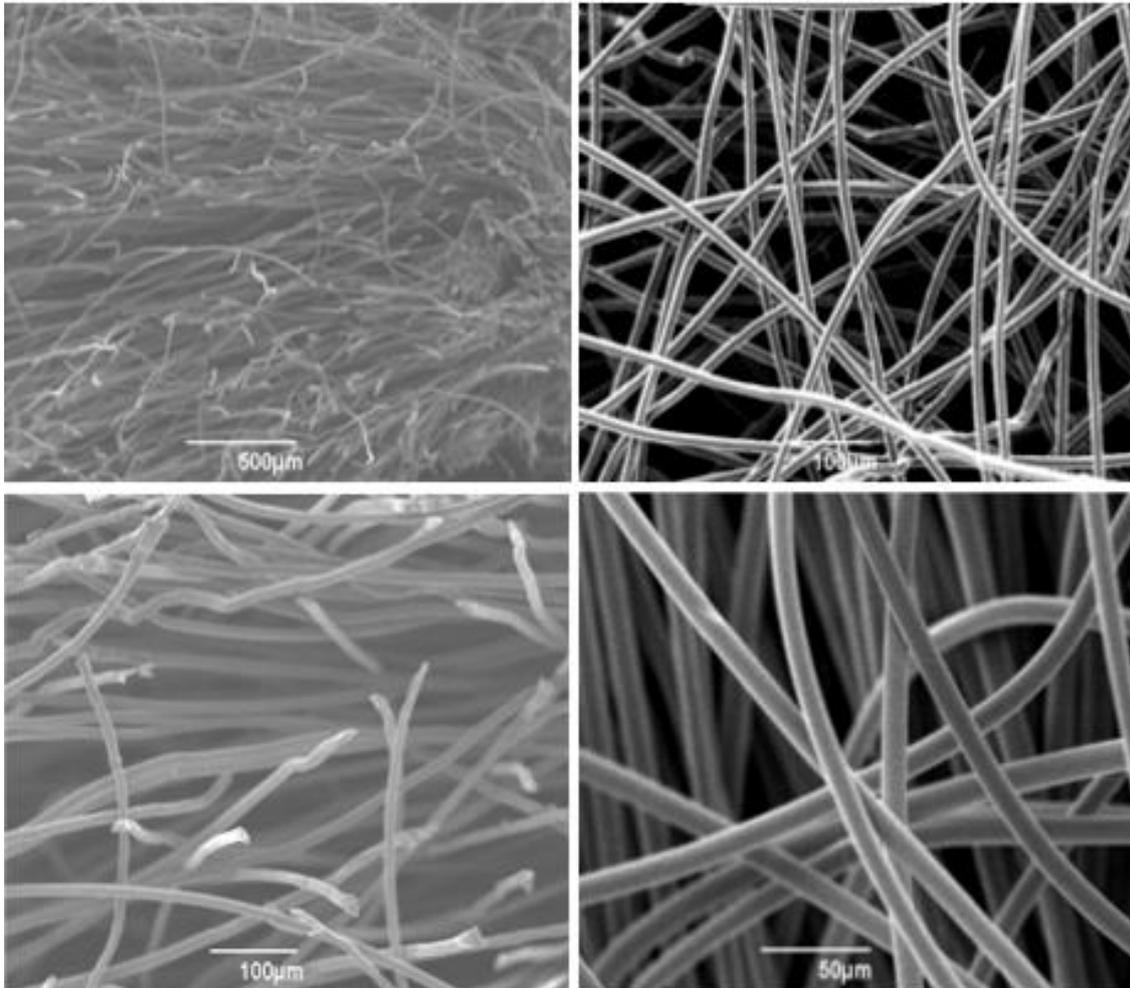


Abb. 20: Aquacel extra™ im Rasterelektronenmikroskop

Abbildung 20 zeigt die Struktur des „Hydrofiber“ Materials von Aquacel™, aufgenommen im Rasterelektronenmikroskop.

4 Diskussion

Aufgrund der zunehmenden Inzidenz von chronischen Wunden in der Medizin (9) rücken die Grundlagen der physiologischen Wundheilung und die Rolle der peripheren Blutzellen in den Fokus der Wissenschaft (119). Angiogenese als entscheidendes Kriterium für den erfolgreichen Verschluss einer Wunde war in den letzten Jahrzehnten zunehmend Gegenstand zahlreicher Analysen, ebenso wie die Rolle von Stammzellen in der Wundheilung (87). Autologe Stammzelltransplantationen oder Therapie mit Eigenblut bzw. dessen Bestandteilen werden seit mehreren Jahren in der Klinik erprobt (87).

4.1 Das *in vitro* Modell der Wundheilung

Mithilfe von *in vitro* Modellen können Wundheilungsprozesse analysiert und mögliche medizinische Behandlungen getestet werden. *In vitro* Assays sind ein hervorragendes Instrument um den Einfluss bestimmter Parameter auf die einzelnen Phasen der Wundheilung detailliert zu untersuchen. Ein einfaches und möglichst naturgetreues *in vitro* Modell der Angiogenese im Rahmen der Wundheilung zu entwickeln erschien sinnvoll, da es die Möglichkeit schafft, die Wirksamkeit von klinisch gebräuchlichen Wundauflagen *in vitro* zu testen (18).

Basierend auf Labor-üblichen 6-Well-Platten, sowie kompatiblen Inserts wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modell entwickelt, das mit Hilfe eines Hypoxie-Inkubators die naturgetreue Simulation einer Wunde ermöglicht.

Der Aufbau unseres 2 Kammer *in vitro* Wundmodells basiert auf der Hypothese, dass die von den Blutzellen gebildeten parakrinen Wundheilungsfaktoren in das umgebende Medium diffundieren und somit einer Quantifizierung leicht zugänglich sind. Die obere Kammer, in der sich die Blutzellen befinden, ist von der unteren Kammer durch eine semipermeable Membran getrennt. Beide Kammern sind nur über Poren, deren Durchmesser kleiner als 0,1 μm ist, in Austausch. Somit wird erreicht, dass keinerlei zelluläre Bestandteile aus der oberen Kammer in die untere gelangen können. Zu Versuchszwecken können jederzeit die Überstände aus den unteren Kammern entnommen und untersucht werden.

Bisher etablierte Wundmodelle basieren hauptsächlich auf der Migration von Keratinozyten oder Fibroblasten in einem 2D oder 3D Kammersystem um die Re-Epithelisation zu untersuchen (179).

In den herkömmlichen zweidimensionalen (2D) Wundheilungsassays wird zumeist eine konfluente Zellschicht unter definierten Bedingungen „verwundet“ und die Migration der Zellen dokumentiert und analysiert (7).

Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden meist durch Beschichtung der Kulturschalen mit EZM Komponenten ermöglicht bzw. simuliert (112).

Es ist jedoch zunehmend erkannt worden, dass die Komplexität des Wundheilungsprozesses jenseits dessen liegt, was eine 2D-Zellkultur darstellen kann (178,90). Die Entwicklung von neuartigen dreidimensionalen (3D) *in vitro* Modellen zur Untersuchung von Migration und Angiogenese markiert daher den nächsten Schritt in der Wundheilungsforschung (148).

In den letzten Jahren zeigte sich in Vergleichsstudien, dass sich Zellen, die in 3D Simulation kultiviert wurden, in ihrer Morphologie, ihrer Signalerkennung und -verarbeitung, ihrem Migrationsverhalten und ihrer metabolische Funktion von Zellen aus 2D Kulturen unterscheiden (152). Aufgrund ihrer dreidimensionalen Umgebung mit Komponenten der EZM (8) bildeten 3D Kulturen die *in vivo* Situation besser ab als 2D Kulturen,

Die Materialien, die für 3D-Wundheilungsassays verwendet werden, sind oftmals Hautersatzmaterialien, die menschliche Haut imitieren sollen. Sie wurden entweder als Transplantate für die Heilung von chronischen und akuten Wunden (z.B. Hyalograft 3D®, Apligraf® und TissueTech Autograft System®) oder als Modelle für dermatologische Tests (zB EpiDermFT™, Phenion® FT Modell und Strata-Test®) entwickelt (64).

Viele 3D Wundheilungsassays setzen sich aus einer Doppelschichtstruktur mit einer dermalen und einer epidermalen Schicht zusammen (155). Das Dermis Imitat besteht zumeist aus einem mit Fibroblasten bewachsenen „Gerüst“. Für das Gerüst werden häufig Hydrogele aus Collagen, aber auch dezellularisierte Dermis, synthetische Polymere, oder Glycosaminoglycane verwendet (174).

Eine epidermisähnliche Schicht von Keratinozyten, entweder aus immortalisierten Zelllinien oder primären Zellen, wird auf der dermalen Matrix kultiviert. Die epidermalen Keratinozyten reifen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche, die mehrere Schichten umfasst und so eine echte Hautstruktur nachahmt (52).

Den 3D Modellen fehlen dennoch Immun- und Gefäßsysteme sowie Schweißdrüsen und Haarfollikel. Abhängig von der experimentellen Hypothese und der beabsichtigten Komplexität können zusätzliche Arten von Zellen wie Melanozyten und Tumorzellen im 3D-Modell co-kultiviert und verschiedene therapeutische Anwendungen (z.B. Medikamente) untersucht werden (196).

Unser Fokus richtete sich allerdings weniger auf Migration, als mehr auf die Angiogenese. Bei dem hier etablierten Wundmodell wurden periphere mononukleäre Blutzellen unter Hypoxie (3 % O₂) einer Stresssituation, wie sie in einer frischen Wunde herrscht, ausgesetzt (159).

Aus früheren Studien geht hervor, dass periphere Blutzellen bzw. deren Stammzellvorläufer nach Stimulation durch Hypoxie/Ischämie, Inflammation oder Ultraschall (u.a.) mit der Hochregulierung von vielen unterschiedlichen angiogenen Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF (113,22,137,147,63), PDGF (136), bFGF, IL8 und MMP-9 reagierten (137) und die Fähigkeit zeigten, Angiogenese *in vitro* (120,20) und *in vivo* (98,93,85,111) zu stimulieren.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, sind die Phasen der Wundheilung eine fein aufeinander abgestimmte Kaskade an molekularen Prozessen, die in jeder Phase bestimmter Umgebungsparameter bedürfen.

Die physiologischen Bedingungen in einer Wunde zeichnen sich durch eine lokale Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff, sowie einem erhöhtem Laktatgehalt, aufgrund der Zellzerstörung und einem azidotischen pH-Wert (159) aus.

4.1.1 Periphere Blutzellen unter hypoxischer Stimulation

Der primäre Stimulus für die Angiogenese in einer Wunde (68) während der Proliferationsphase ist die Hypoxie (124). Humane PBMC sind in der physiologischen Wundheilung die ersten Zellen vor Ort, die angiogene Faktoren produzieren und parakrines Signalling betreiben (56).

Sie bewirken die Produktion von Wachstumsfaktoren (PDGF, FGF; EGF) (105) und die Ausschüttung von Zytokinen aus Makrophagen, Keratinozyten und Fibroblasten (125). Diese Faktoren sind essenziell für Zellproliferation, Migration und Angiogenese in der Wundheilungskaskade (153).

Das alleinige Vorhandensein von Hypoxie genügt in chronischen Wunden aber nicht mehr für die Induktion der Angiogenese (73,69). Der Nachweis einer Herabregulierung der HIF1-Alpha-gesteuerten Gen-Expression in Zellen chronischer Wunden deutet auf die Anpassung an die permanente Hypoxie durch Ischämie hin. Dies könnte den Verlust der Hypoxie-Sensitivität erklären (68,143).

Die Zellen eines Gewebes, das von chronischer Ischämie betroffen ist, wie z.B. Extremitäten mit pAVK oder Diabetes mellitus, können somit nicht mehr auf den Angiogenese Stimulus reagieren und sind in ihrer Regeneration eingeschränkt (53,191).

Unser Ziel war es, im hier etablierten *in vitro* Wundmodell die isolierten peripheren Blutzellen hypoxischen Bedingungen auszusetzen, um die Synthese von Angiogenese-assoziierten Faktoren zu stimulieren und anschließend zu isolieren. -*In vitro* Studien konnten bereits zeigen, dass Sauerstoffgradienten eine Auswirkung auf die Ausschüttung von unterschiedlichen Angiogenese Proteinen hatten (80,31).

Mittels Proteome Profiling wurden semiquantitativ 57 Angiogenese-relevante Proteine, die eine Rolle in der Wundheilung spielen, gescreent. Im Anschluss daran erfolgte die Quantifizierung der am stärksten exprimierten Proteine mittels ELISA. Dabei zeigte sich, dass PBMC unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen unterschiedliche Mengen an bestimmten Angiogenese-assoziierten Faktoren exprimierten und sezernierten. Signifikante Unterschiede beobachteten wir bei MMP-8, MMP-9, CXCL 16, IGFBP-3, PF 4 und TSP 1. In der hypoxischen Gruppe waren diese Faktoren im Vergleich zur normoxischen Gruppe signifikant verringert.

In den hypoxischen Blutzellen fand sich eine signifikante Reduktion der pro-angiogenen Proteinproduktion von Interleukin 16 (CXCL16) und IGFBP3 nach 10 Tagen in Kultur. CXCL 16 ist ein Entzündungsparameter, dessen Expression unter Hypoxie verringert wird. Der vorliegende Befund könnte damit erklärt werden, dass am Tag 10 der physiologischen Wundheilung die Proliferationsphase im Vordergrund steht (109,24).

Eine nicht signifikante, aber deutlich erhöhte, Produktion von MCP1 (monocyte chemotactic protein-1) war sowohl in normoxischen wie hypoxischen Blutzellen zu beobachten. MCP 1, ein Synonym für CCL2 (CC-chemokine ligand 2 ,CC-Chemokinligand 2'), ist ein Zytokin aus der Familie der CC-Chemokine und spielt bei vielen inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle (78).

Ebenfalls fanden sich VEGF und Angiogenin unter den Vertretern der proangiogenen Faktoren im Proteome Assay, wobei sich hierbei keine signifikanten Unterschiede in der VEGF Konzentration zeigte, aber im temporären Verlauf eine deutlich höhere VEGF Produktion innerhalb der ersten 4 Tage unter Hypoxie messbar

war im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe. Im Verlauf waren beide Kurven abfallend.

In der Literatur wird VEGF als einer der wichtigsten Faktoren für die Angiogenese beschrieben, allerdings lässt die Produktion unter chronischer Hypoxie nach, was sich in unserem Modell bestätigte (46).

Ein weiteres proangiogenes Protein ist Angiogenin, welches ähnlich wie VEGF einen Anstieg der Produktion in den ersten vier Tagen aufwies, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen Normoxie oder Hypoxie. Angiogenin oder auch Angiopoetin genannt, ist ein wichtiges Angiogenese Protein und führt zur Stabilisierung der Gefäße durch Verstärkung der Interaktion zwischen Endothel und glatten Muskelzellen (97).

Von den anti-angiogenen Faktoren war die Platelet Factor 4 (PF4) Expression in der hypoxischen Kultur signifikant verringert. PF4 ist ein Chemokin, welches von Granula in aktivierten Thrombozyten sezerniert wird. Im Rahmen der Hämostase und in der Wundheilung ist PF-4 von großer Bedeutung, vor allem für die Angiogenese (50).

Die deutliche Erhöhung der Expression von Thrombospondin-1 in hypoxischen Blutzellen kann unterschiedlich interpretiert werden. Thrombospondin-1 ist an der Neubildung von Blutgefäßen beteiligt (47), wird aber allerdings oftmals auch in der Literatur als Inhibitor der Angiogenese angeführt (83). Da für das komplexe Zusammenspiel der einzelnen pro-und anti-angiogenen Faktoren auch der zeitliche

Aspekt eine Rolle spielt, ist die von uns beobachtete signifikante Konzentrationsänderung dieser Faktoren in hypoxischen und normoxischen Blutzellen im Zeitverlauf zu beachten.

Zwischen Tag 4 und Tag 8 zeigte sich ein deutlicher Anstieg von Thrombospondin-1 unter normoxischen Bedingungen sowie ein deutlicher Abfall unter hypoxischen Bedingungen. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Monozyten in der ersten Wundheilungsphase aktiv Thrombospondin-1 produzieren (44).

Die IL-8 Expression zeigte im temporären Verlauf eine signifikante Reduktion zwischen Tag 8-12, was als Zeichen der abnehmenden Inflamationsphase interpretiert werden kann (104).

Eine wichtige Funktion der Matrix-Metalloproteinasen ist die Spaltung von Kollagenen in der extrazellulären Matrix. Sie werden deshalb auch oftmals als Kollagenasen bezeichnet (165,115,123).

Die hier näher untersuchten Faktoren MMP-8 und MMP-9 werden von neutrophilen Granulozyten gebildet, die im Rahmen der Wundheilung während der Inflamationsphase in die Wunde einwandern (91) und im Gleichgewicht mit ihren Antagonisten, der TIMP Gruppe einen reibungslosen Ablauf der Granulationsphase zur Bildung von frischem Granulationsgewebe ermöglichen (131,132). Es wurde beschrieben, dass es bei chronischen, diabetischen Ulcera zu einem Ungleichgewicht zwischen Matrix-abbauenden und aufbauenden Faktoren kommt (131,123).

Bei der chronischen Wunde überwiegt eine unkontrollierte Inflammation mit Einstrom von Entzündungszellen wie Granulozyten und Makrophagen (183). Diese sezernieren u.a. pro-inflammatorische Zytokine, die ihrerseits die Produktion von

Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) steigern (118). Die erhöhte Aktivität bzw. der Überschuss an MMPs kann zur Folge haben, dass neu synthetisierte Bindegewebsbestandteile wie Fibronectin und Collagen degradiert werden und es somit nicht zur Ausbildung eines stabilen Granulationsgewebes kommen kann (181).

Das Gleichgewicht von Gewebeaufbau und Gewebeabbau verschiebt sich somit in chronischen Wunden zugunsten des Abbaus (127). Dies würde erklären, warum in unserem Modell die frischen Blutzellen unter der Stimulation von Hypoxie (3% O₂) weniger MMP-8 und MMP-9 produzierten.

4.1.2 Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Faktorproduktion

In der weiteren Folge wurde der Einfluss der Umgebungsbedingungen für die Faktorproduktion der peripheren Blutzellen erforscht. Als erster Parameter wurde die Überlebensfähigkeit der Zellen unter Hypoxie mittels LDH Assay getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass Hypoxie eine insignifikant geringere Überlebensrate der peripheren Blutzellen bewirkte.

Weiters wurde der Einfluss der spezifischen Eigenschaften der Scaffold Materialien im Hinblick auf die Faktorproduktion in PBMC untersucht. Wie in der Literatur beschrieben wurde, (138) übt Collagen (z.B. Bovines Collagen Typ I) einen angiogenen Stimulationseffekt auf Endothelzellen aus und wird daher als Trägermaterial bereits in der Wundversorgung eingesetzt (141,168,58,177).

Wie die Ergebnisse zeigten, war die Festigkeit der Scaffold Materialien für die angiogene Stimulation, bzw. Faktorproduktion, der PMBC von Bedeutung. Das ge-

presste, festere Hydrogel hatte eine vierfach höhere VEGF Ausschüttung der Zellen zur Folge verglichen zu den Zellen, die auf nicht gepresstem Hydrogel oder unbeschichteten Zellkulturplatten (PET) kultiviert wurden.

Dieses Ergebnis kann in Hinblick auf die Mechanosensitivität von mesenchymalen Stammzellen, die ebenfalls mit einer Steigerung der Osteo-und Angiogenese auf erhöhte Festigkeit reagieren, interpretiert werden (10).

Wie auch bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte, reagieren hämatopoetische Stammzellen, auf biomechanische Krafteinwirkung mit einer gesteigerten Expression von Hämatopoese-assoziierten Faktoren (1).

Früheren Berichten zufolge spielt die Mechanotransduktion auch zwischen Endothelzellen eine entscheidende Rolle im „Remodelling“ der Endothelzellen bei der Gefäßneubildung (45).

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass Fibrinbeschichtung ebenfalls eine signifikant erhöhte VEGF Produktion in PBMC im Vergleich zu Collagen induzierte, wobei auch Collagen die Blutzellen stärker stimulierte als die Polyethylenbeschichtung der normalen Zellkulturplatten. Dies könnte als Hinweis auf einen möglichen Einfluss der Umgebungsbedingungen einer Wunde vor Ort interpretiert werden. Im natürlichen Wundgrund ist Fibrin physiologisch vorhanden, um die Angiogenese zu stimulieren (117).

Die dabei ablaufende Zell-Matrix Interaktion von Fibrinfragmenten mit Endothelzellen konnten in früheren Studien bereits nachgewiesen werden. HUVECS zeigten ein erhöhtes Adhäsionspotenzial und eine schnellere Differenzierung, wenn sie auf

Fibrinbeschichtung kultiviert wurden, im Vergleich zu Kollagen- oder Fibronectinbeschichtungen (23). Unter Verwendung von Integrin-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die Endothelzelladhäsion an Fibrinfragmente durch Integrin $\alpha 5\beta 1$ vermittelt wurde (23). Die Genexpressionsanalyse von Endothelzellen, die auf verschiedenen Substraten plattiert wurden, zeigte, dass die Kultivierung auf Fibrin-Fragmenten eine erhöhte Genexpression von parakrinen Faktoren wie VEGF-A, TGF- β 1, SDF-1, IL-8 und MIP-1 zur Folge hatte (23).

Um den Einfluss der Kollagen- und Fibrinbeschichtung auf die Produktion anderer Faktoren (z.B. EZM Modulatoren) zu untersuchen, wurde ein weiterer Proteome Assay (Protein Screening Test) durchgeführt. Die Resultate daraus zeigten eine erhöhte Konzentration an MMP-8 und MMP-9 in den Kollagen-beschichteten Zellkulturplatten, wobei nur hinsichtlich MMP-8 eine Signifikanz festzustellen war. Diese Beobachtung lässt sich in Hinblick auf die Physiologie der Wundheilung erklären. Im Allgemeinen bewirkt Kollagen eine Stimulation der Remodellierungsvorgänge, an denen die Matrix-Metalloproteinasen beteiligt sind. Kommt es zu einem Stimulus durch das Freiliegen von Kollagenfasern bzw. durch die Neubildung von Kollagen durch Fibroblasten in einer frischen Wunde, führt dies zu einer erhöhten Expression von MMPs (37).

4.2 Klinische Wundauflagen als bioaktive Trägermaterialien

Die Untersuchungen der Umgebungsbedingungen sowie der Einfluss des Scaffold Materials auf die peripheren Blutzellen und deren Faktorproduktion waren wie oben beschrieben getestet und evaluiert worden. Durch das neu etablierte *in vitro* 2 Kammer System konnte eine Testreihe mit unterschiedlichen gebräuchlichen

Wundauflagen durchgeführt werden. Ziel war es ein Trägermaterial zu finden, das unter sterilen Bedingungen die von den PBMC sezernierten Faktoren aufnehmen und an die Wunde wieder abgeben kann. Hierfür wurden zähflüssige Wundgele, feste Wundauflagen und Microsphere Carrier (Polystyrol Kügelchen) getestet.

Eine Limitation der Studie war allerdings durch die unterschiedlichen Mengen der Releasates gegeben, die bei den festen Wundauflagen vergleichbar waren, allerdings im Vergleich mit den gelartigen Releasates nicht normiert werden konnten.

4.2.1 Unterschiedliche Stimulation der Faktorproduktion durch die klinischen Wundauflagen

Die beiden Schaumstoffauflagen Mepilex® und Permafoam® zeigten die höchsten Konzentrationen an VEGF, gefolgt von den Alginaten Aquacel® und Nu Derm®. In den Releasates der Sorbalgon® Ansätze war keinerlei VEGF messbar. Aus der Literatur ist bekannt, dass Schaumstoffverbände die Wundheilung beschleunigen (192). Der Grund für die deutlich höhere VEGF Aufnahme- und Freisetzungskapazitäten von Mepilex® könnte in der dreidimensionalen Struktur der Wundauflage liegen. In den rasterelektronenmikroskopischen Bildern zeigen sich große Taschen, in denen sich Faktoren möglicherweise besser ansammeln können, als beispielsweise in den Mikrofasern von Aquacel®.

Die vergleichsweise durchschnittlich geringeren VEGF-Konzentrationen in den gelartigen Wundartikeln könnten durch ihre zähflüssige Konsistenz und der dadurch erschwerten, mechanischen Extraktion der Faktoren erklärt werden. Dabei zeigten Collagen und Fibrin Gel die höchste VEGF Konzentration. Eine gute

Aufnahmekapazität der anderen gelartigen Produkte kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da die Aufnahme nicht gemessen werden konnte.

Kollagen spielt in der Wundheilung eine wichtige Rolle, sowohl durch die direkte Interaktion mit beispielsweise TGF Beta oder PDGF, als auch durch die Stimulation der Migration von Endothelzellen und Keratinozyten (120).

Collagen-beschichtete Beads zeigten die höchsten VEGF Konzentrationen nach 12 Stunden. Dies korreliert mit dem temporären Verlauf der VEGF Expression unter Hypoxie in unseren Vorversuchen. Eine ähnliche Stimulation der VEGF Synthese in PBMC zeigte auch die Fibronectin Beschichtung. Fibronectin spielt vor allem in der ersten Phase der Wundheilung (Exsudationsphase) eine wichtige Rolle.

4.2.2 Angiogenes Potenzial der zellfreien Überstände aus den kultivierten Wundauflagen

Die Releasates der Wundauflagen zeigten in den Tube formation Assays signifikante Unterschiede. Es ergab sich eine Korrelation der Konzentration des VEGF-Gehalts mit der Aktivierung der Gefäßneubildung, allerdings nicht für Releasates aus gelartigen Wundartikel.

Releasates aus Fibrin-Gel® zeigten eine signifikant geringere Induktion der Gefäßneubildung im Vergleich mit den übrigen Gelauflagen, mit kaum nachweisbaren Tubules und inaktiven Endothelzellen. Dies lässt sich möglicherweise durch den bekannten Effekt von Fibrin, nämlich VEGF zu binden, erklären (156).

In unseren Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass Releasates trotz hoher VEGF Konzentrationen eine Inhibition der endothelialen Tube formation bewirkten, was in Zusammenhang mit dem Faktor PF4 stand. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Matrixkomponente des gebildeten Fibrins zunächst als biochemische antiangiogene Barriere fungiert, was darauf hindeutet, dass die Angiogenese der Fibrinolyse-vermittelten angiogenen Desinhibition folgt (70).

Weiters ist anzunehmen, dass neben VEGF noch weitere anti-angiogene Faktoren in den Fibrin-Gel Releasates enthielten, die im Laufe der 12 Tage durch die peripheren Blutzellen synthetisiert worden waren (185).

Trotz hoher VEGF Konzentrationen zeigten Releasates aus festen Wundauflagen keinen Effekt auf die Gefäßneubildung von HUVECS. Eine Hypothese hierfür ist, dass VEGF nicht der einzige entscheidende Faktor in der Gefäßneubildung darstellt. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass chronische Hypoxie die Signalwege und Expression von VEGF hinunter reguliert (134).

Sorbalgon® zeigte als einzige Wundauflage keine Abgabe von VEGF und keine Induktion von Gefäßneubildung. Nicht auszuschließen bleibt auch die Vermutung, dass diese Wundauflagen Faktoren innerhalb der 12 Tage zwar aufgenommen, aber vor Endpunkt des Versuchs wieder abgegeben hatten.

In der Gruppe der Microsphere Carrier zeigten sich vor allem bei den Collagenbeschichteten Beads im Tube formation Assay signifikant längere Gefäßstrukturen. In den mikroskopischen Aufnahmen konnte ein direkter Kontakt zwischen den HUVECS und den Micro Beads festgestellt werden. Dies könnte bedeuten, dass

die Funktion der Micro Beads über die Faktorabgabe hinausgeht und ihre mechanischen und haptischen Eigenschaften eine Rolle für die Gefäßneubildung spielen (144). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Fibrin – beschichtete Micro Beads durch Kontakt mit Endothelzellen diese zur Proliferation und Migration anregen und die Granulation des Gewebes beschleunigten (60).

Im Invasion Assays konnte eine Korrelation des VEGF Gehalts der Releasates mit den Invasionsraten der HUVECs *in vitro* festgestellt werden. Vor Allem Fibrin Gel Reasates erhöhten die migratorische Aktivität der HUVECS signifikant. Es ist bekannt, dass Fibrin als Kultivierungsgrundlage von Endothelzellen zur Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Zytokinen führt und Einfluss auf die Chemotaxis von Endothelzellen hat (13,14,156).

4.3 Therapeutische Angiogenese und Ziel der Translation

Bisher gibt es nur wenige in der Literatur beschriebene translationale Strategien zur klinischen Umsetzung therapeutischer Angiogenese. In den ersten klinischen Studien wurde therapeutische Angiogenese mit einzelnen Wachstumsfaktoren wie z. B. VEGF, EGF, FGF und PDGF mittels genetischer Manipulation an Mäusen versucht, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen (51,34,122,102).

Für die therapeutische Angiogenese sind derzeit zwei Strategien verbreitet (6,164,25). Erstens, Strategien, die Hypoxie nutzen, um Stammzellen *in vitro* zu präkonditionieren (166) und anschließend *in vivo* zu implantieren. Zweitens, Strategien, wonach Zellen *in vitro* hypoxisch präkonditioniert und die zellfreien Kulturüberstände für die Induktion der Angiogenese *in vivo* verwendet werden.

Aus früheren Berichten geht hervor, dass hypoxisch präkonditionierte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark die Mikrovaskularisation von Lappenplastiken (ultra long random skin flap) signifikant steigern konnten, nachdem die präkonditionierten Zellen in die dorsalen Hautlappenplastiken von Ratten transplantiert worden waren. Als Vergleichsgruppe dienten normoxische mesenchymale Stammzellen (184).

Eine weitere Möglichkeit der Umsetzung therapeutischer Angiogenese ist der Gentransfer (193,157) von VEGF oder Hypoxie-assoziierten Transkriptionsfaktoren (17,110), die sich derzeit noch in der präklinischen Testphase befinden (102,57).

So konnte in einer Studie bereits gezeigt werden, dass Mäuse mit ischämischem Fußsyndrom, nach intramuskulär injiziertem, adenoviral eingebrachtem exogenem HIF-1 alpha, eine verstärkte Angiogenese durch signifikant gesteigerte Zelladhäsion und Migration von Endothelzellen aufwiesen (150).

Der Versuch eines *in vivo* Gentransfers von Ad-VEGF 121 in chronische Hautdefekte von Schweinen resultierte zwar in einer erhöhten VEGF-Expression, aber zeigte keinerlei Einfluss auf die Wundheilung bzw. die Defektverkleinerung. Dies spricht wiederum für die Hypothese, dass VEGF nicht der einzig entscheidende Faktor in der Angiogenese und konsekutiven Wundheilung ist (182).

Weiters konnte gezeigt werden, dass die Nekrose an Zehen und Hinterbeinen von genmodifizierten Mäusen rückläufig war, nachdem HIF-1 Alpha überexprimierende endotheliale Vorläuferzellen injiziert worden waren. Nach Einbringen dieser Zellen konnte bereits 14 Tage nach Transplantation eine signifikante Verbesserung der Nekrosen gemessen werden (89).

4.3.1 Hypoxische Konditionierung von peripheren Blutzellen *in vitro*

Strategien zur Wundheilung, die auf einer hypoxischen Präkonditionierung von Zellen *in vitro* oder *in vivo* basieren, sind seit mehreren Jahren ein zentrales Forschungsthema (95,176,68,126,6,167). Die hypoxische Präkonditionierung von humanen peripheren Blutzellen schafft eine autologe Therapiemöglichkeit für den Patienten, da Spender und Empfänger der Zellen identisch ist (135).

Wie bereits in der Literatur beschrieben, sind erfolgreiche autologe Stammzelltransfer-Versuche mit peripheren Blutzellen und mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark durchgeführt worden (135,198,81,2), sowohl zur Verbesserung der myokardialen Reperfusion (171) als auch bei chronischer peripherer Ischämie, sowie nach Verbrennungen (3,70,66).

So konnte bereits gezeigt werden, dass hypoxisch präkonditionierte periphere Blutzellen (PBMC) nach 24 h ein erhöhtes angiogenes Potenzial *in vivo* entfalten, nachdem sie in ischämische Hinterpfoten von Mäusen implantiert wurden (145). Im Vergleich zu den normoxisch präkultivierten Blutzellen konnte eine signifikant höhere Dichte an Gefäßneubildung nach 28 Tagen detektiert werden. Auch der Blutfluss in den ischämischen Gefäßen war signifikant verbessert (145).

Ein weiterer Aspekt bei der hypoxischen Präkonditionierung von peripheren Blutzellen *in vitro* ist die Möglichkeit, die Faktorproduktion nicht nur durch die Umgebungsbedingungen beeinflussen zu können, sondern auch die zeitliche Expression der Faktoren zu kontrollieren (163).

Gemäß der, in unseren Versuchen bestimmten, natürlichen temporären Schwankungen der Faktorexpression, könnte eine Implantation *in vivo* an jenem Zeitpunkt erfolgen, an dem die angiogene Faktorproduktion günstig ist (69).

Darüber hinaus kann die Implantation von Zellen *in vivo* erspart werden, indem die Faktoren durch die semipermeable Membran in die Umgebung diffundieren und von Trägermaterialien aufgenommen werden (41).

Dieses Trägermaterial beeinflusst nicht nur die Faktorproduktion durch Stimulation der peripheren Blutzellen *in vitro* (71), sondern beeinflusst auch die Freisetzungsrates der aufgenommenen Faktoren, wie zum Beispiel VEGF *in vivo* (49).

4.3.2 Ausblick auf die Translation der bioaktiven Wundauflagen

Hintergrund der vorliegenden Studie war die steigende Anzahl an chronischen und komplizierten Wunden in der Medizin (11,88).

Eine chronische Wunde wird nach der aktuellen AWMF Leitlinie S3 von der deutschen Gesellschaft für Wundheilung als „Integritätsverlust der Haut und einer oder mehrerer der darunterliegenden Strukturen mit einer fehlenden Abheilung von acht Wochen“ definiert (199).

Bei der chronischen Wunde überwiegt eine unkontrollierte Inflammation (197) mit Einstrom von Entzündungszellen wie Granulozyten und Makrophagen. Diese sezernieren u. a. pro-inflammatorische Zytokine, die ihrerseits die Produktion von MMPs (Matrix-Metallo-Proteasen) steigern.

Die erhöhte Aktivität bzw. die gesteigerte Produktion von MMPs in chronischen Wunden (146,188) und ein irreversibler Arrest der Wundheilung kann zur Folge haben, dass sich die Behandlung komplizierter Wunden mithilfe herkömmlicher Wundaufgaben als ineffektiv erweist, da auf zellulärer Ebene nur noch geringe Erfolgsaussichten für eine eigenständige Heilung bestehen (200).

Was die topische Therapie von chronischen Wunden mittels VEGF angeht, so konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass eine rein topische Applikation von 2 µg VEGF für die Induktion der Angiogenese in chronischen Wunden nicht effektiv war (19).

Das hier beschriebene *in vitro* Modell, basierend auf den, durch Hypoxie aktivierbaren angiogenen Eigenschaften von peripheren Blutzellen, in Kombination mit einem geeigneten Trägermaterial, zeichnet sich durch eine relativ einfache klinische Anwendbarkeit aus. Der nächste Schritt ist nun die Entwicklung einer individuellen, bioaktiven Wundbehandlung für Patienten mit komplizierten Wunden.

5 Zusammenfassung

Komplizierte Wunden und Wundheilungsstörungen stellen eine zunehmende Herausforderung für die moderne Medizin dar, nicht zuletzt aufgrund der steigenden Morbidität von Diabetes mellitus, venöser Insuffizienz, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Adipositas (5).

Das Hauptproblem bei nicht heilenden Wunden stellt die chronische Ischämie und mangelnde Angiogenese dar. Paradoxe Weise ist Hypoxie der primäre Stimulus für die Angiogenese (68), indem sie die Produktion von Wachstumsfaktoren (PDGF, FGF; EGF) und die Ausschüttung von Zytokinen aus Makrophagen, Keratinozyten und Fibroblasten fördert. Diese Faktoren sind essenziell für Zellproliferation, Migration und Angiogenese in der Wundheilungskaskade (153).

Da in einer frischen Wunde periphere Blutzellen die ersten Zellen vor Ort sind (durch das Einströmen des Blutes), wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) in der Wundheilung untersucht. Dafür wurde ein hypoxisches *in vitro* Wundmodell etabliert, bestehend aus zwei Kammern, wobei in einer Kammer periphere mononukleäre Blutzellen kultiviert wurden.

Es erfolgte die Auswertung der unterschiedlichen angiogenen Faktorproduktion der Zellen nach hypoxischer Präkonditionierung im Vergleich zur normoxischen Kontrollkultur. Aufgrund des 2 Kammer Aufbaus und der Trennung durch eine semipermeable Membran, konnten die gebildeten Faktoren zellfrei gewonnen und für Angiogenese Versuche *in vitro* verwendet werden.

Weiters wurde der Einfluss der Umgebungsparameter, wie pH-Wert, Elastizitätsmodul und Beschaffenheit der Scaffold Materialien, auf welchen die Blutzellen kultiviert wurden, untersucht. Anschließend erfolgte die Testung klinisch gebräuchlicher Wundauflagen, die ebenfalls in dem 2 Kammer Modell mit den peripheren Blutzellen kultiviert wurden. Mittels ELISA wurden dann die Überstände (Releasates) der Wundauflagen auf ihren VEGF Gehalt untersucht.

Das angiogene Potenzial der Releasates aus den Wundauflagen wurde mittels Tube formation und Invasion Assays unter Verwendung von humanen Endothelzellen (HUVECS) getestet.

Das Ziel dieser Arbeit war, eine Translation der *in vitro* Ergebnisse für die Behandlung komplizierter Wunden *in vivo*. Durch eine Reihe von Testverfahren sollte bestätigt werden, dass es möglich ist, autologe angiogene Faktoren aus peripheren Blutzellen eines Patienten hypoxisch zu stimulieren, zellfrei zu gewinnen und dem Patienten mithilfe einer geeigneten Wundauflage zu applizieren. Ziel war dabei die Förderung der lokalen Angiogenese und die konsekutive Verbesserung der Durchblutung des ischämischen Gewebes.

6 Publikationen

6.1 Originalarbeiten

- 1) Hadjipanayi E, Kuhn PH, Moog P, **Bauer A.T.**, Kuekrek H, Mirzoyan L, Hummel A, Kirchhoff K, Salgin B, Isenburg S, Dornseifer U, Ninkovic M, Machens HG, Schilling AF. *The Fibrin Matrix Regulates Angiogenic Responses within the Hemostatic Microenvironment through Biochemical Control* **PLOS one 2015 (Impact factor 3,23)**

- 2) Hadjipanayi E.*, **Bauer A.T.***, Moog P., Salgin B., Kükrek H., Fersch B., Hopfner U., Meissner T., Schlütter A., Ninkovic M., Machens H.G., Schilling A.F. *Cell-free carrier system for localised delivery of peripheraln blood cell-derived engineered factor signaling: towards development of a one-step device for autologous angiogenic therapy.* **Journal of Controlled Release 2013 (Impact factor: 7,705)**

*Co-First-Authorship

- 3) Hadjipanayi E., Cheema U., Hopfner U., **Bauer A.**, Machens H.G., Schilling A.F. *Injectable system for spatio-temporally controlled delivery of hypoxia-induced angiogenic signalling* **Journal of Controlled Release 2013 (Impact factor: 7,705)**

6.2 Vorträge/Abstracts

- 1) **Bauer A.T.,** Hadjipanayi E., Reinshagen C., Bauer L., Hopfner U., Schlüter A., Dornseifer U., Ninkovic M., Machens H.G., Schilling A.F. *EmaCure: Entwicklung eines Bioreaktors für die EXtraCOorporale Wundsimulation (EXCOW) zur Gewinnung personalisierter angiogenetischer Faktoren für eine bioaktive Wundbehandlung*

DGPRÄC Kongress 2014 Komplizierte Wunden Sitzung München

- 2) **Bauer A.T.,** Hadjipanayi E., Moog P., Salgin B., Kükrek H., Hopfner U., Meissner T., Schlüter A., Ninkovic M., Machens H.G., Schilling A.F. *Personalisierte bioaktive Wundverbände mit angiogenetischen Faktoren aus autologem peripheren Blut*

DGWF Kongress Preisträger Sitzung 2014 Bochum

- 3) **Bauer A.T.,** Hadjipanayi E., Moog P., Salgin B., Kükrek H., Fersch B., Hopfner U., Meissner T., Schlütter A., Ninkovic M., Machens H.G., Schilling A.F. *Cell-free Carrier System for Localised Delivery of Peripheral Blood Cell-Derived Engineered Factor Signaling: Towards Development of a One-Step Device for Autologous Angiogenic Therapy*

Abstract book German Medical Science 2013 (DGPRÄC)

- 4) Hadjipanayi E., **Bauer A.T.,** Hopfner U., Machens H.G., Schilling A.F. *Defining environmental parameters for optimizing production of angiogenic signalling by peripheral blood cells: towards engineering a bed-side device*

Best Paper Award at IPRAS-IQUAM 2012 (Athens, Greece)

- 5) Hadjipanayi E., Cheema U., **Bauer A.T.**, Machens H.G., Schilling A.F. *In-jectable system for spatio-temporally controlled delivery of hypoxia-induced angiogenic signalling*

EURAPS Congress 2012 München

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H.-G. Machens, meinem Chefarzt und Leiter der Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie am Klinikum Rechts der Isar für seine fortwährende Unterstützung in all den Jahren bis zur Fertigstellung dieser Arbeit, sowie für die Bereitstellung der finanziellen Mittel. Ich bin dankbar unter seiner Führung arbeiten und weiter forschen zu dürfen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. A.F. Schilling für die Chance, die er mir mit dieser Arbeit gegeben hat und für die Überlassung des Themas. Ich bin ihm dankbar für die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit, seine Geduld und die Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizontes. Er war mir ein exzellenter Doktorvater der mich stets gefordert und gefördert hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn PD Dr. E. Hadjipanayi. Ohne ihn wäre ich niemals auf diese spannende, wenn auch sehr arbeitsintensive wissenschaftliche Reise gegangen. Ich bin dankbar und stolz Teil seines sehr erfolgreichen wissenschaftlichen Teams gewesen zu sein.

Mein besonderer Dank geht auch an Frau U. Hopfner und Frau M. Kirsch, die mich freundschaftlich und wissenschaftlich weiterhin begleiten und unterstützen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre jahrelange finanzielle Unterstützung und ihre Geduld danken. Ein besseres wissenschaftliches Vorbild hätte ich mir nicht wünschen können.

8 Literaturverzeichnis

1. Adamo, L., Naveiras, O., Wenzel, P. L., McKinney-Freeman, S., Mack, P. J., Gracia-Sancho, J., Suchy-Dacey, A., Yoshimoto, M., Lensch, M. W., Yoder, M. C., Garcia-Cardena, G. & Daley, G. Q. (2009). Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature* 459(7250): 1131-1135.
2. Al-Khaldi, A., Al-Sabti, H., Galipeau, J. & Lachapelle, K. (2003). Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Annals of Thoracic Surgery* 75(1): 204-209.
3. Amann, B., Luedemann, C., Ratei, R. & Schmidt-Lucke, J. A. (2009). Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplantation* 18(3): 371-380.
4. Amano, K., Matsubara, H., Iba, O., Okigaki, M., Fujiyama, S., Imada, T., Kojima, H., Nozawa, Y., Kawashima, S., Yokoyama, M. & Iwasaka, T. (2003). Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression. *Hypertension* 41(1): 156-162.
5. Andrews, K. L., Houdek, M. T. & Kiemele, L. J. (2015). Wound management of chronic diabetic foot ulcers: From the basics to regenerative medicine. *Prosthetics and Orthotics International* 39(1): 29-39.
6. Annex, B. H. & Simons, M. (2005). Growth factor-induced therapeutic angiogenesis in the heart: protein therapy. *Cardiovascular Research* 65(3): 649-655.
7. Ashby, W. J. & Zijlstra, A. (2012). Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 4(11): 1338-1350.
8. Astashkina, A., Mann, B. & Grainger, D. W. (2012). A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology and Therapeutics* 134(1): 82-106.
9. Avishai, E., Yeghiazaryan, K. & Golubnitschaja, O. (2017). Impaired wound healing: facts and hypotheses for multi-professional considerations in predictive, preventive and personalised medicine. *Epma j* 8(1): 23-33.
10. Barreto, S., Gonzalez-Vazquez, A., Cameron, A. R., Cavanagh, B., Murray, D. J. & O'Brien, F. J. (2017). Identification of the mechanisms by which age alters the mechanosensitivity of mesenchymal stromal cells on substrates of differing stiffness: Implications for osteogenesis and angiogenesis. *Acta Biomater.*
11. Barrientos, S., Brem, H., Stojadinovic, O. & Tomic-Canic, M. (2014). Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 22(5): 569-578.
12. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 16(5): 585-601.
13. Barsotti, M. C., Felice, F., Balbarini, A. & Di Stefano, R. (2011a). Fibrin as a scaffold for cardiac tissue engineering. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 58(5): 301-310.

14. Barsotti, M. C., Magera, A., Armani, C., Chiellini, F., Felice, F., Dinucci, D., Piras, A. M., Minnocci, A., Solaro, R., Soldani, G., Balbarini, A. & Di Stefano, R. (2011b). Fibrin acts as biomimetic niche inducing both differentiation and stem cell marker expression of early human endothelial progenitor cells. *Cell Proliferation* 44(1): 33-48.
15. Battinelli, E. M., Markens, B. A. & Italiano, J. E., Jr. (2011). Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood* 118(5): 1359-1369.
16. Bhakuni, T., Ali, M. F., Ahmad, I., Bano, S., Ansari, S. & Jairajpuri, M. A. (2016). Role of heparin and non heparin binding serpins in coagulation and angiogenesis: A complex interplay. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 604: 128-142.
17. Bhang, S. H., Kim, J. H., Yang, H. S., La, W. G., Lee, T. J., Kim, G. H., Kim, H. A., Lee, M. & Kim, B. S. (2011). Combined gene therapy with hypoxia-inducible factor-1alpha and heme oxygenase-1 for therapeutic angiogenesis. *Tissue Eng Part A* 17(7-8): 915-926.
18. Boateng, J. & Catanzano, O. (2015). Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing--A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104(11): 3653-3680.
19. Bolukbasi, N., Balcioglu, H. A., Ozkan, B. T., Tekkesin, M. S. & Ustek, D. (2014). Topical Single-dose Vascular Endothelial Growth Factor has No Effect on Soft Tissue Healing. *North American Journal of Medical Sciences* 6(10): 505-509.
20. Bouchentouf, M., Paradis, P., Forner, K. A., Cuerquis, J., Boivin, M. N., Zheng, J., Boulassel, M. R., Routy, J. P., Schiffrin, E. L. & Galipeau, J. (2010). Monocyte derivatives promote angiogenesis and myocyte survival in a model of myocardial infarction. *Cell Transplantation* 19(4): 369-386.
21. Brown, A. (2015). Phases of the wound healing process. *Nursing Times* 111(46): 12-13.
22. Burke, B., Giannoudis, A., Corke, K. P., Gill, D., Wells, M., Ziegler-Heitbrock, L. & Lewis, C. E. (2003). Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *American Journal of Pathology* 163(4): 1233-1243.
23. Caiado, F., Carvalho, T., Silva, F., Castro, C., Clode, N., Dye, J. F. & Dias, S. (2011). The role of fibrin E on the modulation of endothelial progenitors adhesion, differentiation and angiogenic growth factor production and the promotion of wound healing. *Biomaterials* 32(29): 7096-7105.
24. Campbell, P. G., Durham, S. K., Hayes, J. D., Suwanichkul, A. & Powell, D. R. (1999). Insulin-like growth factor-binding protein-3 binds fibrinogen and fibrin. *Journal of Biological Chemistry* 274(42): 30215-30221.
25. Cao, Y. (2009). Monotherapy versus combination therapy of angiogenic and arteriogenic factors for the treatment of ischemic disorders. *Current Molecular Medicine* 9(8): 967-972.
26. Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6(4): 389-395.
27. Carmeliet, P. & Collen, D. (2000). Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 902: 249-262; discussion 262-244.

28. Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D. & Keshert, E. (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394(6692): 485-490.
29. Chapman, H. A., Li, X., Alexander, J. P., Brumwell, A., Lorizio, W., Tan, K., Sonnenberg, A., Wei, Y. & Vu, T. H. (2011). Integrin $\alpha 6 \beta 4$ identifies an adult distal lung epithelial population with regenerative potential in mice. *Journal of Clinical Investigation* 121(7): 2855-2862.
30. Chazaud, B. (2014). Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* 219(3): 172-178.
31. Cheema, U., Brown, R. A., Alp, B. & MacRobert, A. J. (2008). Spatially defined oxygen gradients and vascular endothelial growth factor expression in an engineered 3D cell model. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(1): 177-186.
32. Chen, H., Herndon, M. E. & Lawler, J. (2000). The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biology* 19(7): 597-614.
33. Chen, Q., Varga, M., Wang, X., Haddad, D. J., An, S., Medzikovic, L., Derakhshandeh, R., Kostyushev, D. S., Zhang, Y., Clifford, B. T., Luu, E., Danforth, O. M., Rafikov, R., Gong, W., Black, S. M., Suchkov, S. V., Fineman, J. R., Heiss, C., Aschbacher, K., Yeghiazarians, Y. & Springer, M. L. (2016). Overexpression of Nitric Oxide Synthase Restores Circulating Angiogenic Cell Function in Patients With Coronary Artery Disease: Implications for Autologous Cell Therapy for Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc* 5(1).
34. Ching, Y. H., Sutton, T. L., Pierpont, Y. N., Robson, M. C. & Payne, W. G. (2011). The use of growth factors and other humoral agents to accelerate and enhance burn wound healing. *Eplasty* 11: e41.
35. Cil, N., Oguz, E. O., Mete, E., Cetinkaya, A. & Mete, G. A. (2017). Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries. *Biotechnic and Histochemistry* 92(1): 15-28.
36. Conway, E. M., Collen, D. & Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research* 49(3): 507-521.
37. Danielsen, P. L., Holst, A. V., Maltesen, H. R., Bassi, M. R., Holst, P. J., Heinemeier, K. M., Olsen, J., Danielsen, C. C., Poulsen, S. S., Jorgensen, L. N. & Agren, M. S. (2011). Matrix metalloproteinase-8 overexpression prevents proper tissue repair. *Surgery* 150(5): 897-906.
38. Darby, I. A. & Hewitson, T. D. (2016). Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell and Tissue Research* 365(3): 553-562.
39. Darby, I. A., Laverdet, B., Bonte, F. & Desmouliere, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 7: 301-311.
40. de Groot, P. G., Urbanus, R. T. & Roest, M. (2012). Platelet interaction with the vessel wall. *Handbook of Experimental Pharmacology* (210): 87-110.
41. Di Santo, S., Yang, Z., Wyler von Ballmoos, M., Voelzmann, J., Diehm, N., Baumgartner, I. & Kalka, C. (2009). Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One* 4(5): e5643.
42. Dinh, T., Braunagel, S. & Rosenblum, B. I. (2015). Growth factors in wound healing: the present and the future? *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery* 32(1): 109-119.

43. DiPietro, L. A. (2016). Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of Leukocyte Biology*.
44. DiPietro, L. A. & Polverini, P. J. (1993). Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. *American Journal of Pathology* 143(3): 678-684.
45. Dorland, Y. L. & Huvencuers, S. (2017). Cell-cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74(2): 279-292.
46. Eldred, J. A., McDonald, M., Wilkes, H. S., Spalton, D. J. & Wormstone, I. M. (2016). Growth factor restriction impedes progression of wound healing following cataract surgery: identification of VEGF as a putative therapeutic target. *Scientific Reports* 6: 24453.
47. Elpek, G. O., Gokhan, G. A. & Bozova, S. (2008). Thrombospondin-1 expression correlates with angiogenesis in experimental cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology* 14(14): 2213-2217.
48. Eming, S. A., Martin, P. & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine* 6(265): 265sr266.
49. Ennett, A. B., Kaigler, D. & Mooney, D. J. (2006). Temporally regulated delivery of VEGF in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* 79(1): 176-184.
50. Eppley, B. L., Woodell, J. E. & Higgins, J. (2004). Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 114(6): 1502-1508.
51. Falanga, V. (2000). Classifications for wound bed preparation and stimulation of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration* 8(5): 347-352.
52. Falanga, V., Isaacs, C., Paquette, D., Downing, G., Kouttab, N., Butmarc, J., Badiavas, E. & Hardin-Young, J. (2002). Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. *Journal of Investigative Dermatology* 119(3): 653-660.
53. Frenkel-Denkberg, G., Gershon, D. & Levy, A. P. (1999). The function of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is impaired in senescent mice. *FEBS Letters* 462(3): 341-344.
54. Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varnier, J. A. & Cheresh, D. A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 270(5241): 1500-1502.
55. Fritzenwanger, M., Jung, C., Goebel, B., Lauten, A. & Figulla, H. R. (2011). Impact of short-term systemic hypoxia on phagocytosis, cytokine production, and transcription factor activation in peripheral blood cells. *Mediators of Inflammation* 2011: 429501.
56. Gawaz, M. & Vogel, S. (2013). Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood* 122(15): 2550-2554.
57. George, E. M., Liu, H., Robinson, G. G., Mahdi, F., Perkins, E. & Bidwell, G. L., 3rd (2015). Growth factor purification and delivery systems (PADS) for therapeutic angiogenesis. *Vasc Cell* 7(1): 1.
58. Gerard, C. & Doillon, C. J. (2010). Facilitating tissue infiltration and angiogenesis in a tubular collagen scaffold. *J Biomed Mater Res A* 93(2): 615-624.
59. Gilmore, M. A. (1991). Phases of wound healing. *Dimensions in Oncology Nursing* 5(3): 32-34.

60. Gorodetsky, R., Clark, R. A., An, J., Gailit, J., Levdansky, L., Vexler, A., Berman, E. & Marx, G. (1999). Fibrin microbeads (FMB) as biodegradable carriers for culturing cells and for accelerating wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* 112(6): 866-872.
61. Goto, S., Hasebe, T. & Takagi, S. (2015). Platelets: Small in Size But Essential in the Regulation of Vascular Homeostasis - Translation From Basic Science to Clinical Medicine. *Circulation Journal* 79(9): 1871-1881.
62. Greaves, N. S., Ashcroft, K. J., Baguneid, M. & Bayat, A. (2013). Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of Dermatological Science* 72(3): 206-217.
63. Griga, T., Gutzeit, A., Sommerkamp, C. & May, B. (1999). Increased production of vascular endothelial growth factor by peripheral blood mononuclear cells in patients with inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 11(2): 175-179.
64. Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S. & Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev* 63(4-5): 352-366.
65. Guo, S. & Dipietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research* 89(3): 219-229.
66. Hacker, S., Mittermayr, R., Nickl, S., Haider, T., Lebherz-Eichinger, D., Beer, L., Mitterbauer, A., Leiss, H., Zimmermann, M., Schweiger, T., Keibl, C., Hofbauer, H., Gabriel, C., Pavone-Gyongyosi, M., Redl, H., Tschachler, E., Mildner, M. & Ankersmit, H. J. (2016). Paracrine Factors from Irradiated Peripheral Blood Mononuclear Cells Improve Skin Regeneration and Angiogenesis in a Porcine Burn Model. *Scientific Reports* 6: 25168.
67. Hadjipanayi, E., Ananta, M., Binkowski, M., Streeter, I., Lu, Z., Cui, Z. F., Brown, R. A. & Mudera, V. (2011). Mechanisms of structure generation during plastic compression of nanofibrillar collagen hydrogel scaffolds: towards engineering of collagen. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5(7): 505-519.
68. Hadjipanayi, E., Bauer, A. T., Moog, P., Salgin, B., Kuekrek, H., Fersch, B., Hopfner, U., Meissner, T., Schluter, A., Ninkovic, M., Machens, H. G. & Schilling, A. F. (2013). Cell-free carrier system for localized delivery of peripheral blood cell-derived engineered factor signaling: towards development of a one-step device for autologous angiogenic therapy. *Journal of Controlled Release* 169(1-2): 91-102.
69. Hadjipanayi, E., Cheema, U., Hopfner, U., Bauer, A., Machens, H. G. & Schilling, A. F. (2012). Injectable system for spatio-temporally controlled delivery of hypoxia-induced angiogenic signalling. *Journal of Controlled Release* 161(3): 852-860.
70. Hadjipanayi, E., Kuhn, P. H., Moog, P., Bauer, A. T., Kuekrek, H., Mirzoyan, L., Hummel, A., Kirchhoff, K., Salgin, B., Isenburg, S., Dornseifer, U., Ninkovic, M., Machens, H. G. & Schilling, A. F. (2015). The Fibrin Matrix Regulates Angiogenic Responses within the Hemostatic Microenvironment through Biochemical Control. *PloS One* 10(8): e0135618.
71. Hadjipanayi, E., Mudera, V. & Brown, R. A. (2009). Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 3(2): 77-84.

72. Hadjipanayi, E. & Schilling, A. F. (2013). Hypoxia-based strategies for angiogenic induction: the dawn of a new era for ischemia therapy and tissue regeneration. *Organogenesis* 9(4): 261-272.
73. Hadjipanayi, E. & Schilling, A. F. (2014). Regeneration through autologous hypoxia preconditioned plasma. *Organogenesis* 10(2): 164-169.
74. Han, G. & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy* 34(3): 599-610.
75. Hanson, D., Langemo, D., Thompson, P., Anderson, J. & Hunter, S. (2005). Understanding wound fluid and the phases of healing. *Adv Skin Wound Care* 18(7): 360-362.
76. Harato, K., Tanikawa, H., Morishige, Y., Kaneda, K. & Niki, Y. (2016). What are the important surgical factors affecting the wound healing after primary total knee arthroplasty? *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 11: 7.
77. Harris, L. S., Luck, J. E. & Atherton, R. R. (2017). Suboptimal identification of patient-specific risk factors for poor wound healing can be improved by simple interventions. *Int Wound J* 14(1): 138-141.
78. Hayashi, Y., Murakami, M., Kawamura, R., Ishizaka, R., Fukuta, O. & Nakashima, M. (2016). Erratum to: CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. *Stem Cell Research & Therapy* 7(1): 86.
79. Hesketh, M., Sahin, K. B., West, Z. E. & Murray, R. Z. (2017). Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences* 18(7).
80. Hickey, M. M. & Simon, M. C. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Current Topics in Developmental Biology* 76: 217-257.
81. Holzinger, C., Zuckermann, A., Kopp, C., Schollhammer, A., Imhof, M., Zwolfer, W., Baumgartner, I., Magometschnigg, H., Weissinger, E. & Wolner, E. (1994). Treatment of non-healing skin ulcers with autologous activated mononuclear cells. *European Journal of Vascular Surgery* 8(3): 351-356.
82. Hong, W. X., Hu, M. S., Esquivel, M., Liang, G. Y., Rennert, R. C., McArdle, A., Paik, K. J., Duscher, D., Gurtner, G. C., Lorenz, H. P. & Longaker, M. T. (2014). The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3(5): 390-399.
83. Huang, T., Sun, L., Yuan, X. & Qiu, H. (2017). Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. *Oncotarget*.
84. Hughes, A., Addison, I. E., Al-Hadithy, H. & Brozovic, B. (1981). Buffy coat and cell separator granulocyte concentrates. Comparison of cell content and in vitro granulocyte function. *Vox Sanguinis* 41(1): 1-5.
85. Iba, O., Matsubara, H., Nozawa, Y., Fujiyama, S., Amano, K., Mori, Y., Kojima, H. & Iwasaka, T. (2002). Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation* 106(15): 2019-2025.
86. Imanaka-Yoshida, K., Knudsen, K. A. & Linask, K. K. (1998). N-cadherin is required for the differentiation and initial myofibrillogenesis of chick cardiomyocytes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 39(1): 52-62.
87. Iwamoto, U., Hori, H., Takami, Y., Tokushima, Y., Shinzato, M., Yasutake, M. & Kitaguchi, N. (2015). A novel cell-containing device for regenerative medicine: biodegradable nonwoven filters with peripheral blood cells promote wound healing. *J Artif Organs* 18(4): 315-321.

88. Jarbrink, K., Ni, G., Sonnergren, H., Schmidtchen, A., Pang, C., Bajpai, R. &Car, J. (2016). Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst Rev* 5(1): 152.
89. Jiang, M., Wang, B., Wang, C., He, B., Fan, H., Shao, Q., Gao, L., Liu, Y., Yan, G. &Pu, J. (2008). In vivo enhancement of angiogenesis by adenoviral transfer of HIF-1alpha-modified endothelial progenitor cells (Ad-HIF-1alpha-modified EPC for angiogenesis). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40(10): 2284-2295.
90. Jonkman, J. E., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M. &Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adh Migr* 8(5): 440-451.
91. Joo, C. K. &Seomun, Y. (2008). Matrix metalloproteinase (MMP) and TGF beta 1-stimulated cell migration in skin and cornea wound healing. *Cell Adh Migr* 2(4): 252-253.
92. Kadota, Y., Nishida, K., Hashizume, K., Nasu, Y., Nakahara, R., Kanazawa, T., Ozawa, M., Harada, R., Machida, T. &Ozaki, T. (2016). Risk factors for surgical site infection and delayed wound healing after orthopedic surgery in rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol* 26(1): 68-74.
93. Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Amano, K., Iba, O., Imada, T. &Iwasaka, T. (2002). Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22(11): 1804-1810.
94. Kareva, I., Abou-Slaybi, A., Dodd, O., Dashevsky, O. &Klement, G. L. (2016). Normal Wound Healing and Tumor Angiogenesis as a Game of Competitive Inhibition. *PLoS One* 11(12): e0166655.
95. Kim, W. S. &Sung, J. H. (2012). Hypoxic Culturing Enhances the Wound-Healing Potential of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 1(4): 172-176.
96. Kimura, H. &Esumi, H. (2003). Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochimica Polonica* 50(1): 49-59.
97. Kishimoto, K., Liu, S., Tsuji, T., Olson, K. A. &Hu, G. F. (2005). Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* 24(3): 445-456.
98. Kobayashi, T., Hamano, K., Li, T. S., Nishida, M., Ikenaga, S., Hirata, K., Zempo, N. &Esato, K. (2002). Angiogenesis induced by the injection of peripheral leukocytes and platelets. *Journal of Surgical Research* 103(2): 279-286.
99. Komarcevic, A., Pejakov, L. &Komarcevic, M. (2000). [New views on the physiology of wound healing]. *Medicinski Pregled* 53(9-10): 479-483.
100. Komatsu, D. E. &Hadjiargyrou, M. (2004). Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone* 34(4): 680-688.
101. Kosir, M. A., Quinn, C. C., Wang, W. &Tromp, G. (2000). Matrix glycosaminoglycans in the growth phase of fibroblasts: more of the story in wound healing. *Journal of Surgical Research* 92(1): 45-52.

102. Koyama, T., Hackl, F., Aflaki, P., Bergmann, J., Zuhaili, B., Waisbren, E., Govindarajulu, U., Yao, F. & Eriksson, E. (2011). A new technique of ex vivo gene delivery of VEGF to wounds using genetically modified skin particles promotes wound angiogenesis. *Journal of the American College of Surgeons* 212(3): 340-348.
103. Kubo, M., Li, T. S., Suzuki, R., Shirasawa, B., Morikage, N., Ohshima, M., Qin, S. L. & Hamano, K. (2008a). Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 294(2): H590-595.
104. Kubo, T., Sugita, T., Shimose, S., Matsuo, T., Arihiro, K. & Ochi, M. (2008b). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *Journal of Bone and Joint Surgery (British Volume)* 90(3): 364-370.
105. Kusumanto, Y. H., Dam, W. A., Hospers, G. A., Meijer, C. & Mulder, N. H. (2003). Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 6(4): 283-287.
106. Law, J. X., Chowdhury, S. R., Aminuddin, B. S. & Ruszymah, B. H. I. (2017). Role of plasma-derived fibrin on keratinocyte and fibroblast wound healing. *Cell Tissue Bank*.
107. Lawler, J. (2000). The functions of thrombospondin-1 and-2. *Current Opinion in Cell Biology* 12(5): 634-640.
108. Levy, A. P. (1999). A cellular paradigm for the failure to increase vascular endothelial growth factor in chronically hypoxic states. *Coronary Artery Disease* 10(6): 427-430.
109. Li, J., Zhang, Y. P. & Kirsner, R. S. (2003). Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy Research and Technique* 60(1): 107-114.
110. Li, M., Liu, C., Bin, J., Wang, Y., Chen, J., Xiu, J., Pei, J., Lai, Y., Chen, D., Fan, C., Xie, J., Tao, Y. & Wu, P. (2011). Mutant hypoxia inducible factor-1alpha improves angiogenesis and tissue perfusion in ischemic rabbit skeletal muscle. *Microvascular Research* 81(1): 26-33.
111. Li, S., Zhou, B. & Han, Z. C. (2006). Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and CD34- mononuclear cells. *Thrombosis and Haemostasis* 95(2): 301-311.
112. Liang, C. C., Park, A. Y. & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2(2): 329-333.
113. Lichtenauer, M., Mildner, M., Hoetzenecker, K., Zimmermann, M., Podesser, B. K., Sipos, W., Berenyi, E., Dworschak, M., Tschachler, E., Gyongyosi, M. & Ankersmit, H. J. (2011). Secretome of apoptotic peripheral blood cells (APOSEC) confers cytoprotection to cardiomyocytes and inhibits tissue remodelling after acute myocardial infarction: a preclinical study. *Basic Research in Cardiology* 106(6): 1283-1297.
114. Luo, F., Wariaro, D., Lundberg, G., Blegen, H. & Wahlberg, E. (2002). Vascular growth factor expression in a rat model of severe limb ischemia. *Journal of Surgical Research* 108(2): 258-267.

115. Manuel, J. A. &Gawronska-Kozak, B. (2006). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix Biology* 25(8): 505-514.
116. Martin, P. &Nunan, R. (2015). Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology* 173(2): 370-378.
117. Martinez, C. E., Smith, P. C. &Palma Alvarado, V. A. (2015). The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update. *Frontiers in Physiology* 6: 290.
118. McCourt, M., Wang, J. H., Sookhai, S. &Redmond, H. P. (1999). Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Archives of Surgery* 134(12): 1325-1331; discussion 1331-1322.
119. Mildner, M., Hacker, S., Haider, T., Gschwandtner, M., Werba, G., Barresi, C., Zimmermann, M., Golabi, B., Tschachler, E. &Ankersmit, H. J. (2013). Secretome of peripheral blood mononuclear cells enhances wound healing. *PLoS One* 8(3): e60103.
120. Montesano, R., Mossaz, A., Ryser, J. E., Orci, L. &Vassalli, P. (1984). Leukocyte interleukins induce cultured endothelial cells to produce a highly organized, glycosaminoglycan-rich pericellular matrix. *Journal of Cell Biology* 99(5): 1706-1715.
121. Montesano, R. &Orci, L. (1988). Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(13): 4894-4897.
122. Mulder, G., Tallis, A. J., Marshall, V. T., Mozingo, D., Phillips, L., Pierce, G. F., Chandler, L. A. &Sosnowski, B. K. (2009). Treatment of nonhealing diabetic foot ulcers with a platelet-derived growth factor gene-activated matrix (GAM501): results of a phase 1/2 trial. *Wound Repair and Regeneration* 17(6): 772-779.
123. Muller, M., Trocme, C., Lardy, B., Morel, F., Halimi, S. &Benhamou, P. Y. (2008). Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabetic Medicine* 25(4): 419-426.
124. Muz, B., de la Puente, P., Azab, F. &Azab, A. K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* 3: 83-92.
125. Namiki, A., Brogi, E., Kearney, M., Kim, E. A., Wu, T., Couffignal, T., Varticovski, L. &Isner, J. M. (1995). Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 270(52): 31189-31195.
126. Nauta, T. D., van den Broek, M., Gibbs, S., van der Pouw-Kraan, T. C., Oudejans, C. B., van Hinsbergh, V. W. &Koolwijk, P. (2017). Identification of HIF-2alpha-regulated genes that play a role in human microvascular endothelial sprouting during prolonged hypoxia in vitro. *Angiogenesis* 20(1): 39-54.
127. Nauta, T. D., van Hinsbergh, V. W. &Koolwijk, P. (2014). Hypoxic signaling during tissue repair and regenerative medicine. *Int J Mol Sci* 15(11): 19791-19815.
128. Neve, A., Cantatore, F. P., Maruotti, N., Corrado, A. &Ribatti, D. (2014). Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *Biomed Res Int* 2014: 756078.

129. Nissen, N. N., Polverini, P. J., Koch, A. E., Volin, M. V., Gamelli, R. L. & DiPietro, L. A. (1998). Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *American Journal of Pathology* 152(6): 1445-1452.
130. Nurden, A. T. (2011). Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis* 105 Suppl 1: S13-33.
131. Nwomeh, B. C., Liang, H. X., Cohen, I. K. & Yager, D. R. (1999). MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *Journal of Surgical Research* 81(2): 189-195.
132. Nwomeh, B. C., Liang, H. X., Diegelmann, R. F., Cohen, I. K. & Yager, D. R. (1998). Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. *Wound Repair and Regeneration* 6(2): 127-134.
133. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. & Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88(2): 277-285.
134. Olszewska-Pazdrak, B., Hein, T. W., Olszewska, P. & Carney, D. H. (2009). Chronic hypoxia attenuates VEGF signaling and angiogenic responses by downregulation of KDR in human endothelial cells. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 296(5): C1162-1170.
135. Ozturk, A., Kucukardali, Y., Tangi, F., Erikci, A., Uzun, G., Bashekim, C., Sen, H., Terekeci, H., Narin, Y., Ozyurt, M., Ozkan, S., Sayan, O., Rodop, O., Nalbant, S., Sildiroglu, O., Yalniz, F. F., Senkal, I. V., Sabuncu, H. & Oktenli, C. (2012). Therapeutical potential of autologous peripheral blood mononuclear cell transplantation in patients with type 2 diabetic critical limb ischemia. *Journal of Diabetes and Its Complications* 26(1): 29-33.
136. Pang, C., Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Jia, W. & Ye, J. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 295(2): E313-322.
137. Panutsopoulos, D., Zafiroopoulos, A., Krambovitis, E., Kochiadakis, G. E., Igoumenidis, N. E. & Spandidos, D. A. (2003). Peripheral monocytes from diabetic patients with coronary artery disease display increased bFGF and VEGF mRNA expression. *Journal of Translational Medicine* 1(1): 6.
138. Park, K. (2011). Engineered cell/matrix platform for hypoxia-induced angiogenesis. *Journal of Controlled Release* 153(3): 197.
139. Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L. & Montesano, R. (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189(2): 824-831.
140. Perez-Amodio, S., Tra, W. M., Rakhorst, H. A., Hovius, S. E. & van Neck, J. W. (2011). Hypoxia preconditioning of tissue-engineered mucosa enhances its angiogenic capacity in vitro. *Tissue Eng Part A* 17(11-12): 1583-1593.
141. Perng, C. K., Wang, Y. J., Tsi, C. H. & Ma, H. (2011). In vivo angiogenesis effect of porous collagen scaffold with hyaluronic acid oligosaccharides. *Journal of Surgical Research* 168(1): 9-15.
142. Phillips, G. D., Stone, A. M., Whitehead, R. A. & Knighton, D. R. (1994). Platelet derived wound healing factors (PDWHF) accelerate and augment wound healing angiogenesis in the rat. *In Vivo* 8(2): 167-171.

143. Pichiule, P. & LaManna, J. C. (2002). Angiopoietin-2 and rat brain capillary remodeling during adaptation and deadaptation to prolonged mild hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 93(3): 1131-1139.
144. Pourmoussa, A., Gardner, D. J., Johnson, M. B. & Wong, A. K. (2016). An update and review of cell-based wound dressings and their integration into clinical practice. *Ann Transl Med* 4(23): 457.
145. Qin, S. L., Li, T. S., Kubo, M., Ohshima, M., Furutani, A. & Hamano, K. (2008). Transient increase of cytokines in the acute ischemic tissue is beneficial to cell-based therapeutic angiogenesis. *Circulation Journal* 72(12): 2075-2080.
146. Rayment, E. A., Upton, Z. & Shooter, G. K. (2008). Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *British Journal of Dermatology* 158(5): 951-961.
147. Reher, P., Doan, N., Bradnock, B., Meghji, S. & Harris, M. (1999). Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine* 11(6): 416-423.
148. Reinke, J. M. & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research* 49(1): 35-43.
149. Resan, M., Vukosavljevic, M., Vojvodic, D., Pajic-Eggspuehler, B. & Pajic, B. (2016). The acute phase of inflammatory response involved in the wound-healing process after excimer laser treatment. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 10: 993-1000.
150. Rey, S., Lee, K., Wang, C. J., Gupta, K., Chen, S., McMillan, A., Bhise, N., Levchenko, A. & Semenza, G. L. (2009). Synergistic effect of HIF-1alpha gene therapy and HIF-1-activated bone marrow-derived angiogenic cells in a mouse model of limb ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(48): 20399-20404.
151. Ridgway, P. F., Ziprin, P., Peck, D. H. & Darzi, A. W. (2005). Hypoxia increases reepithelialization via an alpha v beta 6-dependent pathway. *Wound Repair and Regeneration* 13(2): 158-164.
152. Rimann, M. & Graf-Hausner, U. (2012). Synthetic 3D multicellular systems for drug development. *Current Opinion in Biotechnology* 23(5): 803-809.
153. Rodriguez, P. G., Felix, F. N., Woodley, D. T. & Shim, E. K. (2008). The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic Surgery* 34(9): 1159-1169.
154. Rosique, R. G., Rosique, M. J. & Farina Junior, J. A. (2015). Curbing Inflammation in Skin Wound Healing: A Review. *Int J Inflamm* 2015: 316235.
155. Rossi, A., Appelt-Menzel, A., Kurdyn, S., Walles, H. & Groeber, F. (2015). Generation of a three-dimensional full thickness skin equivalent and automated wounding. *J Vis Exp* (96).
156. Sahni, A. & Francis, C. W. (2000). Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood* 96(12): 3772-3778.
157. Sarkar, K., Fox-Talbot, K., Steenbergen, C., Bosch-Marce, M. & Semenza, G. L. (2009). Adenoviral transfer of HIF-1alpha enhances vascular responses to critical limb ischemia in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(44): 18769-18774.

158. Sawicka, K. M., Seeliger, M., Musaev, T., Macri, L. K. & Clark, R. A. (2015). Fibronectin Interaction and Enhancement of Growth Factors: Importance for Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4(8): 469-478.
159. Schreml, S., Meier, R. J., Kirschbaum, M., Kong, S. C., Gehmert, S., Felthaus, O., Kuchler, S., Sharpe, J. R., Woltje, K., Weiss, K. T., Albert, M., Seidl, U., Schroder, J., Morsczech, C., Prantl, L., Duschl, C., Pedersen, S. F., Gosau, M., Berneburg, M., Wolfbeis, O. S., Landthaler, M. & Babilas, P. (2014). Luminescent dual sensors reveal extracellular pH-gradients and hypoxia on chronic wounds that disrupt epidermal repair. *Theranostics* 4(7): 721-735.
160. Sen, C. K. (2009). Wound healing essentials: let there be oxygen. *Wound Repair and Regeneration* 17(1): 1-18.
161. Shin, M. R., Kang, S. K., Kim, Y. S., Lee, S. Y., Hong, S. C. & Kim, E. C. (2015). TNF-alpha and LPS activate angiogenesis via VEGF and SIRT1 signalling in human dental pulp cells. *International Endodontic Journal* 48(7): 705-716.
162. Shinzawa, H., Takeda, A., Sone, Y., Murashita, K. & Uchinuma, E. (2007). Wound healing process of a full-thickness skin wound model in rats. *International Surgery* 92(2): 63-72.
163. Silva, E. A. & Mooney, D. J. (2007). Spatiotemporal control of vascular endothelial growth factor delivery from injectable hydrogels enhances angiogenesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5(3): 590-598.
164. Simons, M. (2005). Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation* 111(12): 1556-1566.
165. Stevens, L. J. & Page-McCaw, A. (2012). A secreted MMP is required for reepithelialization during wound healing. *Molecular Biology of the Cell* 23(6): 1068-1079.
166. Stubbs, S. L., Hsiao, S. T., Peshavariya, H. M., Lim, S. Y., Dusting, G. J. & Dilley, R. J. (2012). Hypoxic preconditioning enhances survival of human adipose-derived stem cells and conditions endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dev* 21(11): 1887-1896.
167. Su, C. M., Wang, I. C., Liu, S. C., Sun, Y., Jin, L., Wang, S. W., Lee, H. P., Tseng, W. P. & Tang, C. H. (2017). Hypoxia induced mitogenic factor (HIMF) triggers angiogenesis by increasing interleukin-18 production in myoblasts. *Scientific Reports* 7(1): 7393.
168. Sun, J. L., Jiao, K., Niu, L. N., Jiao, Y., Song, Q., Shen, L. J., Tay, F. R. & Chen, J. H. (2017). Intrafibrillar silicified collagen scaffold modulates monocyte to promote cell homing, angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 113: 203-216.
169. Sutton, D. W., Chen, P. C. & Schmid-Schonbein, G. W. (1988). Cell separation in the buffy coat. *Biorheology* 25(4): 663-673.
170. Takeo, M., Lee, W. & Ito, M. (2015). Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(1): a023267.
171. Tatsumi, T., Ashihara, E., Yasui, T., Matsunaga, S., Kido, A., Sasada, Y., Nishikawa, S., Hadase, M., Koide, M., Nakamura, R., Irie, H., Ito, K., Matsui, A., Matsui, H., Katamura, M., Kusuoka, S., Matoba, S., Okayama, S., Horii, M., Uemura, S., Shimazaki, C., Tsuji, H., Saito, Y. & Matsubara, H. (2007). Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction. *Circulation Journal* 71(8): 1199-1207.

172. Teichert-Kuliszewska, K., Maisonpierre, P. C., Jones, N., Campbell, A. I., Master, Z., Bendeck, M. P., Alitalo, K., Dumont, D. J., Yancopoulos, G. D. & Stewart, D. J. (2001). Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovascular Research* 49(3): 659-670.
173. Tonnesen, M. G., Feng, X. & Clark, R. A. (2000). Angiogenesis in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings* 5(1): 40-46.
174. Topman, G., Shoham, N., Sharabani-Yosef, O., Lin, F. H. & Gefen, A. (2013). A new technique for studying directional cell migration in a hydrogel-based three-dimensional matrix for tissue engineering model systems. *Micron* 51: 9-12.
175. Trainotti, S. & Scheithauer, M. (2017). [Process, disturbances and improvements of wound healing]. *HNO*.
176. Tsai, C. C., Yew, T. L., Yang, D. C., Huang, W. H. & Hung, S. C. (2012). Benefits of hypoxic culture on bone marrow multipotent stromal cells. *American Journal of Blood Research* 2(3): 148-159.
177. Twardowski, T., Fertala, A., Orgel, J. P. & San Antonio, J. D. (2007). Type I collagen and collagen mimetics as angiogenesis promoting superpolymers. *Current Pharmaceutical Design* 13(35): 3608-3621.
178. Ud-Din, S., Volk, S. W. & Bayat, A. (2014). Regenerative healing, scar-free healing and scar formation across the species: current concepts and future perspectives. *Experimental Dermatology* 23(9): 615-619.
179. van Kilsdonk, J. W., van den Bogaard, E. H., Jansen, P. A., Bos, C., Bergers, M. & Schalkwijk, J. (2013). An in vitro wound healing model for evaluation of dermal substitutes. *Wound Repair and Regeneration* 21(6): 890-896.
180. van Weel, V., Seghers, L., de Vries, M. R., Kuiper, E. J., Schlingemann, R. O., Bajema, I. M., Lindeman, J. H., Delis-van Diemen, P. M., van Hinsbergh, V. W., van Bockel, J. H. & Quax, P. H. (2007). Expression of vascular endothelial growth factor, stromal cell-derived factor-1, and CXCR4 in human limb muscle with acute and chronic ischemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(6): 1426-1432.
181. Veidal, S. S., Karsdal, M. A., Vassiliadis, E., Nawrocki, A., Larsen, M. R., Nguyen, Q. H., Hagglund, P., Luo, Y., Zheng, Q., Vainer, B. & Leeming, D. J. (2011). MMP mediated degradation of type VI collagen is highly associated with liver fibrosis--identification and validation of a novel biochemical marker assay. *PloS One* 6(9): e24753.
182. Vranckx, J. J., Yao, F., Petrie, N., Augustinova, H., Hoeller, D., Visovatti, S., Slama, J. & Eriksson, E. (2005). In vivo gene delivery of Ad-VEGF121 to full-thickness wounds in aged pigs results in high levels of VEGF expression but not in accelerated healing. *Wound Repair and Regeneration* 13(1): 51-60.
183. Wagner, S., Coerper, S., Fricke, J., Hunt, T. K., Hussain, Z., Elmlinger, M. W., Mueller, J. E. & Becker, H. D. (2003). Comparison of inflammatory and systemic sources of growth factors in acute and chronic human wounds. *Wound Repair and Regeneration* 11(4): 253-260.
184. Wang, J. C., Xia, L., Song, X. B., Wang, C. E. & Wei, F. C. (2011). Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells improves survival of ultra-long random skin flap. *Chinese Medical Journal (Engl.)* 124(16): 2507-2511.

185. Weigel, P. H., Fuller, G. M. & LeBoeuf, R. D. (1986). A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *Journal of Theoretical Biology* 119(2): 219-234.
186. Wells, A., Nuschke, A. & Yates, C. C. (2015). Skin tissue repair: Matrix microenvironmental influences. *Matrix Biology*.
187. Wu, S., Singh, S., Varney, M. L., Kindle, S. & Singh, R. K. (2012). Modulation of CXCL-8 expression in human melanoma cells regulates tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. *Cancer Med* 1(3): 306-317.
188. Wysocki, A. B., Staiano-Coico, L. & Grinnell, F. (1993). Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *Journal of Investigative Dermatology* 101(1): 64-68.
189. Xiao, F., Wei, Y., Yang, L., Zhao, X., Tian, L., Ding, Z., Yuan, S., Lou, Y., Liu, F., Wen, Y., Li, J., Deng, H., Kang, B., Mao, Y., Lei, S., He, Q., Su, J., Lu, Y., Niu, T., Hou, J. & Huang, M. J. (2002). A gene therapy for cancer based on the angiogenesis inhibitor, vasostatin. *Gene Therapy* 9(18): 1207-1213.
190. Xu, X. R., Zhang, D., Oswald, B. E., Carrim, N., Wang, X., Hou, Y., Zhang, Q., Lavallo, C., McKeown, T., Marshall, A. H. & Ni, H. (2016). Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 53(6): 409-430.
191. Yamamoto, A., Takahashi, H., Kojima, Y., Tsuda, Y., Morio, Y., Muramatsu, M. & Fukuchi, Y. (2008). Downregulation of angiopoietin-1 and Tie2 in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Respiration* 75(3): 328-338.
192. Yamane, T., Nakagami, G., Yoshino, S., Muramatsu, A., Matsui, S., Oishi, Y., Kanazawa, T., Minematsu, T. & Sanada, H. (2013). Hydrocellular foam dressing promotes wound healing along with increases in hyaluronan synthase 3 and PPARalpha gene expression in epidermis. *PloS One* 8(8): e73988.
193. Yockman, J. W., Choi, D., Whitten, M. G., Chang, C. W., Kastenmeier, A., Erickson, H., Albanil, A., Lee, M., Kim, S. W. & Bull, D. A. (2009). Polymeric gene delivery of ischemia-inducible VEGF significantly attenuates infarct size and apoptosis following myocardial infarct. *Gene Therapy* 16(1): 127-135.
194. Yu, W. H., Yu, S., Meng, Q., Brew, K. & Woessner, J. F., Jr. (2000). TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* 275(40): 31226-31232.
195. Yuan, H. T., Li, X. Z., Pitera, J. E., Long, D. A. & Woolf, A. S. (2003). Peritubular capillary loss after mouse acute nephrotoxicity correlates with down-regulation of vascular endothelial growth factor-A and hypoxia-inducible factor-1 alpha. *American Journal of Pathology* 163(6): 2289-2301.
196. Zaritsky, A., Natan, S., Horev, J., Hecht, I., Wolf, L., Ben-Jacob, E. & Tsarfaty, I. (2011). Cell motility dynamics: a novel segmentation algorithm to quantify multi-cellular bright field microscopy images. *PloS One* 6(11): e27593.
197. Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C. & Xue, M. (2016). Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci* 17(12).
198. Zuloff-Shani, A., Kachel, E., Frenkel, O., Orenstein, A., Shinar, E. & Danon, D. (2004). Macrophage suspensions prepared from a blood unit for treatment of refractory human ulcers. *Transfusion and Apheresis Science* 30(2): 163-167.
199. Zusatz 1: AWMF S3 Leitlinie zur Behandlung chronischer Wunden 2012,

-
- Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung (DGFW).
200. Zusatz 2: Thomas A. Mustoe, M.D. Kristina O'Shaughnessy, M.D. Oliver
Kloeters, *Plast. Reconstr. Surg.* 117 (Suppl.): 35S, 2006