

Co-Kultivierung von adiposen Stromazellen in Kombination mit Biomaterialien zur verbesserten Geweberegeneration und Angiogenese

Philipp Neßbach

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hans-Günther Machens
2. Prof. Dr. Cordt Zollfrank

Die Dissertation wurde am 24.08.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.12.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
Zusammenfassung.....	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 Natürliche Gewebereparatur und -regeneration.....	5
1.2 Aufbau der Haut und deren Defekte.....	6
1.2.1 Wundheilung und ihre 4 Phasen	8
1.2.1.1 Hämostase.....	10
1.2.1.2 Entzündungsphase	11
1.2.1.3 Proliferationsphase	13
Reepithelisierung.....	14
Angiogenese	14
1.2.1.4 Umbau-/Reifephase	15
1.2.2 Hauptakteure in der Wundheilung	16
1.2.2.1 Zelltypen.....	16
Stamm-bzw. Stromazellen	16
Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen.....	18
1.2.2.2 Wachstumsfaktoren und Zytokine.....	22
1.2.2.3 Natürliche Extrazelluläre Matrix	27
1.2.3 Unzureichende Wundheilung (chronische Wunden).....	30

1.3	Förderung der Geweberegeneration und Wundheilung - Therapieansätze	32
1.3.1	Wundauflagen-freie Ansätze.....	34
1.3.1.1	Systemische Therapieansätze	34
1.3.1.2	Lokale Therapieansätze	34
1.3.1.3	Physikalische Therapieansätze.....	36
1.3.1.4	Hauttransplantationen bei großen oder thermischen Verletzungen.....	38
1.3.2	Therapieansätze mit Biomaterialien – zellfrei	39
1.3.2.1	Zweidimensionale (2D-) Wundauflagen	40
1.3.2.2	Zellfreie dreidimensionale (3D-) Gerüste	41
	Dezellularisierte Matrizen	41
	Poröse 3D-Gerüste	42
	Vliesstoffe.....	44
	Hydrogele	45
1.3.3	Therapieansätze mit Biomaterialien – zellbeladen.....	48
1.3.3.1	Additive Fertigungsverfahren zur Herstellung von 3D-Gerüsten	49
1.3.3.2	Biotinten für die Wundheilung	53
1.4	Zielsetzung.....	55
2.	Material und Methoden.....	57
2.1	Materialien	57
2.1.1	Chemikalien	57
2.1.2	Geräte und Zubehör	58
2.1.3	Sonstige Materialien	60
2.1.4	Medien, Puffer, Lösungen und Kits	60
2.1.5	Zelllinien	61
2.1.6	Software	61

2.2	Methoden.....	62
2.2.1	Allgemeine Zellkultur	62
2.2.2	2D-Proliferationstests	63
2.2.3	Herstellung von zellbeladenen 3D-Kollagengerüsten mittels <i>Computer-aided design</i> (CAD) und 3D-Druckverfahren.....	64
2.2.4	Herstellung von 3D-gedruckten Gerüsten aus Allograft Adipose Matrix und Pluronic	66
2.2.5	Fluoreszenzmikroskopie der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste	67
2.2.6	Rasterelektronenmikroskopie der zellbeladenen 3D Kollagengerüste	67
2.2.7	Probenvorbereitung für die Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	68
2.2.8	AFM Messungen der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste	69
2.2.9	Rasterkraftmikroskopische Datenanalyse.....	70
2.2.10	Angiogenese Array der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste.....	70
2.2.11	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) von TSP-1.....	71
2.2.12	HUVECs <i>Tube Formation Assay</i>	71
3.	Ergebnisse	73
3.1	2D Proliferationstest mit Resazurin Alamar Blue.....	73
3.2	Charakterisierung der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste	74
3.2.1	Fluoreszenzmikroskopie der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste	75
3.2.2	Rasterelektronenmikroskopie der zellbeladenen 3D Kollagengerüste	76
3.2.3	Rasterkraftmikroskopie der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste	77
3.3	Angiogenes Potenzial der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste.....	81
3.3.1	Angiogenese Array	81
3.3.2	<i>Tube Formation Assay</i>	83
3.4	3D-gedruckte Gerüste aus Allograft Adipose Matrix und Pluronic.....	86

Inhaltsverzeichnis

4. Diskussion	89
5. Literaturverzeichnis	97
6. Publikationsliste	118
7. Danksagung.....	VIII

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
3DP	3D-Druck
AAM	<i>allograft adipose matrix</i>
ab/am	antibiotisch/antimykotisch
Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskop
AFSC	<i>amniotic fluid-derived stem cell</i>
ANG	Angiogenin
ASC	Humane adipose Stromazelle
ATMSC	<i>adipose tissue-derived mesenchymal stem cell</i>
BMSC	<i>bone marrow derived stem cell</i>
ca.	circa
CAD	<i>computer-aided design</i>
CAGR	<i>compound annual growth rate</i>
CANTER	Centrum für Angewandtes Tissue Engineering und Regenerative Medizin
cm ²	Quadratzentimeter
CMC	Carboxymethylcellulose
COVID-19	Coronavirus-Erkrankung
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DOPsL	dynamische optische Projektions- Stereolithographie
ECGM 2	<i>Endothelial Cell Growth Medium 2</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Em	<i>emission</i>
E-Modul	Elastizitätsmodul
EPC	<i>endothelial progenitor cell</i>
ESC	<i>embryonic stem cell</i>
Exc	<i>extinction</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDM	<i>fused deposition modeling</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunden
HFMSC	<i>hair follicle-derived mesenchymal stem cell</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HUVEC	humane Nabelschnur-Endothelzelle
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon-gamma
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL-1	Interleukin-1
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
kV	Kilovolt
LOXL-2	<i>lysyl oxidase homolog 2</i>
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minuten
ml	Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ³	Kubikmillimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Mrd.	Milliarden
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i>
NAC	N-Acetylcystein
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
p.a.	pro analysis
PBS	phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PLA	Polymilchsäure
REM	Rasterelektronenmikroskop
rfu	<i>relative fluorescence units</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SERPIN	Serin-Proteinase-Inhibitoren
Serpin E1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
Serpin F1	<i>pigment epithelium-derived factor precursor</i>
SLA	Stereolithographie
SLS	Selektives Lasersintern
Tab.	Tabelle
TCP	<i>treated cell culture plate</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMP-1	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 1

Abkürzungsverzeichnis

TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TSP-1	Thrombospondin-1
U/min	Umdrehungen/Minute
uPa	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
USD	US Dollar
v/v	<i>volume per volume</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
w/w	<i>weight per weight</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Aufbau der normalen Haut (a) im Vergleich zu einer verletzten Haut (b)	7
Abb. 2: Der normale Wundheilungsprozess	10
Abb. 3: Die Rolle von Kollagen während der Umbauphase der Wundheilung	19
Abb. 4: Verschiedene Therapieansätze für die Behandlung von Wunden	33
Abb. 5: Alternative Herstellungsverfahren von 3D-Gerüsten aus Biomaterialien mit Zellen..	48
Abb. 6: Die wichtigsten Vor- und Nachteile der 3D-Bioprinting Technologie	51
Abb. 7: Umsetzung von Resazurin zu Resorufin.....	63
Abb. 8: Design der 3D-Kollagengerüste	64
Abb. 9: Resazurin-Natriumsalz-Assay von 2D-Zellkulturen.....	73
Abb. 10: Design von 3D-Kollagengerüsten.....	74
Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellen in den Kollagengerüsten.....	75
Abb. 12: REM-Aufnahmen von Kollagengerüsten.....	76
Abb. 13: AFM-Messung der Co-Kultur von HUVECs und ASCs in Kollagengerüsten.....	78
Abb. 14: D-Band-Struktur von Kollagengerüsten mit HUVECs und ASCs.....	79
Abb. 15: AFM-Messung von HUVECs in Kollagengerüsten	80
Abb. 16. AFM-Messungen ausgerichteter Kollagenregionen der Kollagengerüste mit HUVECs	81
Abb. 17: Analyse von definierten Wachstumsfaktoren in den Zellkulturmedien im zeitlichen Verlauf	82
Abb. 18: Lichtmikroskopische Hellfeld-Aufnahmen der HUVECs in Kombination mit dem zuvor gewonnenen Zellkulturüberständen.....	84
Abb. 19: Quantitative Analyse des <i>Tube Formation Assays</i>	86
Abb. 20: Design von 3D-gedruckten Gerüsten aus Allograft Adipose Matrix (AAM) und Pluronic	87

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Die wichtigsten Wachstumsfaktoren der Wundheilung	23
Tab. 2: Auswahl an kommerziell erhältlichen Hydrogelen	46
Tab. 3: Chemikalien	57
Tab. 4: Geräte und Zubehör	58
Tab. 5: Sonstige Materialien.....	60
Tab. 6: Medien, Puffer, Lösungen und Kits	60
Tab. 7: Zelllinien	61
Tab. 8: Software	61

Zusammenfassung

Der natürliche Wundheilungsprozess gliedert sich in die vier Phasen Hämostase, Entzündung, Proliferation und Reifung auf. Während des Heilungsprozesses spielen die Wechselwirkungen und Reaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen sowie Komponenten der extrazellulären Matrix eine Schlüsselrolle. Das Zusammenspiel dieser Wechselwirkungen ist bei chronische Wunden gestört. Sie können vor allem durch Vorerkrankungen wie Diabetes oder Herz-Kreislaufferkrankungen auftreten. Es gibt mittlerweile eine große Anzahl an Therapieansätzen und das moderne Wundmanagement hat sich weit von traditionellen Wundaufgaben entfernt. Dabei haben sich vor allem 3D-Gerüste aus Biomaterialien bewährt, die die natürliche extrazelluläre Matrix nachahmen und die Zellmigration und -proliferation fördern. Kollagen Typ I ist der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und trägt entscheidend zur Angiogenese und Reepithelisierung während des Wundheilungsprozesses bei. Allerdings kann Kollagen aufgrund der verminderten mechanischen Eigenschaften schwer direkt im Bioprinting Verfahren eingesetzt werden, so dass in dieser Arbeit zunächst eine mittels CAD designte Halterung aus PLA und eine Gießform aus Pluronic gedruckt wurde. Es konnte demonstriert werden, dass die 3D-Kollagengerüste stabil sind und leicht upgescaled werden können. Durch die Flexibilität des Druckverfahrens lässt sich das Gerüst individuell an die Wunde des Patienten anpassen. Das Kollagen wurde zuvor mit adipösen Stromazellen und humanen Nabelvenen-Endothelzellen beladen, um eine Wundaufgabe mit hohem angiogenen Potenzial zu entwickeln- einer Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Wundheilung. In den 3D-Kollagengerüsten zeigten die HUVECs in Co-Kultur mit den ASCs eine proliferative Aktivität. Durch das schwebende Kollagengerüst in der Halterung ist eine optimale Nährstoff- und Sauerstoffversorgung gewährleistet. Die Zellen übten eine Zugkraft aus und das Kollagennetzwerk konnte umorganisiert werden. Sowohl rasterelektronenmikroskopische als auch rasterkraftmikroskopische Aufnahmen zeigten große Bereiche, in denen die Kollagenfasern nach der Co-Kultivierung parallel zueinander ausgerichtet waren. Das angiogene Potenzial der zellbeladenen Kollagengerüste konnte durch die Hochregulation der Wachstumsfaktoren Serpin E1 und TIMP-1 gezeigt werden. Beide Wachstumsfaktoren spielen eine wesentliche Rolle beim Matrixumbau, der Zellmigration und -proliferation und führen bei fehlerhaften

Regulation zu einer abnormalen Wundheilung. Zudem wurde das angiogene Potenzial der 3D-Gerüste mit der Co-Kultur mittels *Tube Formation Assay* demonstriert. Als Reaktion auf die angiogenen Wachstumsfaktoren sind die HUVECs in der Lage kapillarartige Röhrchen zu bilden, wenn sie zuvor mit dem gewonnenen Überstand aus den Kollagengerüsten mit der Co-Kultur inkubiert wurden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die 3D-Kollagengerüste beladen mit HUVECs und ASCs in Co-Kultur vielversprechend für eine verbesserte Geweberegeneration und für die Behandlung von Wunden sind. Ein weiterer Ansatz für das Wundmanagement kann die Herstellung von 3D-Gerüsten durch *Bioprinting* unter Verwendung von AAM in Kombination mit Pluronic sein. Durch die Mischung können stabile 3D-Gerüste aus einer dezellularisierten Matrix hergestellt werden, die ebenfalls ein hohes Potenzial für eine verbesserte Wundheilung bieten können.

Summary

The natural wound healing process is divided into four phases: haemostasis, inflammation, proliferation and maturation. During the healing process, the interactions and reactions between different cell types, growth factors, cytokines and components of the extracellular matrix play a key role. Chronic wounds can mainly occur as a result of certain pre-existing conditions such as diabetes or cardiovascular diseases. There are now a large number of therapeutic approaches and modern wound management has moved far away from traditional wound dressings. 3D scaffolds made of biomaterials that mimic the natural extracellular matrix and promote cell migration and proliferation have proven particularly useful. Collagen type I is the main component of the extracellular matrix and is a key contributor to angiogenesis and re-epithelialization during the wound healing process. However, collagen is difficult to use directly in the bioprinting process due to its limited mechanical properties. Therefore, in this work a CAD-designed PLA holder and a Pluronic mold were printed initially. Casted into the pluronic mold, it could be demonstrated that the 3D collagen scaffolds are stable and can be easily scaled up. Due to the flexibility of the printing process, the scaffold can be individually adapted to the patient's wound. The collagen was previously loaded with adipose stromal cells and human umbilical vein endothelial cells to develop a wound dressing with high angiogenic potential. Angiogenesis or neovascularization is the basic requirement for successful wound healing. In the 3D collagen scaffolds, the HUVECs showed proliferative activity in co-culture with the ASCs. The floating collagen scaffold in the holder ensures an optimal supply of nutrients and oxygen. The cells exerted a tensile force and the collagen network could be reorganized. Both scanning electron microscopy and atomic force microscopy revealed large areas where the collagen fibers were aligned parallel to each other after co-cultivation. The angiogenic potential of the cell-loaded collagen scaffolds could be demonstrated by the upregulation of the growth factors serpin E1 and TIMP-1. Both growth factors play an essential role in matrix remodeling, cell migration and proliferation during wound healing. Dysregulation is a critical cause for abnormal wound healing. In addition, the angiogenic potential of the 3D scaffolds with the co-culture was demonstrated using a tube formation assay. In response to the angiogenic growth factors, the HUVECs are able to form capillary-like tubes when previously incubated with the supernatant

obtained from the co-culture-laden collagen scaffolds. Overall, the results show that the 3D collagen scaffolds loaded with HUVECs and ASCs in co-culture are promising for enhanced tissue regeneration and wound management. Another approach to wound management can be the production of 3D scaffolds by bioprinting using AAM in combination with Pluronic. The mixture can be used to produce stable 3D scaffolds from a decellularized matrix, which can also offer great potential for improved wound healing.

1. Einleitung

1.1 Natürliche Gewebereparatur und -regeneration

Der Begriff „Reparatur“, wenn er im Zusammenhang mit der Heilung von geschädigtem Gewebe verwendet wird, ist definiert als die Wiederherstellung der Gewebearchitektur und -funktion nach einer Verletzung.¹ Es umfasst zwei getrennte Prozesse: Regeneration und Erneuerung. Regeneration bezieht sich auf eine Art der Heilung, bei der durch neues Wachstum beschädigte Gewebeteile vollständig in ihren normalen Zustand zurückversetzt werden. Der Ersatz bzw. die Erneuerung umfasst eine Art der Heilung, bei der stark beschädigtes oder nicht regenerierbares Gewebe durch die Ablagerung von Bindegewebe repariert wird. Ein Prozess, der allgemein als Narbenbildung bezeichnet wird.¹ Während einige Arten von Gewebeerletzungen (z. B. kleinere Papierschnitte) manchmal so geheilt werden können, dass keine bleibenden Schäden zurückbleiben, besteht der größte Teil unserer Gewebereparatur sowohl aus Regeneration als auch aus Erneuerung. Die Gewebereparatur kann einige der ursprünglichen Strukturen des beschädigten Gewebes (z. B. Epithelschichten) wiederherstellen, sie kann aber auch zu strukturellen Anomalien führen, welche die Organfunktion beeinträchtigen (z. B. die Narbe, die bei der Heilung eines Myokardinfarkts entsteht).²

Ob die Heilung einer Wunde über den Regenerations- oder den Ersatzweg (oder beide) abläuft, hängt vor allem von der Art des Gewebes ab, in dem sie auftritt. Bestimmte Gewebe des Körpers sind zur Zellproliferation (und damit zur Regeneration) fähiger als andere. In diesem Zusammenhang gibt es drei Arten von Geweben: sich kontinuierlich teilende Gewebe, ruhende Gewebe und sich nicht teilende Gewebe. Ein sich kontinuierlich teilendes Gewebe (auch als labiles Gewebe bekannt) besteht aus Zellen, die ständig proliferieren, um tote oder abgestoßene Zellen zu ersetzen.³ Beispiele für solche Gewebe schließen Epithelien (wie Haut, gastrointestinales Epithel und Speicheldrüsengewebe) und hämatopoetische Gewebe ein. Diese Gewebe enthalten Pools von Stammzellen, die eine enorme proliferative und selbsterneuernde Fähigkeit haben und zum Teil mehr als einen Zelltyp hervorbringen.

Einige Gewebe, die als ruhende Gewebe (oder stabile Gewebe) bezeichnet werden, bestehen aus Zellen, die normalerweise in einem sich nicht teilenden Zustand existieren, aber als Reaktion auf bestimmte Reize, wie z. B. eine Zellverletzung, in den Zellzyklus eintreten können.

Gewebe, die in diese Kategorie fallen, schließen parenchymale Zellen der Leber, Niere und Bauchspeicheldrüse, mesenchymale Zellen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Lymphozyten ein. Einige Gewebearten bestehen aus Zellen, die den Zellzyklus dauerhaft verlassen haben und sich daher nicht vermehren können. Zu diesen sich nicht teilenden Geweben (oder permanenten Geweben) gehören Herz- und Skelettmuskeln. Die Gewebereparatur in diesen Geweben hinterlässt immer dauerhafte Anzeichen einer Verletzung, wie z. B. eine Narbe.²

Die natürliche Gewebereparatur ist eine dynamische restaurative Zellproliferation und Geweberegenerationsreaktion, die stimuliert wird, um akute Toxizität zu überwinden und Organ-/Gewebestruktur und -funktion wiederherzustellen.⁴ Der Prozess der Reparatur beinhaltet eine komplexe Wechselwirkung zwischen Zellen, extrazellulärer Matrix, Blutgefäßen und Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine.

1.2 Aufbau der Haut und deren Defekte

1953 beschrieb Cornels die menschliche Haut als "monumentale Fassade des menschlichen Körpers". Obwohl sie etwas poetisch ist, fängt die Definition die meisten ihrer wesentlichen Aspekte ein.⁵ Die Haut stellt eine lebensnotwendige Barriere zwischen dem Körper und der Umgebung dar. Sie schützt vor physischen Schäden, Krankheitserregern und Flüssigkeitsverlust und hat eine immun-neuroendokrine Funktion, die zur Aufrechterhaltung der Körperhomöostase beiträgt.^{6,7} Um ihre spezifischen Funktionen ausüben zu können, muss die Haut entscheidende Eigenschaften aufweisen, die für fast jedes Gewebe gelten. Sie braucht eine mechanische Stabilität, welche größtenteils durch die extrazelluläre Matrix (EZM) zustande kommt, die hauptsächlich von Fibroblasten ausgeschieden wird. Außerdem benötigt die Haut eine Blutzufuhr zur Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff und zum Abtransport von Stoffwechselprodukten und Kohlendioxid. Dafür wird ein Netzwerk von Blutgefäßen benötigt, die mit Endothelzellen ausgekleidet sind. Über diese Gefäße können auch Zellen des Immunsystems, Monozyten, Makrophagen und dendritische Epidermiszellen transportiert werden und vor Ort gegen Infektionen oder Verletzungen helfen. Die Immunzellen phagozytieren eindringende Pathogene und sorgen für die Aktivierung von Lymphozyten, welche die differenzierten Reaktionen der spezifischen Immunabwehr ausführen.⁸ Die Haut ist aus drei Schichten aufgebaut. Außen liegt das Epithel, die Epidermis

oder Oberhaut, und darunter befindet sich eine Lage von Bindegewebe, das zum einen die kollagenreiche Dermis oder Lederhaut und zum anderen die darunter liegende fetthaltige Hypodermis oder Unterhaut umfasst (Abb. 1).⁵

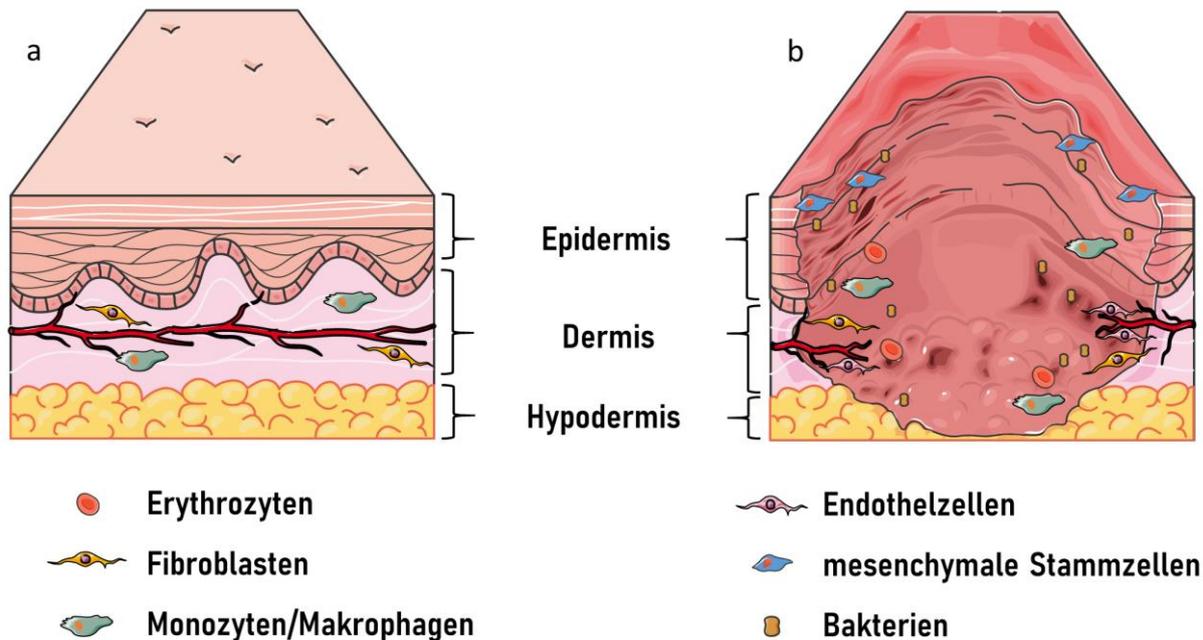


Abb. 1: Der Aufbau der normalen Haut (a) im Vergleich zu einer verletzten Haut (b) mit den Hauptakteuren (verschiedene Zelltypen) im Wundheilungsprozess.

Die Epidermis ist die definierende Komponente der Haut, auch wenn es nicht die größte Masse bildet. Die Epidermis ist häufiger und unmittelbar den äußeren Bedingungen ausgesetzt als alle anderen Gewebe im Körper, deshalb stellt ihre wichtigste Funktion die Bildung einer wasserfesten Barriere dar. Die Epidermis enthält Keratinozyten, Melanozyten, dendritische Zellen, Langerhans-Zellen und andere Immunzellen sowie sensorische Axone und die epidermal-dermale Basalmembran.^{9, 10} Das Epithel- und das Bindegewebe stellen zwei Extreme der Gewebeorganisation dar. Im Epithelgewebe ist die extrazelluläre Matrix (EZM) schwach ausgebildet. Die Zellen sind durch Zell-Zell-Interaktionen miteinander verbunden, die hauptsächlich die mechanischen Beanspruchungen auffangen. Das Bindegewebe hingegen besitzt eine große Menge an EZM und nur wenige Zellen. In der Dermis befinden sich die Hautanhangsgebilde, z.B. Haare und Drüsen, Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen, antigenpräsentierende Hautzellen sowie Immunzellen.¹¹ Die Matrix besteht vor allem aus faserförmigen Polymeren, hauptsächlich aus Kollagen, und dieses Netzwerk verleiht die mechanische Stärke, die von dem Gewebe verlangt wird. Zudem werden dadurch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen reguliert.¹²

Verletzungen der Hautintegrität, die mit der Zeit komplikationslos heilen, werden als akute Wunden bezeichnet.¹² Dabei gelten im Allgemeinen Abschürfungen, chirurgische und traumatische Wunden oder oberflächliche Verbrennungen als akute Wunden.¹³ Jedes Mal, wenn die Integrität der Hautbarriere beeinträchtigt wird, entsteht eine Wunde (Abb. 1 b). Bei gesunden Menschen ist die Wundheilung ein hochpräziser und gut koordinierter Prozess. Dennoch kämpfen rund 40 Millionen Patienten weltweit mit chronischen Wunden, was enorme Auswirkungen auf das Gesundheitssystem und letztlich auf die Wirtschaft hat.^{7, 14-16} Wunden, die den normalen Heilungsprozess nicht durchlaufen haben und sich entweder innerhalb von 30 Tagen nicht signifikant gebessert haben oder innerhalb von 60 Tagen nicht vollständig verheilt sind, werden als chronische Wunden klassifiziert.¹⁷ Die meisten chronisch nicht heilenden Wunden sind mit Stoffwechselstörungen (z.B. Diabetes), chronischen Nierenerkrankungen, vaskulären Defiziten (z.B. venöse oder arterielle Insuffizienz) sowie arterieller Hypertonie (Bluthochdruck) assoziiert.¹⁸⁻²¹ Nach dem neuesten Bericht des „Global Wound Care Market“ von 2021 wurde der weltweite Wundversorgungsmarkt im Jahr 2021 auf 17,49 Mrd. USD geschätzt. Der Markt soll von 18,51 Mrd. USD im Jahr 2022 auf 28,13 Mrd. USD im Jahr 2029 ansteigen und über den geschätzten Zeitraum eine durchschnittliche jährliche Wachstumsrate (CAGR) von 6,2% aufweisen. Diese Wachstumsrate wird aufgrund der alternden Bevölkerung, der Zunahme von Diabetes und Adipositas weltweit und des anhaltenden Infektionsproblems erwartet.²² Dementsprechend stellen vor allem chronische Wunden weiterhin eine erhebliche klinische, soziale und wirtschaftliche Herausforderung dar.

1.2.1 Wundheilung und ihre 4 Phasen

Ausgangspunkt jeder Wundheilung ist eine Störung des Blutflusses durch Kapillarverletzungen. Wunden sollten dabei nach einem patientenspezifischen Ansatz behandelt werden, jeweils angepasst an die jeweilige Heilungsphase und den Wundzustand. Unter anderen haben die Feuchtigkeit in der Wunde, die Sauerstoffversorgung, die Infektion, sowie das Alter, der Ernährungszustand, der Body-Mass-Index und Medikamente einen entscheidenden Einfluss auf den Heilungsprozess.^{3, 23, 24} Nach dem Heilungsprozess sollte die verletzte Stelle des Bindegewebes wieder repariert und reepithelisiert und in die normale anatomische Struktur zurückgekehrt sein sowie die funktionelle Integrität zurückerlangt haben.³

Der Wundheilungsprozess der Haut erfolgt normalerweise in einer Kaskade von koordinierten und systemischen Ereignissen mit einer Vielzahl von zellulären Aktivitäten und ist gekennzeichnet durch eine Reihe von vier aufeinanderfolgenden und zeitgleich ablaufenden Phasen: Hämostase, Entzündung, Proliferation, Umbau/Reifung (Abb. 2).^{15, 25-27} Der Übergang zwischen diesen Stadien hängt in der Regel von dem Wachstum und der Differenzierung der am Wundheilungsprozess beteiligten Zelltypen ab, wie den Makrophagen, Mastzellen, Fibroblasten und Keratinozyten und der Aktivierung der Endothelzellen.²⁸⁻³¹ Die biochemischen Reaktionen beinhalten eine lokale Synchronisation von einer Vielzahl an Zelltypen, Wachstumsfaktoren und Mediatoren.³²

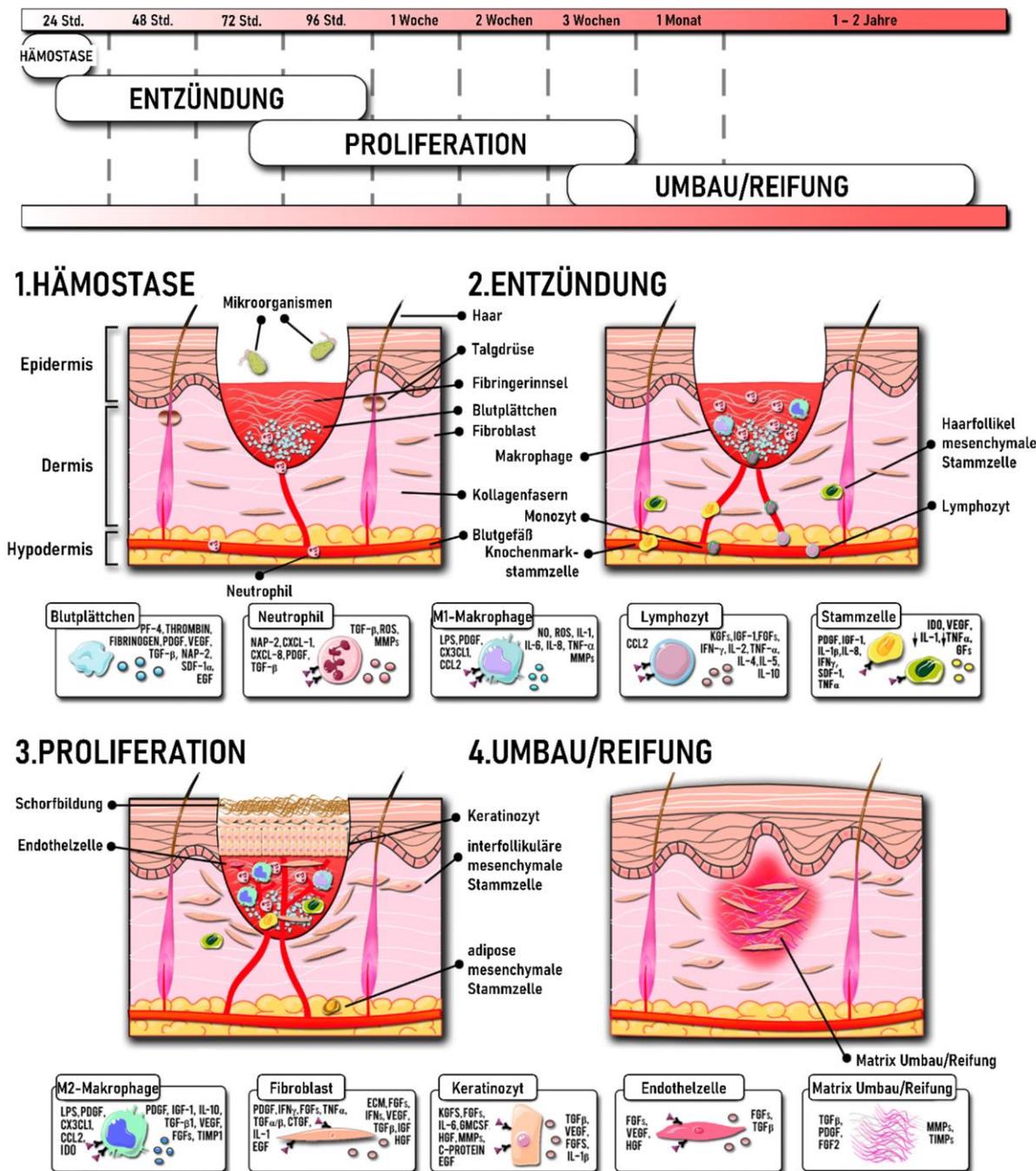


Abb. 2: Der normale Wundheilungsprozess bestehend aus Hämostase, Entzündung, Proliferation und Reifung/Umbau. Links von den Zellen sind die Zytokine, Wachstumsfaktoren usw. genannt, die die Zellen stimulieren und rechts die Faktoren, die von den Zellen abgesondert werden. Modifiziert nach Las Heras et al., Journal of Controlled Release 328 (2020) 532-550 mit freundlicher Genehmigung des Verlages Elsevier B.V..

1.2.1.1 Hämostase

Hämostase startet mit dem Beginn der Verletzung und sorgt dafür, die Blutung zu stoppen und die Barrierefunktion der Haut wiederherzustellen. In diesem Stadium wird durch die

Exposition von Kollagen die intrinsische und extrinsische Gerinnungskaskade aktiviert.³³ Am Anfang der Hämostase wird ein Wasserstoffperoxidgradient ausgelöst, der essentiell für die Rekrutierung der Immunzellen ist.²⁶ Begleitet wird dies von einem Vasokonstriktionsprozess (Verengung der Blutgefäße), eine Aggregation der Thrombozyten und schließlich einer Bildung eines Blutgerinnsels, ausgelöst durch die Freisetzung von Thromboxan A₂ und Prostaglandin 2- α in das Wundbett.^{3, 23, 24} Das Blutgerinnsel bedeckt die Wunde, verringert den Blutverlust und dient als gerüstähnliche Struktur, die die Migration von Immunzellen und Hautzellen fördert.³⁴ Zusätzlich setzen die Blutplättchen im Blut des Blutgerinnsels eine Vielzahl von Blutplättchen-spezifischen Proteinen wie den Blutplättchenfaktor 4 (PF-4), Thrombin, Fibronektin und Fibrinogen sowie Adhäsionsmoleküle frei. Es kommt unter anderem zur Freisetzung von pro- und antiangiogenen Faktoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) bzw. Endostatin, dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), dem transformierten Wachstumsfaktor TGF- β sowie Zytokinen/Chemokinen.^{32, 35-38} Die sezernierten Moleküle induzieren die Migration und Aktivierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und aus dem Knochenmarkstammenden Stammzellen (*bone marrow derived stem cells* (BMSCs)) in das Wundbett.^{39, 40} Zudem sorgen sie dafür, die Blutung zu kontrollieren und das Ausmaß der Verletzung zu begrenzen. Die Thrombozytendegranulation aktiviert die Komplementkaskade, insbesondere C5, ein starkes chemotaktisches Protein der Neutrophilen.⁴¹ Vasoaktive Mediatoren und Chemokine werden durch die aktivierte Gerinnungskaskade, Komplementwege und Parenchymzellen freigesetzt, die eine Schlüsselrolle bei der Rekrutierung von entzündlichen Leukozyten zu verletzter Haut spielen.^{3, 23, 42, 43} Zudem wird während der Gerinnselbildung ein Fibrinnetz gebildet, das ein Verkleben aneinander liegender Wundränder ermöglicht.

1.2.1.2 Entzündungsphase

Nachdem die Hämostase erfolgt ist, beginnt die Entzündungsphase innerhalb weniger Stunden nach der Verletzung und wird durch Nebenprodukte der Bakterien, abgesonderter Zytokine/Chemokine und von den Blutplättchen geförderten Mediatoren angetrieben. Nach einer Erhöhung der Durchblutung und veränderten Gefäßpermeabilität, migrieren zunächst Neutrophile und später Monozyten bzw. Makrophagen in die Wunde, töten Bakterien ab,

dekontaminieren die Wunden von Fremdstoffen und entfernen geschädigte Matrixproteine.⁴⁴⁻⁴⁶ Die Abfallstoffe werden später mit dem Schorf extrudiert oder von Makrophagen phagozytiert. Neutrophile rekrutieren Thrombozyten und setzen zudem Proteasen beispielsweise Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), antimikrobielle Peptide, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Wachstumsfaktoren wie TGF- β frei.^{47, 48} Anschließend treffen Monozyten innerhalb der ersten 24 Stunden nach Verletzung ein und wandeln sich überwiegend zu M1-Makrophagen (entzündungsfördernd) um, mit dem Ziel, den Entzündungsprozess zu verstärken. Dies passiert, indem Stickoxid, ROS, weitere Faktoren wie beispielsweise Interleukin 1 (IL-1), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und MMPs freigesetzt werden.⁴⁹ Lymphozyten sind die in der Kaskade letzten Entzündungszellen, die von der Wunde angezogen werden. T-Zellen produzieren Mediatoren wie Insulinwachstumsfaktor 1 (IGF-1), Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs) und Keratinozyten-Wachstumsfaktoren (KGFs), die an dem Zellüberleben und der Proliferation der Immunzellen (Fibroblasten und Keratinozyten) beteiligt sind.¹⁵ Zudem spielen α - β - und T-Zellen (CD4⁺, CD8⁺ und T_{reg}), die ebenfalls im Entzündungsherd vorkommen, eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der pathogenen Mikroorganismen.^{16, 32, 50}

Im späteren Stadium der Entzündungsphase entstehen M2-Makrophagen (entzündungshemmend/wundheilungsfördernd) aus Monozyten gebildet oder aus M1-Makrophagen differenziert, die Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGFs, TGF- β 1 und IL-10 absondern und Zellmigration, -proliferation und Matrixbildung induzieren.^{51, 52} Zudem produzieren die M2-Makrophagen TIMP-1 (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*), einen spezifischen Gewebeinhibitor, um den MMPs entgegenzuwirken und damit den Abbau der EZM zu hemmen.^{53, 54} Für den Aufbau der EZM ist das Zusammenspiel zwischen den MMPs und den TIMPs entscheidend. Während die MMPs die Degradation der Matrix bewirken, führt TIMP-1 zum Aufbau der EZM. TIMP-1 nimmt zudem Einfluss auf das biologische Verhalten der Zellen. Der Inhibitor induziert Veränderungen in der Zellmorphologie und stimuliert Zellwachstum verschiedener Zelltypen.⁵⁵ Die Umstellung auf das M2-Profil führt zur Freisetzung von verschiedenen Mediatoren, die Angiogenese und Gewebegranulation ermöglichen, wodurch der Übergang zur Proliferationsphase und Geweberegeneration unterstützt wird (Abb. 2).

In der gegenwärtigen Phase werden BMSCs zu den Gebieten der Gewebeverletzung angezogen, um die Entzündungsphase zu regulieren und den Weg zur Proliferationsphase zu ebnen. BMSCs zeigen eine Chemotaxis, die durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, einschließlich *platelet-derived growth factor* (PDGF), IGF-1, IL-1 β , IL-8, Interferon-gamma (IFN- γ), *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) und TNF- α , während der Entzündungsphase ausgelöst wird.⁵⁶ Vom Haarfollikel-abgeleitete mesenchymale Stammzellen (HFMSCs) werden ebenfalls innerhalb der ersten drei Tage von der Wunde angezogen.⁵⁷ Sobald die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) an der Wunde angekommen sind, zeigen sie immunsuppressive Wirkungen, die zur Sekretion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), Herunterregulierung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und einer Verringerung der Anzahl von Entzündungszellen führt.^{58, 59} Außerdem verändern die MSCs die Antwort der T-Zellen sowie die Proliferation und Migration von B-Zellen. Zudem beeinflussen MSCs das Verhalten von Monozyten, Granulozyten und dendritische Zellen, sowie Makrophagen, die den Phänotyp von M1 zu M2 wechseln.⁵⁶ Schließlich sind die MSCs in der Lage, extrazelluläre Matrix zu produzieren und umzugestalten, die Angiogenese zu fördern und sich in verschiedene Zelltypen (Keratinozyten, Endothelzellen, Fibroblasten usw.) zu differenzieren.⁶⁰ Eine geordnete und kontrollierte Entzündungsphase ist essentiell für den normalen Wundheilungsprozess.^{61, 62}

1.2.1.3 Proliferationsphase

Die Proliferationsphase beginnt mit der Auflösung der Entzündung und dem progressiven Phänotypübergang von Monozyten und Makrophagen zu den entzündungshemmenden M2-Makrophagen (Abb. 2). Dies erfolgt hauptsächlich dank der immunmodulatorischen Mediatoren, die von den MSCs sezerniert wurden. Hierbei wird der Schwerpunkt auf die Bildung von Granulationsgewebe gelegt, das wiederum zum einen bei der Wiederherstellung des Gefäßnetzwerkes und zum anderen zur Abdeckung der freigelegten Wunde hilft.⁶³ In diesem Stadium produzieren Fibroblasten, reguliert durch Zytokine und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise FGFs, TNF- α , TGF- α/β , den Gewebewachstumsfaktor (CTGF) und IL-1, große Mengen an EZM, um Gewebelücken zu schließen und gleichzeitig mehr Zytokine freizusetzen (z.B. FGFs, TGF- β , VEGF).^{26, 36, 63-70}

Reepithelisierung

Die Reepithelisierung beginnt 16-24 Stunden nach der Verletzung und dauert bis zur Umbauphase der Wundheilung an.^{10, 71} Der Reepithelisierungsprozess erfordert die Migration und Proliferation von Keratinozyten, die durch Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen, verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie Enzyme wie MMPs oder aktiviertes Protein C stimuliert werden.^{10, 46, 72} Dabei spielt die extrazelluläre Matrix eine Schlüsselrolle im Prozess der Reepithelisierung.^{73, 74} Keratinozyten differenzieren sich früh nach der Verletzung und wandern zwischen dem Fibrinnetz und dem reichlich vorhandenen Kollagen in der Dermis hin und her, während suprabasale Keratinozyten am Wundbett proliferieren, um mehr Zellen bereitzustellen und schlussendlich die Wunde zu schließen. Die Keratinozyten selbst setzen als Reaktion hauptsächlich Wachstumsfaktoren wie TGF- β , VEGF, FGFs und IL-1 β frei. Sie migrieren und proliferieren, um die Wunde abzudecken, worauf ein schichtweiser Aufbau der hautepidermalen Barriere erfolgt.²⁶

Angiogenese

Angiogenese ist der streng regulierte Prozess, durch den neue Blutgefäße aus dem bestehenden Gefäßsystem gebildet werden.⁷¹ Dieser Prozess ist physiologisch essentiell für die Wundheilung und Geweberegeneration. Angiogenese tritt als Reaktion auf eine Vielzahl von zuvor erfolgten molekularen Prozessen auf. Im Allgemeinen umfasst der angiogene Prozess die Proliferation von Endothelzellen, die Migration von chemotaktischen Endothelzellen durch die extrazelluläre Matrix und die Bildung von Kapillarröhrchen. Während der Proliferationsphase der Wundheilung erreicht der Neovaskularisationsprozess sowohl durch die Vasculogenese, die Neubildung von Blutgefäßen durch aus dem Mesoderm stammenden Endothel-Vorläuferzellen (EPC), als auch die Angiogenese, die Proliferation und Migration von Endothelzellen aus bereits bestehenden Gefäßen, seinen Höhepunkt.⁷⁵ Per Definition ist die Chemotaxis die Fähigkeit von Zellen, sich entlang eines chemischen Gradienten zu bewegen.^{76, 77} Dieser biochemische Mechanismus ermöglicht es den Zellen, richtig auf die Umweltreize zu reagieren, die die Proliferation, Differenzierung und Migration bestimmen. Die Migration als Folge der chemotaktischen Aktivität ist eine notwendige Bedingung für die Angiogenese. Als komplexer Prozess, der koordinierte Veränderungen in der Organisation des Zytoskeletts, der Signalübertragung und der Zelladhäsion beinhaltet, ist

er abhängig vom aktinreichen Netzwerk unter der Plasmamembran und wird durch physikalische und chemische Faktoren im Gefäßsystem reguliert.⁷⁸ Die entzündungshemmenden Makrophagen-Phänotyp (M2) herrschen als dominante Zellpopulation vor und leiten die Interaktion mit Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, EZM und peripheren Nerven ein.^{61, 70, 79, 80} Die Verringerung der Blutversorgung und der beschleunigte Stoffwechsel der Zellen, die an der Reparatur der Wunde arbeiten, führen dazu, dass eine Hypoxie (Sauerstoffmangel) im Wundgewebe entsteht. Dies stellt einen wichtigen Stimulus für die Angiogenese dar. Hypoxische Bedingungen stimulieren die Synthese von Hypoxie-induzierbarem Faktor 1 (HIF-1) in Makrophagen, Fibroblasten, vaskulären Endothelzellen und Keratinozyten.^{65, 81-84} Die darauf folgende Freisetzung von proangiogenen Faktoren wie z.B. VEGF, FGF-2, PDGF, TGF- β sowie das metabolische Umschalten von Endothelzellen initiiert die Neovaskularisation.⁸⁵ Schließlich wird das gebildete Zellnetzwerk von dem Granulationsgewebe, bestehend aus einer großen Anzahl an Fibroblasten und M2-Makrophagen sowie einem schlecht organisierten Kollagenetzwerk, das mit Kapillaren verschlungen ist, abgelöst.⁸⁶ Zudem sind an der Granulationsgewebebildung und Reepithelisierung BMSCs und aus dem Fettgewebe stammende mesenchymale Stammzellen (ATMSCs) beteiligt.⁸⁷ Dabei können sich beispielsweise BMSCs in Keratinozyten, Fibroblasten der Haut und Endothelzellen differenzieren.^{87, 88} Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das Sekretom, von den verschiedenen mesenchymalen Stammzellen ausgeschüttet, die Migration und Proliferation verschiedener Zelltypen in der gegenwärtigen Proliferationsphase beeinflussen kann.⁵⁶

1.2.1.4 Umbau-/Reifephase

Die Umbau- bzw. Reifephase, die letzte Phase des Heilungsprozesses, erstreckt sich über ein Jahr oder länger und ist durch eine fortschreitende Abnahme der Zellularität und Vaskulatur gekennzeichnet (Abb. 2).⁴⁴ Die Auflösung des Granulationsgewebes und die Narbenbildung werden durch verschiedene MMPs und ihre Inhibitoren vorangetrieben. Fibroblasten, die wichtigsten zellulären Akteure in dieser Phase, produzieren eine erhöhte Menge an Kollagen Typ I und anderen EZM-Komponenten, während die MMPs das zuvor als Gerüst dienende ungeordnete Kollagen, hauptsächlich Typ III, abbauen.^{1, 26, 89, 90} Jede Störung des Gleichgewichts zwischen Abbau und Aufbau des dermalen Kollagens kann zur Entwicklung von

Keloiden und hypertrophen Narben (übermäßige Ansammlung von EZM) oder zur Entstehung von chronischen Wunden führen.⁹¹

1.2.2 Hauptakteure in der Wundheilung

Während einige Tiere in der Lage sind, nach einer Verletzung ganze Körperteile nachwachsen zu lassen (wie der Regenwurm, dem nach der Halbierung ein neuer Kopf wächst), sind Menschen leider nicht in der Lage, solche Leistungen zu erbringen. Unsere Mittel zur Genesung nach Gewebeschäden bestehen weitgehend in der Reparatur und nicht in der reinen Regeneration. Tausende Male in unserem Leben spielt sich ein sorgfältig geschriebenes, aber nie gesehenes Wundheilungsdrama ab, bei welchem Zellen als Schauspieler, extrazelluläre Matrix als Schauplatz und Wachstumsfaktoren als Kommunikationsmittel dienen. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die an der Wundheilung beteiligten Zellen, die Wachstumsfaktoren und Zytokine für die Kommunikation sowie die Funktion der extrazellulären Matrix.

1.2.2.1 Zelltypen

Eine der Hauptaktionen während des Wundheilungsprozesses ist die Zellproliferation. Um nach einer Verletzung zu heilen – sei es durch Regeneration oder Narbenbildung – müssen Zellen in den Zellzyklus eintreten und diesen durchlaufen, einen streng regulierten Prozess, der aus zwei Hauptaktivitäten besteht: DNA-Replikation und Mitose. Kontinuierlich proliferierende Zellen bewegen sich immer durch den Zellzyklus, während ruhende Zellen durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine (über Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion) oder durch EZM-Komponenten (über Integrine) in den Zellzyklus gerufen werden müssen.²

Stamm- bzw. Stromazellen

Stammzellen sind aus zwei Gründen einzigartig: (1) sie haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und (2) sie haben die Fähigkeit, sich in mehr als einen Zelltyp zu differenzieren. Selbsterneuerung erfolgt entweder durch symmetrische Replikation (bei der eine Stammzelle zwei Tochterstammzellen hervorbringt, die gleichermaßen zur Selbsterneuerung fähig sind) oder asymmetrische Replikation (bei der eine Tochterzelle eine

sich selbst erneuernde Stammzelle bleibt und die andere Tochterzelle differenziert und reift).²

92

Die Fähigkeit einer Stammzelle, mehrere Zelllinien hervorzubringen, ist bei embryonalen Stammzellen am auffälligsten. Diese Zellen, die als pluripotent bezeichnet werden, sind in der Lage, Zellen aus allen Geweben des Körpers zu erzeugen. Adulte mesenchymale Stammzellen (oder Stromazellen) (MSCs) werden als multipotent bezeichnet und führen zu einer eingeschränkteren Auswahl an Zelltypen. MSCs wurden erstmals als unreife Zellen im Knochenmark von Erwachsenen beschrieben, die in der Lage sind mesenchymale Linien wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten hervorzubringen.⁹³ Später wurden mesenchymale Stammzellen in sich kontinuierlich teilenden Geweben wie Haut, Knochen, Knorpel, gastrointestinaler Epithelschicht, Hornhaut und hämatopoetischem Gewebe gefunden. Sie wurden jedoch auch in bestimmten ruhenden Geweben wie Leber, Bauchspeicheldrüse und Fettgewebe entdeckt, in denen sie normalerweise keine differenzierten Zellen produzieren. Am überraschendsten war die Entdeckung von Stammzellen, die sich in bestimmten Teilen des Zentralnervensystems befinden, einem Organsystem, dessen Gewebe lange Zeit als unfähig zur Vermehrung galt.²

Im Jahr 2005 legte die *International Society for Cellular Therapy* die Mindestkriterien für eine Definition von MSCs fest. Drei Kriterien wurden vorgeschlagen: eine Adhäsion an Kunststoff, ein spezifisches Oberflächenantigen (CD73+, CD90+, CD105+, CD45-, CD34-, CD14 oder CD11b-, CD79- oder CD19-, HLA-DR) und eine *in vitro* Fähigkeit zur Bildung von Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten.⁹⁴ Eine später veröffentlichte Klarstellung schlug den Begriff „multipotente mesenchymale Stromazellen“ vor, da nur eine Zelluntergruppe in der Lage zu sein scheint, Selbsterneuerungseigenschaften zu zeigen.^{95, 96} Zu dieser Definition muss noch die unterstützende Wirkung dieser Zellen hinzugefügt werden, insbesondere auf hämatopoetische Stammzellen (Zellen, die sich in andere Blutzellen differenzieren können).⁹⁷ MSCs tragen essentiell zur Aufrechterhaltung und Regeneration des Stütz- und Bindegewebes, wie Knochen, Knorpel, Muskel, Bändern, Sehnen und Fettgewebe bei. Eine wichtige Funktion von MSCs ist ihre Fähigkeit eine übermäßige Immunantwort zu unterdrücken, indem die Zellen eine Überstimulation von Entzündungszellen verhindern. Wie bereits zuvor beschrieben, dienen MSCs zudem zur physikalischen Unterstützung für die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen in Verbindung mit der extrazellulären Matrix (Abb. 2).⁹⁸

Idealerweise sollte eine Stammzelle für regenerative medizinische Anwendungen folgende Kriterien erfüllen: 1) Ist im menschlichen Körper in großen Mengen vorhanden (Millionen bis Milliarden von Zellen). 2) Kann durch ein minimal-invasives Verfahren gewonnen werden. 3) Kann durch eine regulierbare und reproduzierbare Art in verschiedene Zellen differenziert werden. 4) Kann sicher und effektiv in einen autologen oder allogenen Wirt transplantiert werden. 5) Kann gemäß den aktuellen *Good Manufacturing Practice*-Regularien produziert werden.⁹⁹

Mit der zunehmenden Häufigkeit von Adipositas in den Vereinigten Staaten und im Ausland ist subkutanes Fettgewebe reichlich vorhanden und leicht zugänglich.¹⁰⁰ Laut Zentrum der Gesundheit werden jedes Jahr etwa 750.000 Fettabsaugungsoperationen in den Vereinigten Staaten durchgeführt (Stand 2021). Routinemäßig wird dieses Material im Anschluss entsorgt. Aus Fett gewonnene Stammzellen sind multipotent und versprechen eine Reihe von therapeutischen Anwendungen. Aus Fettgewebe stammende Stromazellen (ASCs) teilen viele Merkmale mit mesenchymalen Stammzellen, einschließlich parakriner Aktivität. Allerdings zeigen ASCs auch einige spezifische Merkmale wie das hohe angiogene Potenzial.¹⁰¹⁻¹⁰³ ASCs können Wachstumsfaktoren und Zytokine sezernieren, die den Heilungsprozess und die Regeneration auf parakrine Weise stimulieren. Sie rekrutieren endogene Stammzellen und fördern deren Differenzierung. Zudem können toxische Substanzen durch die Produktion von antioxidativen Stoffen und Radikalfängern durch die ASCs entfernt werden. Schließlich können sich ASCs selbst in verschiedene Zelltypen differenzieren.¹⁰³

Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen

Neben den Stamm- oder Stromazellen sind drei weitere Zelltypen entscheidend für den Prozess der Gewebereparatur: Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen (Abb. 1). Die Funktion von Makrophagen wurde zuvor bereits ausführlich beschrieben, deshalb liegt in diesem Kapitel der Schwerpunkt auf Fibroblasten und Endothelzellen. Bei den meisten Wunden ist ein vollständiger Ersatz des verwundeten Gewebes in seinen ursprünglichen, unverletzten Zustand unmöglich. Die Wunde muss daher mit extern gewonnenem Material geheilt werden, um die lebensfähigen Geweberänder wieder zu verbinden. Dieser Prozess, welcher in Kapitel 1.2.1 ausführlich beschrieben wurde, beinhaltet das Ablegen von azellulärem, fibrösem Gewebe, um den Bereich verlorener Zellen zu ersetzen. Das

Fasergewebe wird von Fibroblasten angelegt, die unter dem Einfluss zahlreicher Wachstumsfaktoren und Zytokine in den verletzten Bereich migrieren, sich vermehren und Kollagen ablagern (Abb. 3).¹⁰⁴

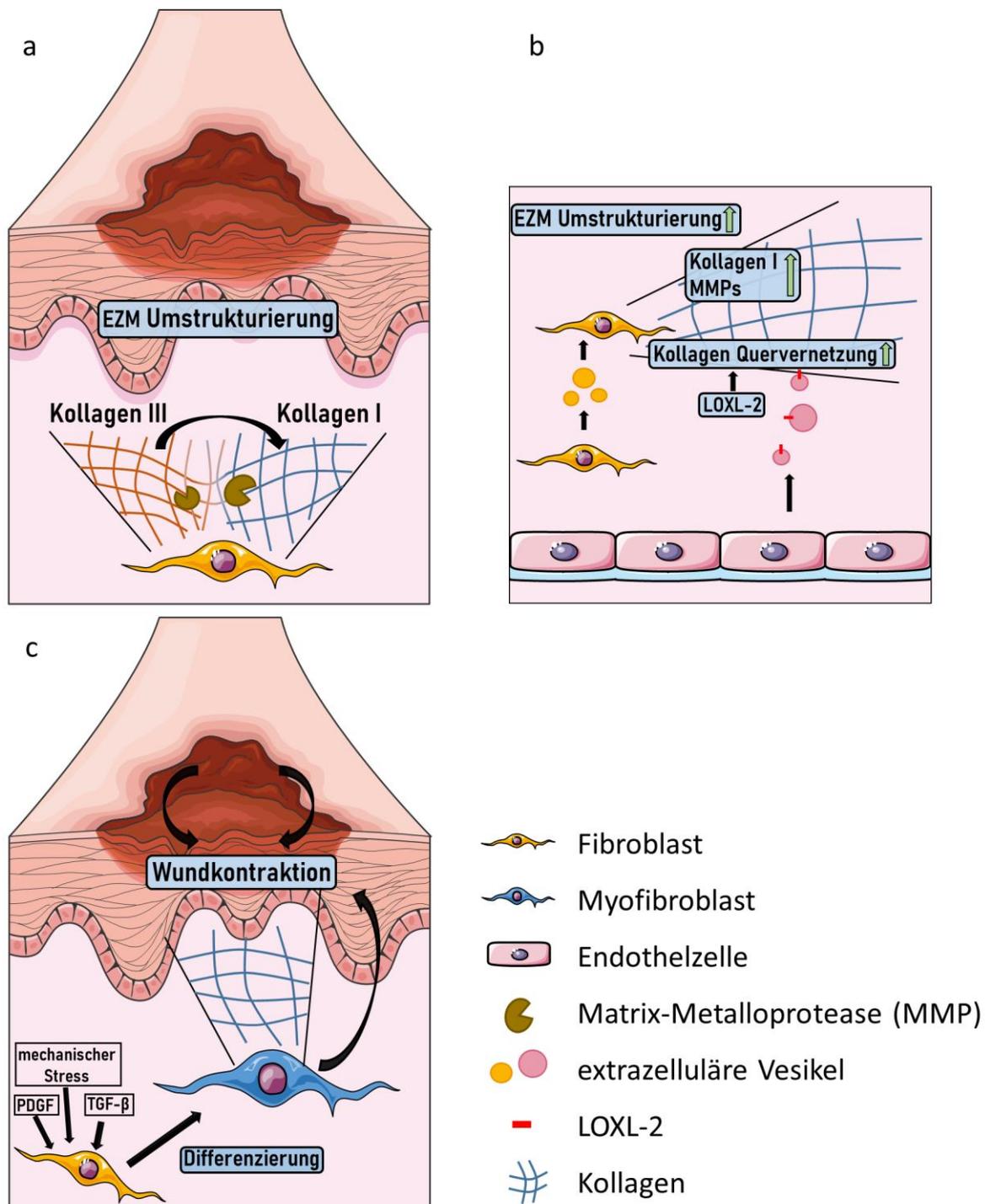


Abb. 3: Die Rolle von Kollagen während der Umbauphase der Wundheilung. a) EZM Umstrukturierung. Kollagen Typ III, das größtenteils in frühem Granulationsgewebe exprimiert wird, wird durch Kollagen Typ I ersetzt. Für die Umstrukturierung werden Kollagen und andere Komponenten der EZM durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gespalten. Hauptakteure in diesem Prozess sind Fibroblasten. b) Die Produktion von Kollagen I und deren

Quervernetzung bei der EZM Umstrukturierung. Von Fibroblasten und Endothelzellen stammende extrazelluläre Vesikel aktivieren die Synthese und Modifikation von entscheidenden Komponenten der EZM für die Reorganisation. Endothelzellen produzieren zudem das Enzym Lysyloxidase-like 2 (LOXL-2), das die Kollagenvernetzung katalysiert und die Zugfestigkeit wiederherstellt. c) Myofibroblasten fördern den Wundverschluss. PDGF, TGF- β und mechanischer Stress führen zu der Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten. Myofibroblasten produzieren große Mengen an Kollagen Typ I, was wiederum die Wundkontraktion fördert. Die Abbildung ist eine vereinfachte Darstellung nach neuesten Erkenntnissen (modifiziert nach der Vorlage von Naraukaitė et al., 2021).

In den frühesten Stadien der Wundheilung gibt es nur wenige Fibroblasten, die zusammen mit dünnen neuen Blutgefäßen in dem Granulationsgewebe suspendiert sind. Anfänglich sind die neuen Blutgefäße entscheidend für den Transport von Nährstoffen und Zellen in das neue Gewebe, aber nach einiger Zeit bilden sie sich zusammen mit den Fibroblasten zurück und hinterlassen eine kollagene Narbe, die mit der Zeit umgestaltet und gestärkt wird. Neben den Fibroblasten werden Myofibroblasten, differenzierte Fibroblasten produziert, welche die Proteine zur Kontraktion der Wunde synthetisieren (Abb. 3). Im Laufe der Wundheilung werden die Myofibroblasten durch Fibroblasten ersetzt, die für eine Bildung einer Matrix aus Narbengewebe sorgen, das reich an fibrotischem Kollagen ist. Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in diesem Prozess, indem sie Wachstumsfaktoren absondern, die Fibroblasten, endotheliale Vorläuferzellen und (bei Hautwunden) Keratinozyten anlocken und stimulieren. Sie beaufsichtigen auch die Ablagerung und den Umbau von extrazellulärem Matrixmaterial.² Neben den Fibroblasten spielen die Endothelzellen eine wichtige Rolle im Wundheilungsprozess (Abb. 3). Sie ermöglichen das Wachstum und das Überleben von neu gebildetem Gewebe, da die Endothelzellen für eine Blutversorgung der Gewebe sorgen.^{105, 106} Das finale Ziel der Wundheilung ist eine normal verheilte Wunde. Deshalb muss sich ein Blutgefäßnetz durch die Verlängerung von den Wundrändern in die provisorische extrazelluläre Matrix ausbilden. Die Angiogenese, die bei der Geweberegeneration während der Wundheilung stattfindet, wird durch eine Vielzahl biologischer Effektoren in Form von diversen Wachstumsfaktoren initiiert (siehe auch 1.2.1).¹⁰⁷ Die Vielfalt unterschiedlicher biochemischer Stimuli ruft Veränderungen in der Gefäßwand hervor, die Proliferation, Überleben, Differenzierung und Migration verschiedener Zelltypen, einschließlich der Endothelzellen, beeinflussen.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Die neuen Gefäße beginnen als Mikrokapillaren. Die Endothelzellen müssen zunächst aktiviert werden. Residente Endothelzellen reagieren auf

eine Reihe von angiogenen Faktoren, einschließlich FGF, VEGF, PDGF, Angiogenin (ANG) und TGF- α , sowie TGF- β (siehe auch nachfolgendes Kapitel). Das feine Gleichgewicht wird durch die Wirkung von Hemmstoffen wie Angiostatin und Steroiden aufrechterhalten.¹¹¹⁻¹¹³ Stimulierende und hemmende Moleküle können gemeinsam direkt auf Endothelzellen wirken, indem sie die Mitose aktivieren und unterstützen und die Migration fördern, oder indirekt, indem sie die Wirtszellen anschalten, um Endothelwachstumsfaktoren freizusetzen. Darüber hinaus wird das Wachstum von Endothelzellen durch Moleküle stimuliert, die während der Hypoxiebedingungen aus dem Gewebe ausgeschieden werden.^{114, 115} Als Folge durchlaufen Endothelzellen eine komplexe Reihe von vierstufigen Ereignissen: 1) Produktion von Proteasen zum Abbau der Basallamina des alten Gefäßes, um durch die EZM zu migrieren; 2) Chemotaxis; 3) Proliferation; und 4) Umbau und Differenzierung. FGF und VEGF spielen bei allen Prozessen eine wichtige regulatorische Rolle.¹¹⁴⁻¹¹⁸ Neue Gefäße werden im Prozess der Angiogenese als Kapillarsprossen aus bereits bestehenden kleinen Gefäßen gebildet. Endothelzellen, die eine neue Kapillare bilden, vermehren sich und wandern in das umgebende Gewebe ein. Schließlich differenzieren sich die Zellen und bilden ein kontinuierliches Lumen. Nachdem sich ein Kapillarspross zu einem Tube ausgehöhlt hat, verbindet es sich mit einer anderen Kapillare oder dem benachbarten Spross, wodurch Blut fließen kann.^{111, 114} Im Wundzentrum besteht zunächst keine Gefäßversorgung und das lebensfähige Gewebe ist nur auf die Wundränder beschränkt. Sie werden von unverletzten Blutgefäßen und durch Diffusion durch unverletztes Interstitium perfundiert.¹¹⁹⁻¹²¹ Wenn Gerüste oder Gewebefüller in eine Wunde eingebracht werden, überleben die Zellen daher möglicherweise nur innerhalb der durch Diffusion zurückgelegten Entfernung, die ein oder zwei Zentimeter von den Wundrändern entfernt ist. Für Zellen an weiter entfernten Orten hängt das Überleben nur von der Kapillarbildung ab. Aus diesem Grund ist die Neovaskularisation eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Wundheilung.¹²² Während des Wachstums von Kapillaren unterliegen Endothelzellen einer Reihe von morphologischen Veränderungen, die unter biochemischer Kontrolle stehen. Chemotaktische Mittel steuern die Zellbewegung während des gesamten Prozesses. Sie wirken auf Zelloberflächenrezeptoren, um die Migration zu steuern, eine wichtige Eigenschaft bei der Angiogenese während der Wundheilung.^{123, 124} Humane Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC) stellen einen speziellen Typ von Endothelzellen dar. Sie sind primäre Zellen, die aus der Vene der Nabelschnur isoliert

werden. Die Isolierung wurde erstmals 1973 beschrieben.¹²⁵ Sie sind ein Modellsystem zur Untersuchung der Funktion von Endothelzellen mit Anwendungen wie Hypoxie, Entzündung, oxidativem Stress, Reaktion auf Infektionen und sowohl normaler als auch tumorassoziierter Angiogenese.

1.2.2.2 Wachstumsfaktoren und Zytokine

Wachstumsfaktoren sind spezialisierte Polypeptidmoleküle, die an Rezeptoren auf Zielzellen binden und Botschaften in Bezug auf Migration, Proliferation, Differenzierung, Überleben und Sekretion liefern. Das Zusammenspiel der Wachstumsfaktoren und ihrer begleitenden Funktionen ist extrem komplex, deshalb sind in Tabelle 1 die primären Wachstumsfaktoren, die mit jedem Stadium der Wundheilung verbunden sind, aufgelistet.²

Tab. 1 Die wichtigsten Wachstumsfaktoren der Wundheilung

Stadium der Wundheilung	EGF	FGF	KGF	PDGF	TGF- α	TGF- β	TNF	VEGF	TIMP-1	TSP-1	Serpin-E1	uPa	Serpin-F1
Fibroblastenmigration		X		X		X					X		
Fibroblastenproliferation	X	X		X	X		X		X		X		
Monozytenmigration		X		X		X	X						
Makrophagenaktivierung							X		X				
Epithelzellenmigration	X	X	X		X						X		
Epithelzellenproliferation	X	X	X		X				X		X		
Angiogenese		X		X	X		X	X		X			X
Kollagensynthese				X		X			X		X	X	X
Kollagenasesynthese	X	X		X			X	X					
Wundkontraktion		X		X									X
Einfluss auf MMPs									X				

Einer der kritischsten Wachstumsfaktoren bei der Gewebereparatur ist TGF- β . Dieser Wachstumsfaktor gehört zu einer Superfamilie, die auch eine Reihe anderer Faktoren mit weitreichenden Funktionen umfasst, wie z. B. knochenmorphogenetische Proteine, Aktivine, Inhibine und die Müller-Hemmsubstanz.¹²⁶ Hergestellt von Blutplättchen, Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen, bindet TGF- β an Zelloberflächenrezeptoren mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität und löst die Phosphorylierung von zytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren namens Smads aus, die nach den beiden Drosophila-Proteinen benannt sind, von denen sie Homologe sind.¹²⁷ Smads dringen dann in den Zellkern ein und beeinflussen die Gentranskription.

Obwohl TGF- β viele Funktionen hat, ist seine wichtigste Rolle bei der Wundheilung die Förderung der Fibrose (1.2.1.3). Dies erfolgt durch die (1) Anziehung von Fibroblasten und die Stimulierung zur Proliferation, (2) Produktion von Kollagen durch die Fibroblasten und (3) Hemmung des Abbaus von extrazellulärer Matrix durch die Metalloproteinasen. Es überrascht nicht, dass TGF- β ein Schlüsselfaktor bei Erkrankungen mit pathologischer Fibrose ist, wie z. B. Lungenfibrose, systemische Sklerose und Marfan-Syndrom.¹²⁸ Zusätzlich zu seinen fibrogenen Wirkungen hemmt TGF- β auch das Wachstum von Epithelzellen, verringert Entzündungen und fördert die Invasion und Metastasierung in Tumoren.¹²⁹

Ein weiterer für die Wundheilung essentieller Wachstumsfaktor ist PDGF, der so genannt wird, da er in Blutplättchengranulat gespeichert und bei der Blutplättchenaktivierung freigesetzt wird. PDGF wird von einer Reihe von Zellen hergestellt, darunter Makrophagen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen und ist an fast allen Prozessschritten der Wundheilung beteiligt. Er lockt Neutrophile, Makrophagen und Fibroblasten in das Wundgebiet und stimuliert und aktiviert sie anschließend. Zudem induziert er die Angiogenese, löst die Produktion von MMPs, Fibronectin und Hyaluronsäure aus und unterstützt die Wundkontraktion.¹³⁰

FGF ruft praktisch alle Zell-Hauptakteure (Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen) an den Ort der Wunde. Er initiiert die Einwanderung von Epithelzellen von den Wundrändern, vermittelt die Wundkontraktion und stimuliert die Angiogenese.¹³¹ VEGF wirkt hauptsächlich auf Endothelzellen. Er ist ein starker Induktor der Blutgefäßbildung sowohl bei der Gewebereparatur als auch in der frühen fötalen Entwicklung.¹³² VEGF wird in bestimmten Tumoren, insbesondere Nierenzellkarzinomen, überexprimiert und ist deshalb ein Ziel für die

Entwicklung neuer Chemotherapeutika.¹³³ Andere Wachstumsfaktoren, wie EGF und Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF), stimulieren die Proliferation von Epithelzellen und Hepatozyten und verstärken die Migration von Epithelzellen.¹³⁴

Proteolytische Enzyme im speziellen MMPs tragen zu allen Phasen des Wundheilungsprozesses bei, indem sie die Migration von Immunzellen in die Wunde regulieren und diese bei Fibroblasten und Keratinozyten erleichtern und das Narbengewebe umstrukturieren. Als Folge dieser pleiotropen Funktion sind unkontrollierte Aktivitäten von MMPs in der Wunde mit einer beeinträchtigten Wundheilung verbunden.¹³⁵ Die Aktivität von MMPs wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene streng reguliert.^{136, 137} Mehrere Zelltypen wie Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Entzündungszellen können die MMP-Aktivität durch Regulierung der Genexpression als Reaktion auf Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Onkogene und Kontakt mit anderen Zellen oder EZM steuern.^{136, 138} Wichtig ist, dass alle MMPs inaktiv synthetisiert werden und eine Aktivierung durch andere Proteasen wie Plasminogen, Furin oder andere MMPs erfolgt.^{138, 139} Schließlich werden aktive MMPs durch Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen (TIMPs) kontrolliert, einer Familie von vier sezernierten Proteinen (TIMP-1, -2, -3 und -4), die die MMP-Aktivität reversibel hemmen.¹⁴⁰ Dadurch wird der weitere Abbau der EZM verhindert.^{53, 54} Zudem ist für den Aufbau der EZM das Zusammenspiel zwischen den MMPs und den TIMPs entscheidend. Während die MMPs die Degradation der Matrix bewirken, führt TIMP-1 zum Aufbau der EZM. Zusätzlich induziert TIMP-1 Veränderungen in der Zellmorphologie und stimuliert Zellwachstum verschiedener Zelltypen.⁵⁵ Die Umstellung auf das Makrophagen M2-Profil führt zur Freisetzung von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die Angiogenese und Gewebegranulation ermöglichen.

TSPs sind sezernierte Multidomänen-Glykoproteine, die viele Funktionen einschließlich der Modulation von Zelladhäsion, -proliferation, -migration und Angiogenese aufweisen. Es existieren mindestens fünf TSPs. TSP-1, -2, -3, -4 und Knorpel-Oligomer-Glykoprotein/TSP-5. Die Rolle des endogenen Angiogenese-Inhibitors Thrombospondin-1 (TSP-1) bei der Geweberegeneration und -reparatur ist umstritten. Es konnten erhöhte Mengen von TSP-1 in der extrazellulären Matrix von frühen Wundstadien und um die Gefäße des Wundverschlusses während der späten Stadien nachgewiesen werden. Dies trägt möglicherweise zu einer normalen Angiogenese bei.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass TSP-1-

transgene Mäuse zwar gesund und fruchtbar waren, die Heilung von Hautwunden jedoch stark verzögert, und mit einer verringerten Bildung von Granulationsgewebe und einer stark verminderten Angiogenese der Wunde verbunden war. Darüber hinaus war die Migration von Fibroblasten *in vivo* und *in vitro* durch TSP-1 gehemmt.¹⁴⁵ Zusammengefasst zeigen die Daten, dass durch TSP-1 vorzugsweise die mit der Wundheilung verbundene Angiogenese gehemmt wird. Allerdings ist die mit der normalen Entwicklung und der Hauthomöostase verbundene Angiogenese nicht beeinträchtigt.

Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (Serpin E1) ist ein prominentes Mitglied der Serinprotease-Inhibitor-Superfamilie (SERPIN) und ein ursächlicher Faktor der Multiorganfibrose sowie ein Schlüsselregulator des Gewebereparaturprogramms. Serpin E1 schwächt die perizelluläre Proteolyse ab, indem es die katalytische Aktivität sowohl von Urokinase als auch von Protease-Aktivatoren vom Gewebetyp (uPA und tPA) hemmt und dadurch effektiv die Plasmin-vermittelte Fibrinolyse und die gesamte perizelluläre proteolytische Kaskade moduliert. Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPa) ist eine Serinprotease, die von Serpin E1 spezifisch inhibiert werden kann. Die Erzeugung von perizellulärem Plasmin durch uPA induziert die Matrixproteolyse und spielt eine wesentliche Rolle beim Matrixumbau, der Zelladhäsion und -migration.¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ Serpin E1 wirkt sich auch auf zelluläre Reaktionen bei Gewebeverletzungen aus, indem es die lokale und zeitliche Aktivierung von multimeren Zelloberflächen-Signalkomplexen titriert. Serpin E1 ist ein Wachstumsfaktor der frühen Reaktion auf Verletzungen, dessen Expression durch zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine erhöht wird. Serpin E1 reagiert am stärksten auf den Wachstumsfaktor TGF- β und ist somit entscheidend bei dem TGF- β -vermittelten Gewebeumbauprozess. Es wird beispielsweise durch Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert und ist an der Wundheilung somit maßgeblich beteiligt.¹⁵⁰ Aufgrund seiner schnellen transkriptionellen Induktion und allgegenwärtigen Expression fungiert Serpin E1 wahrscheinlich als ein zentraler Regulator verschiedener verletzungsinizierter zellulärer Prozesse, einschließlich Migration, Zellwachstum und Proliferation.¹⁵⁰ Eine Fehlregulation von Serpin E1 ist ein ursächlicher Faktor bei einer abnormalen Wundheilung und Fibrose.¹⁵⁰ Nach einer Verletzung erfolgt die Induzierung der Expression von Serpin E1 am Rand der Wunde, wo es für eine effiziente Migration von Keratinozyten erforderlich ist.^{148, 151, 152}

Serpin F1 (*Pigment epithelium-derived factor precursor*, PEDF), ein weiterer Faktor der Serpinfamilie, ist ein endogener anti-angiogener Faktor, der in Wunden produziert wird und zur Entfernung von Kapillaren während des Heilungsprozesses beitragen kann.¹⁵³ Das Fehlen von Serpin F1 führte zu einer vorübergehenden Veränderung des dermalen Wundverschlusses und des Kollagengehaltes und verursachte wesentliche Veränderungen der Angiogenese. Studien zeigen, dass Serpin F1 höchstwahrscheinlich mehrere Prozesse beeinflusst, um die physiologische Kapillarverfeinerung in der Wunde zu regulieren.¹⁵³

Neben Wachstumsfaktoren transportieren auch Zytokine während der Gewebereparatur wichtige Botschaften zwischen den Zellen. Zytokine, kleine Proteine, die von Zellen des Immunsystems ausgeschieden werden, sind vielleicht am besten für ihre Rolle als Immunmediatoren des adaptiven Immunsystems bekannt. An der Wundheilung sind insbesondere drei Zytokine beteiligt: TNF, IL-1 und IL-6.¹⁵⁴

1.2.2.3 Natürliche Extrazelluläre Matrix

Gewebe besteht nicht nur aus Zellen, sondern vor allem aus der extrazellulären Matrix, ein komplexes Geflecht aus Makromolekülen. Diese Matrix besteht aus verschiedenen Proteinen und Polysacchariden, die von Zellen ausgeschieden werden und mit ihrer Oberfläche in Verbindung bleiben. Im Bindegewebe bestimmt die Matrix die physikalischen Eigenschaften des Gewebes. EZM existiert in zwei Formen: die interstitielle Matrix (ein gallertartiges, amorphes interzelluläres Material) und die Basalmembran (eine dünne, hochgradig organisierte, plattenartige Schicht, auf der die Epithelzellen ruhen). Die Basalmembran befindet sich zwischen Epithel und Bindegewebe und kontrolliert das Zellverhalten maßgeblich. Die EZM hat viele Funktionen und Verantwortlichkeiten. Neben den physikalischen Eigenschaften, verleiht es beispielsweise Weichgeweben Elastizität und Knochen Festigkeit, präsentiert Wachstumsfaktoren und Zytokine, agiert als Gerüst, an dem Zellen adhären und migrieren können, und erleichtert Zellproliferation. Das Zellwachstum wird dabei nicht nur in physiologischen Umgebungen, sondern auch bei der Gewebereparatur gefördert. Sowohl bei der Regeneration und Wundheilung als auch bei anderen Prozessen wie Morphogenese, chronische fibrotische Prozesse und Metastasierung spielt die EZM eine entscheidende Rolle.

Die Komponenten der EZM können aufgrund ihrer Hauptfunktionen in zwei Gruppen eingeteilt werden: 1) Polysaccharide vom Glykosaminoglykan-Typ (GAGs), die meistens kovalent an Proteine zu einem Proteoglykan gebunden sind, 2) Strukturelle Proteine, wie Kollagen, Elastin und Laminin, die sowohl Struktur- als auch Bindungsfunktionen besitzen.⁸ Die Proteoglykane bilden das stark hydratisierte gallertartige Substrat, in der die faserförmigen Proteine eingebettet sind. Das Gel aus den Polysaccharidmolekülen ist druckfest, erlaubt aber zudem eine schnelle Diffusion von Nährstoffen, Metaboliten oder Hormonen zwischen dem Blut und den Zellen im Gewebe. Neben der Regulierung der EZM-Permeabilität, vermitteln die Proteoglykane Entzündungs- und Immunantworten und kontrollieren das Zellwachstum.² Die Kollagenfasern verstärken und strukturieren die Matrix, während Elastin der Matrix ihre Elastizität verleiht.⁸ Die Zusammensetzung der Interstitial Matrix und Basalmembran ist unterschiedlich. Die Interstitial Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagen, Elastin, Fibronectin, Proteoglykanen und Hyaluronan, während die Basalmembran aus nicht fibrillärem Kollagen, Laminin und Proteoglykanen besteht.¹⁵⁵ Hyaluronan, das einfachste Proteoglykan, verleiht Geweben und Gelenken Druckfestigkeit und wird in großen Mengen während der Wundheilung gebildet.

Kollagene sind eine Familie faserförmiger Proteine, die in allen vielzelligen Tieren vorkommen. Da sie der Hauptbestandteil von Haut und Knochen darstellen, gehören sie zu den häufigsten Proteinen von Säugern und tragen zu 25% zum Proteinanteil dieser Tiere bei. Kollagen besteht aus drei Ketten, die sich zu einer Tripelhelix anordnen.¹⁵⁶ Mittlerweile wurden 27 verschiedene Kollagentypen identifiziert, allerdings spielt weniger als die Hälfte eine wichtige Rolle im menschlichen Körper. In der Haut kommen überwiegend die fibrillären Kollagene vom Typ I, II, III, V und XI vor, wobei Kollagen Typ I vorwiegend in Haut und Knochen zu finden ist und damit das häufigste Kollagen darstellt. Die nicht-fibrillären Kollagene Typ IV und XVIII sind eher in blättrigen Strukturen angeordnet und ein Hauptbestandteil der Basalmembran.^{89, 157-}

160

Im Allgemeinen verleiht das Kollagen dem Gewebe seine Festigkeit, die Elastizität wird durch die elastischen Fasern erreicht. Elastische Fasern bestehen aus einem zentralen Kern, dem Elastin, das von Fibrillin, ein Glykoprotein, umgeben ist. Fibrillin kontrolliert die Anwesenheit von TGF- β innerhalb der EZM. Jedes der zuvor aufgezählten Komponenten der EZM interagiert miteinander, um den Prozess der Gewebefunktion und des Wachstums voranzutreiben und

zu reparieren.¹⁶¹⁻¹⁶³ Kollagen spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Phasen der Wundheilung entweder in seiner nativen, fibrillären Konformation oder als lösliche Komponente im Wundmilieu (Abb. 3). In den wichtigen Phasen des Wundheilungsprozesses, wie Hämostase, Entzündung und Angiogenese, wird auf die EZM, Kollagen und seine Verbindungen reagiert.^{32, 164-171} Kollagen wird von Fibroblasten synthetisiert und als Reaktion auf eine Verletzung induziert Kollagen die Aktivierung der Blutplättchen und die Aggregation dieser führt zur Ablagerung des Fibringerinnsels in der Wunde.^{157, 158, 172-174} Kollagen Typ III ist das erste Kollagen, das in den frühen Stadien der Wundheilung synthetisiert wird und später durch Kollagen Typ I, das dominierende Hauptkollagen, ersetzt wird.¹⁷⁵ Im späteren Stadium tragen, wie zuvor beschrieben, die Fibroblasten, die durch Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert wurden, zur Ablagerung von Kollagen bei. Die anfänglich zufällige Ablagerung von Kollagen während der Bildung von Granulationsgewebe wird durch das Enzym Lysyloxidase kovalent vernetzt (Abb. 3).¹⁷⁶ Durch diesen Prozess entstehen die komplexen Strukturen der EZM und schließlich bestimmt die Art, Menge und Organisation von Kollagen die Zugfestigkeit der geheilten Haut.^{1, 89, 177} Gleichzeitig werden durch den Abbau von Kollagen Fragmente freigesetzt, die die Proliferation von Fibroblasten und die Synthese von Wachstumsfaktoren fördern und zur Angiogenese und Reepithelisierung beitragen.¹⁷⁸ Während der Entzündungsphase rekrutieren die löslichen Fragmente aus dem Kollagenabbau Immunzellen wie Makrophagen, die Bakterien und abgestorbenes Gewebe entsorgen. Dieser Schritt ist entscheidend für den Übergang in die proliferative Phase. Während dieser Phase dienen die Kollagenfragmente als potente angiogene Signale, um die Entwicklung von neuen Blutgefäßen zu fördern. Angiogenese, wie bereits beschrieben eine kritische Komponente im Wundheilungsprozess, wird streng durch die Aktivität von Stimulatoren und Inhibitoren reguliert. Der Umbau der EZM stellt eine entscheidende Unterstützung für die Gefäßentwicklung dar und vor allem Kollagen spielt dabei eine wichtige Rolle.^{165, 168, 169, 171, 179} Das Kollagen kann dabei sowohl als Stimulator als auch als Inhibitor der Angiogenese dienen. Eine *in vitro* Echtzeitanalyse mittels Multiphotonenmikroskop während der Neubildung von Blutgefäßen zeigte eine Umgestaltung von Kollagenfibrillen im Frühstadium zu späteren Entwicklungsstadien.¹⁸⁰ Es ist bekannt, dass Kollagen Typ I die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* durch die Bindung von spezifischen Integrin Rezeptoren stimuliert. Vor allem sorgt das C-Propeptid-Fragment von Kollagen Typ I für die Rekrutierung von Endothelzellen, die wiederum

Angiogenese in heilenden Wunden fördern.¹⁷⁰ Interessanterweise zeigen proteolytische Kollagenfragmente von Typ IV und XVIII antiangiogene Eigenschaften.^{160, 181} Die Proliferation und Migration von Endothelzellen wird dadurch gehemmt und Apoptose kann eingeleitet werden. Bei mehreren Erkrankungen, wie z.B. Osteoarthritis, kommen diese Prozesse vor.^{158, 170, 182}

Durch den Abbau von Kollagen wird zudem die Migration von Keratinozyten gefördert, die wiederum zur Reepithelisierung der Wunde beiträgt.^{44, 177, 183} Der Abbau des Kollagens wird intra- und extrazellulär reguliert. Dabei werden die intakten Kollagenfibrillen aufgebaut und die fragmentierten durch beispielsweise Phagozytose oder membrangebundene und sezernierte proteolytische Enzyme abgebaut. Fehler in den Prozessen führen zu pathologischen Zuständen wie Fibrose (1.2.3).^{173, 184-186}

Der Umbau von Kollagen kann Monate selbst nach dem Wundverschluss dauern und die Festigkeit des reparierten Gewebes kann auf ca. 80-85% des normalen Gewebes ansteigen, wenn die Prozesse störungsfrei ablaufen.^{177, 187}

1.2.3 Unzureichende Wundheilung (chronische Wunden)

Damit sich ein Gewebe ohne Narbenbildung regenerieren kann, müssen zwei Bedingungen erfüllt sein: 1) Die verletzten Zellen müssen in der Lage sein zu proliferieren (wie es bei der kontinuierlichen Zellteilung im Ruhezustand ist) und 2) das umliegende Stroma (Gerüst im Bindegewebe) muss intakt sein. Wie bereits erwähnt, können verschiedene Vorerkrankungen (z.B. Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen) Gründe für eine unzureichende Wundheilung bzw. für das Auftreten von chronischen Wunden darstellen. Zwei häufige Komplikationen sind mit Veränderungen des normalen Wundheilungsprozesses der Haut verbunden: Fibrose und chronische Hautwunden. Fibrose ist durch eine übermäßige Produktion von extrazellulärer Matrix gekennzeichnet.¹² Aufgrund von anhaltenden Entzündungen, einer erhöhten Zerstörung der EZM-Komponenten, verursacht durch eine erhöhte Aktivität von Metalloproteinasen und anderen Enzymen sowie eine fehlgeleitete Aktivierung löslicher Wachstumsfaktoren und Mediatoren kommt es zu einem gestörten Wundheilungsprozess.¹⁷⁶ Im Nachfolgenden werden Schwerpunktmäßig die Unterbrechungen des normalen Wundheilungsprozesses aufgrund einer unzureichenden Heilung betrachtet. Bei dem Heilungsprozess von chronischen Wunden wird die Entzündungsphase durch eine

unzureichende anatomische und funktionelle Integrität verlängert, so dass die Proliferationsphase später erreicht wird.^{23, 188} Die Mikroflora von chronischen Wunden besteht normalerweise aus diversen unterschiedlichen Bakterienspezies, so dass die mikrobielle Infektion den Wundheilungsprozess zusätzlich beeinflusst.¹⁸⁹ Während dieser Infektion werden entzündliche Zellen und Mastzellen angezogen, Flüssigkeit sammelt sich im Wundbereich und die Entzündung wird verschlechtert.¹⁹⁰ Chronische Wunden sind durch eine anhaltende Entzündung, beeinträchtigte Angiogenese, schwierige Reepithelisierung, erhöhte Proteaseaktivität und/oder dysregulierte Menge von Zytokinen und Wachstumsfaktoren gekennzeichnet.¹⁹¹ Beispielsweise ist die Expression von TIMPs herunterreguliert, während einige Mediatoren wie IL-6, TNF- α und MMPs ständig hochreguliert sind.⁶⁴ Zudem gibt es auf zellulärer Ebene viele Störungen, die bei chronischen Wunden auftreten können. Neutrophile zum Beispiel zeigen einen veränderten Phänotyp, eine verringerte Infiltration und eine transendotheliale Zellmigration und verbleiben schließlich länger in der Wunde. Zudem zeigen chronische Wunden eine reduzierte Induzierung von M2-Makrophagen und eine geringere antibakterielle Aktivität.^{192, 193} Außerdem wird gezeigt, dass die Makrophagen teilweise ihre Funktion nicht ausführen können, so dass es aufgrund einer unkontrollierten Produktion von Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren, zusammen mit dem Ungleichgewicht von M1 (proinflammatorisch) und M2 Phänotypen zu einer fehlerhaften Reparatur kommt. Zudem liegt eine fehlgeschaltete Kommunikation zwischen den Makrophagen und anderen wichtigen Akteuren der Wundheilung einschließlich Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen und Stammzellen vor.⁶¹ Einige Studien zeigen, dass Keratinozyten in chronischen Wunden hyperproliferieren, ein beeinträchtigtes Migrationsverhalten aufweisen und ihnen die Expression von Differenzierungsmarkern fehlt.^{86, 194-196} Durch die fehlende Migration können sie nicht beim Prozess des Wundverschlusses helfen. Letztendlich können Fibroblasten in chronischen Wunden nicht auf Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren reagieren, was zu einer reduzierten Proliferation führt.^{197, 198} Diese molekularen und zellulären Prozessstörungen führen zu einer geänderten Zusammensetzung der EZM sowie zu veränderten Mechanotransduktionsmechanismen zwischen der EZM und Zellen.^{16, 199, 200} Dies wiederum behindert die Ablagerung von EZM und die Bildung von Granulationsgewebe, was wiederum zur Entstehung von chronischen Wunden beiträgt.^{61, 90, 201} Eine Veröffentlichung von 2018 fasst die wichtigsten Faktoren, die an einem gestörten Wundheilungsprozess

beteiligt sind, zusammen: Makrophagen, Myofibroblasten, extrazelluläre Matrix, Mechanik und Fehlkommunikation.²⁰² Aufgrund der erwarteten Zunahme von Wunden und im speziellen chronischen Wunden wurde eine Vielzahl an verschiedenen Therapieansätzen in den vergangenen Jahrzehnten bis heute entwickelt.

1.3 Förderung der Geweberegeneration und Wundheilung - Therapieansätze

Es gibt eine große Anzahl von Behandlungsmethoden für die Behandlung von Wunden und Verbrennungen, die weltweit eine Multi-Milliarden-Dollar Industrie repräsentieren. Zu den Methoden gehören herkömmliche Wundaufgaben, Verbände, mit eingearbeiteten Wirkstoffen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen sowie Hauttransplantate.²⁰³ In den nächsten Kapiteln werden verschiedene Therapieansätze für die Förderung der Geweberegeneration und im speziellen der Wundheilung näher erläutert. In Abb. 4 sind die wichtigsten Therapieansätze für die Behandlung von Wunden gezeigt.

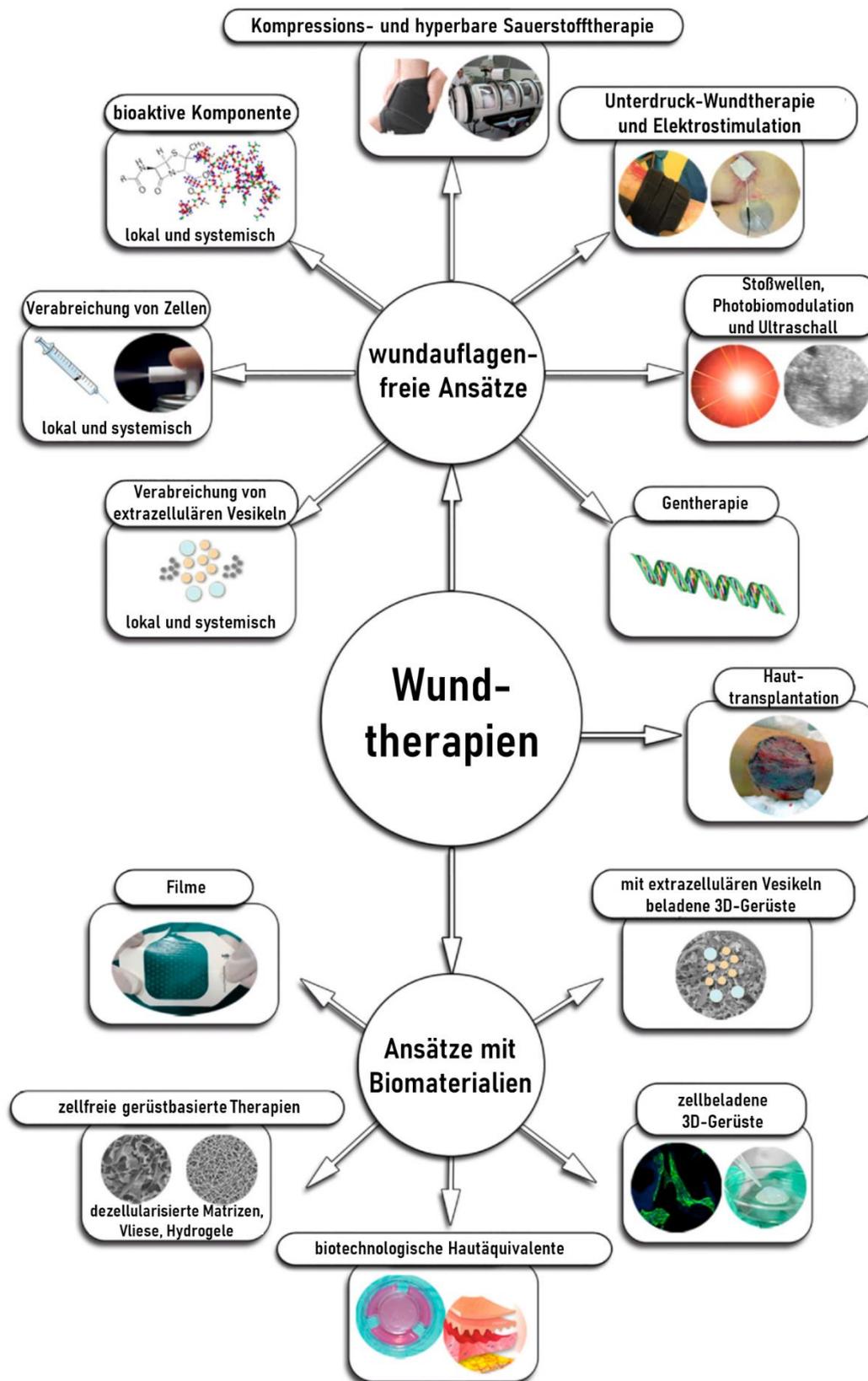


Abb. 4: Verschiedene Therapieansätze für die Behandlung von Wunden. Die Ansätze sind in wundauflagen-freie und Ansätze mit Biomaterialien untergliedert. Modifiziert nach Las Heras et al., Journal of Controlled Release 328 (2020) 532-550 mit freundlicher Genehmigung des Verlages Elsevier B.V..

Im nächsten Abschnitt werden die Wundauflagen-freien Ansätze und im Anschluss die Therapieansätze mit Biomaterialien (zellfrei und zellbeladen) zur Behandlung von Wunden und im speziellen chronischen Wunden beschrieben.

1.3.1 Wundauflagen-freie Ansätze

Im Allgemeinen ist bekannt, dass bei vielen Hauterkrankungen, wie chronischen Wunden oder schweren Verbrennungen, eine Verabreichung von hohen Dosen systemischer Medikamente, wie z.B. Antibiotika erforderlich sind, um lokale therapeutische Wirkungen zu erzielen.

1.3.1.1 Systemische Therapieansätze

Systemische Antibiotika werden eingesetzt, um die Symptome zu lindern und weitere Infektionen zu vermeiden bzw. den allgemeinen Zustand nicht zu verschlechtern.²⁰⁴ Allerdings konnte gezeigt werden, dass systemische Antibiotika nur schwer in die Biofilme der Wunde eindringen können und die Verwendung eines Antisepsis-Verfahrens ein deutlich besserer Ansatz zur Behandlung oder Vorbeugung von bakteriellen Infektionen in Wunden ist.²⁰⁵ Neben Antibiotika werden auch Antikörper und Peptide systemisch verabreicht, um die Wundheilung zu fördern. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem Neuropeptid α -Melanozyten-stimulierenden Hormon zu einem regenerativen Heilungsprozess mit weniger Narbenbildung und einer verbesserten Organisation der Kollagenfasern führt.²⁰⁶ Zudem hat die systemische Anwendung von Aminosäuren oder deren Derivate, wie Prolin oder N-Acetylcystein, eine positive Auswirkung auf die Wundheilung gezeigt, die sogar wirksamer als deren lokale Verabreichung war.²⁰⁷ Trotzdem gibt es bei der systemischen Anwendung Grenzen, da die Gewebe nur begrenzt gezielt behandelt werden können und es zu Nebenwirkungen außerhalb der Wunden kommen kann.

1.3.1.2 Lokale Therapieansätze

Aufgrund der Nachteile bei der systemischen Anwendung wird bei der Behandlung von Wunden oftmals die direkte Abgabe von bioaktiven Verbindungen an das Wundbett bevorzugt. Diese Strategie der lokalen Therapie hat sich zudem als am besten geeignete Behandlung von chronischen Wunden bewährt, da die Wunden oft eine große exponierte

Oberfläche aufweisen. Antiseptika wie Jod, Chlorhexidin oder Silber und Antibiotika wie Tetracyclin, Gentamicin oder Chloramphenicol zeigen deutliche Vorteile beim Wundheilungsprozess, wenn sie lokal verabreicht werden.^{205, 208-212} Darüber hinaus gibt es eine Liste diverser Naturstoffe wie Curcumin, Aloe Vera oder Thymianextrakt, die eine antibakterielle und regenerative Wirkung aufweisen.^{209, 213-215} Als weitere Strategie für die Förderung der Wundheilung können Zellen, wie z.B. MSCs, lokal transplantiert werden, die beispielsweise die Heilung durch Zelldifferenzierung und die Freisetzung parakriner Faktoren verbessern.²¹⁶⁻²¹⁹ Allerdings wird das therapeutische Potenzial von MSCs häufig durch die schlechte Überlebensfähigkeit an der transplantierten Stelle verringert.^{220, 221} Deshalb ist es wichtig, das Überleben von transplantierten MSCs zu verbessern und die Sekretion von Wachstumsfaktoren und ihre biologische Funktion *in vivo* zu stärken. Vor kurzem wurde berichtet, dass aus Stamm- bzw. Vorläuferzellen stammende extrazelluläre Vesikel als regenerative Therapie zur Beschleunigung der Wundheilung dienen (Abb. 3).²²² Durch die lokale oder systemische Verabreichung der extrazellulären Vesikel konnte in klinisch relevanten Tiermodellen für Hautwunden eine verbesserte Heilung gezeigt werden. Allerdings sind noch weitere Studien und detailliertere experimentelle Protokolle erforderlich, damit es in den weiteren Jahren zu einer erfolgreichen klinischen Umsetzung kommen kann.²²²

Ein weiterer Therapieansatz ist die topische Anwendung von Wachstumsfaktoren in Form von beispielsweise Cremes, Gelen oder Injektionen.²²³ Wie in Kapitel 1.2.2.2 beschrieben regulieren Wachstumsfaktoren Zellproliferation, -differenzierung, -migration und deren Kommunikation in allen Wundheilungsphasen. In der Behandlung von Wunden werden beispielsweise Wachstumsfaktoren wie EGF, PDGF und TGF- β eingesetzt, die einen enormen Einfluss auf die Wundheilung haben.^{86, 209, 213, 224} Interessanterweise ist der einzige von der FDA und EMA zugelassene Wachstumsfaktor, in einem Gel formuliert, PDGF-BB.^{213, 223, 225} Zudem hat das körpereigene thrombozytenreiche Plasma (PRP), das viele Wachstumsfaktoren enthält, eine hohe Heilungsrate in zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Formulierungen gezeigt.^{86, 226} Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Mediatoren aber vor allem aufgrund des enzymatischen Abbaus in der Wunde, ist es entscheidend, dass die Faktoren nach und nach freigesetzt werden.²⁰⁹

Die Verkapselung von Therapeutika ermöglicht eine nachhaltige und lokale Anwendung.^{227, 228} Dabei dienen Mikro- oder Nanokapseln als Träger für die Medikamente im Inneren der Kern-

Schale-Struktur.^{209, 229, 230} Einige Studien beschreiben die Verwendung von Liposomen für chronische Wunden, die die Medikamente schützen und eine langanhaltende Abgabe unterstützen. Beispielsweise wurde ein Liposom aus Seidenfibroin hergestellt, das im Inneren bFGF enthielt und nachweislich die Wundheilung in Mäusen beschleunigte, vor allem durch die Induzierung von Angiogenese.^{231, 232} Darüber hinaus beschreiben viele Studien die Verwendung von polymeren, anorganischen und Lipid-Nanopartikeln in Wunden. Dabei wurden zahlreiche Antibiotika oder antimikrobielle Peptide (z.B. Amphotericin B) in polymere Nanopartikel eingeschlossen. Diese zeigten beispielsweise eine verbesserte Wundheilung bei Mäusen und eine große Aktivität gegen verschiedene Mikroorganismen *in vitro*.²³³⁻²³⁶ Außerdem werden metallische und halb leitfähige anorganische Nanopartikel (z.B. Kupfer, Silber und Eisenoxid), entweder mit oder ohne Graphenoxid, aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung in der Wundheilung eingesetzt.^{230, 231, 233-240} Schließlich werden Wachstumsfaktoren in Lipidnanopartikel eingekapselt, die den enzymatischen Abbau verhindern und so eine langanhaltende Abgabe der Mediatoren ermöglichen.²⁴¹⁻²⁴⁴

Ein weiterer Therapieansatz in der Wundheilungsbehandlung, um die Anwesenheit der Wachstumsfaktoren und Zytokine zu verbessern, ist die Verabreichung von Genen, die die Mediatoren kodieren.²⁴⁵ Durch virale oder nicht-virale Vektoren wird das genetische Material in Form von intraläsionalen Injektionen eingeführt.⁸⁶ Zudem nimmt die Anwendung von Gen-Silencing, der Unterdrückung oder Unterbrechung der Expression eines Gens auf transkriptionaler oder translationaler Ebene, mittels miRNAs und siRNAs in der Wundbehandlung immer mehr zu.²⁴⁶⁻²⁴⁸ In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass miRNAs in der Lage sind Zellproliferation, -differenzierung zu regulieren und die Migration von Keratinozyten und Endothelzellen zu verbessern.^{10, 86, 249, 250} Darüber hinaus wurden in einigen Studien siRNAs untersucht, die als selektiver Inhibitor von fibrotischen Wachstumsfaktoren, MMPs und proinflammatorischen Zytokinen dienen, und somit die Wundheilung beschleunigen.^{10, 251-254}

1.3.1.3 Physikalische Therapieansätze

Eine traditionelle Methode der physikalischen Behandlung von Wunden stellt das Debridement dar, bei dem das Wundbett regelmäßig von totem Gewebe und Fremdmaterial befreit wird. Dabei gibt es chirurgische, mechanische, autolytische, chemische, enzymatische

oder Ansätze mit Larven, die sich als förderlich für den Wundheilungsprozess erwiesen haben.^{26, 211, 255} Zudem hat sich seit langem der Ansatz von Kompressionstherapien für die Wundheilung etabliert. Dabei werden zum Beispiel Spezialbandagen oder spezielle Kompressionsverbandsysteme verwendet, die einen externen und graduellen Druck auf die Wunde ausüben.^{256, 257} In den neunziger Jahren wurde die Unterdruck-Wundtherapie eingeführt, bei der Wundexsudat durch Vakuum entfernt wird.^{26, 258-266} Normalerweise wird dieser Therapieansatz nur als Kombinationstherapie angewendet. Verschiedene Studien haben allerdings gezeigt, dass es Ödeme und bakterielle Infektionen reduziert, Angiogenese und die lokale Durchblutung fördert und die Bildung von Granulationsgewebe stärkt.^{258, 267-269} Zur Behandlung von chronischen Wunden wird als weiterer physikalischer Therapieansatz die elektrische Stimulation durch Stromimpulse elektromagnetischer Energie angewendet.^{270, 271} Die Wundheilung kann mit diesem Ansatz beschleunigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Fibroblastenzahl erhöht, die TGF- β - und VEGF-Produktion verbessert ist und die Kollagensynthese stimuliert wird.²⁷²⁻²⁷⁴ Die hyperbare Sauerstofftherapie (HBO-Therapie oder Druckkammertherapie) wird ebenfalls zur Behandlung von Wunden und vor allem chronischen Wunden eingesetzt.²⁷⁵⁻²⁷⁷ Sie führt zu Neovaskularisation, einer erhöhten Produktion von Kollagen und Wachstumsfaktoren.^{278, 279} Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass in den ersten Tagen die Wundheilung zwar deutlich verbessert ist, dies aber nicht über einen längeren Zeitraum demonstriert werden konnte.^{275, 280} Stoßwellen, Photobiomodulation und Ultraschall werden ebenfalls zur Behandlung von Wunden eingesetzt. Stoßwellen können beispielsweise die Heilung von venösen Beinschwüren unterstützen, indem sie die Angiogenese fördern und die Entzündung reduzieren.^{281, 282} Bei der Photobiomodulation werden die Wunden mit Licht von LEDs, Lasern, Plasma und anderen Lichtquellen im Wellenlängenbereich von visuell bis infrarot behandelt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Durchblutung gefördert, die neutrophile Infiltration reduziert, die Proliferation der Fibroblasten erhöht sowie die Epithelisierung der Wunde verbessert wird.²⁸³ Bei der Ultraschalltherapie wurden sehr gute Ergebnisse bei Druckgeschwüren oder diabetischen Geschwüren erzielt.²⁸⁴⁻²⁸⁶ Allerdings sind für alle drei Therapieansätze weitere Studien nötig, um die Wirksamkeit der Ansätze zu stützen und die optimalen Parameter wie Dauer, Dosis etc. während der Therapie zu definieren.

1.3.1.4 Hauttransplantationen bei großen oder thermischen Verletzungen

Als Goldstandard bei großen Wunden oder thermischen Verletzungen (Verbrennungen, Verbrühungen, Gefrieren) dient die Hauttransplantation zur Rekonstruktion von Hautdefekten in verschiedenen anatomischen Lokalisationen. Dieser Ansatz bietet eine ausreichende Abdeckung der Wunde, einen Schutz vor Infektionen sowie die Initiierung und Beschleunigung des Wundheilungsprozesses.^{203, 287} Wenn das Transplantat die Epidermis und einen Teil der Dermis enthält, wird es als Spalthauttransplantat bezeichnet.²⁸⁸ Im Gegensatz dazu spricht man von einem Vollhauttransplantat, wenn die Epidermis und die gesamte Dermis enthalten ist (Abb. 1).²⁸⁹ Spalthauttransplantate werden bevorzugt für die Abdeckung von großen Wunden, in denen das Gefäßsystem kaum vorhanden ist, eingesetzt. Allerdings dulden diese Transplantate wenige Kontrakturen während des Wundheilungsprozesses. Deshalb werden Vollhauttransplantate bevorzugt in exponierten Körperregionen wie z.B. Gesicht oder Hals eingesetzt. Allerdings erfordern sie ein ausgeprägteres Gefäßsystem in der transplantierten Zone.^{26, 289} Zudem gibt es epidermale Hauttransplantate, die nur die Epidermisschicht der Haut umfassen. Bei dieser Strategie sind Keratinozyten der Zelltyp, der die therapeutische Wirkung aufweist, indem Wachstumsfaktoren und Mediatoren sezerniert werden und der endogene Wundheilungsprozess stimuliert wird.²⁹⁰ Dies wird aufgrund der Kosten und der Komplexität des Verfahrens fast ausschließlich bei Schwerstbrandverletzten eingesetzt. Hauttransplantate können entweder vom Patienten selbst (autolog oder autogen), von einem anderen toten oder lebenden Patienten (allogen) oder von Tieren (xenogen) stammen.^{291, 292} Autologe Transplantate haben beispielsweise bei diabetischen Fußgeschwüren vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Der Nachteil sind Schmerzen und die begrenzte Verfügbarkeit von Entnahmestellen.^{287, 293, 294} Die Verwendung von allogenen Transplantaten ist heutzutage weit verbreitet, allerdings ist die Verfügbarkeit begrenzt und die Kosten sind hoch.²⁹⁴ Im Gegensatz dazu sind xenogene Transplantate (hauptsächlich aus Schweinehaut) eine gute Alternative, weil sie leicht verfügbar sind, geringe Kosten aufweisen und die Größe der Transplantate nicht begrenzt ist.²⁹⁵ Allerdings zeigt der Wirt oft eine Immunantwort innerhalb der ersten Woche.^{203, 287, 296} Neueste Studien haben jedoch gezeigt, dass genetisch veränderte Xenotransplantate aus Schweinehaut solange wie ein allogenes Transplantat überleben und es keinen negativen Einfluss auf ein nachfolgendes Allotransplantat oder einen anderen therapeutischen Ansatz zeigt.²⁹⁷

1.3.2 Therapieansätze mit Biomaterialien – zellfrei

Die zelluläre und molekulare Komplexität des Wundheilungsprozesses erfordert eine kontrollierte räumliche und zeitliche Abgabe biologischer Substanzen. Seit 600 v. Chr. wird Hauttransplantation für die Behandlung von Wunden beschrieben und eingesetzt und weitere fortschrittliche Strategien haben sich über die Zeit entwickelt.²⁹⁸ Heutzutage ist das Design und die Entwicklung von neuen biokompatiblen und biologisch abbaubaren Materialien für die Wundversorgung, die den Heilungsprozess induzieren und fördern — für die Reparatur von beschädigtem Gewebe und Wiederherstellung seiner Integrität — ein wichtiger Ansatz.²⁴ Die Wundaufgabe sollte so konzipiert sein, dass es die Gewebereparatur fördert, das Exsudat entfernt und eine Infektionen an der Wunde verhindert.¹⁸⁸ Darüber hinaus kann eine lokale Verabreichung von Antibiotika vorteilhaft sein, um die Keimbelastung der Wunde und eine Ausbreitung der Infektion zu vermeiden.²⁹⁹ Im letzten Jahrhundert bis heute wurde eine Reihe von Wundaufgaben entwickelt, um Feuchtigkeit zu speichern, das Wundbett vor physikalischen und mechanischen Einflüssen zu schützen und eine vorläufige Matrix für Zellmigration und –proliferation sowie Bildung der EZM und für die Neovaskularisation zu schaffen. Zudem können Medikamente und bioaktive Substanzen freigesetzt werden, die die Bildung von neuem Gewebe fördern. Die Wundaufgaben werden oft aus Biomaterialien, aus natürlichen wie beispielsweise Kollagen, Gelatine, Alginat, Fibrin, Fibronectin, Chitosan, Hyaluronsäure oder Cellulose, oder aus synthetischen Polymeren wie z.B. Polymilchsäure (PLA), Polyvinylsäure (PVA), Polyglykolsäure (PGA) oder Polyacrylsäure (PAA), hergestellt.³⁰⁰ Einer der Nachteile bei der Verwendung von synthetischen Materialien als Wundverband ist, dass der Verband wieder entfernt werden muss, was zu einer weiteren Beschädigung der Wunde kommen kann. Im Gegensatz dazu können Wundaufgaben aus natürlichen Biomaterialien durch den stetigen Abbau nach und nach in den Körper integriert werden. Die derzeitigen zellfreien Therapieansätze können in zweidimensionale (2D-) Wundaufgaben wie z.B. Filme und dreidimensionale (3D-) Gerüste wie dezellularisierte Matrizen, Vliese und Hydrogele eingeteilt werden.

1.3.2.1 Zweidimensionale (2D-) Wundauflagen

2D-Wundauflagen, wie beispielsweise semipermeable Filme, dienen zur Abdeckung von Wunden, um vor Bakterien und einem Wasserverlust zu schützen. Filme sind dünne, elastische, meist transparente Folien, die gut haften und aus einem oder einer Kombination aus verschiedenen Biomaterialien hergestellt werden. Die Filme sind in der Regel atmungsaktiv (gas- und wasserdampfdurchlässig), aber undurchlässig für Flüssigkeiten und Bakterien. Dadurch können die Wunden vor Wasserverlust und externen Mikroorganismen geschützt werden. Die Vorteile dieser Form der Wundaufgabe sind, dass der Wundverlauf beobachtet werden kann und Potenzial der Wirkstoffbeladung und die Flexibilität die Wundaufgabe als primäre oder sekundäre Auflage zu verwenden. Allerdings fehlt die Eigenschaft zu quellen, was zu einer übermäßigen Ansammlung an Exsudat führen kann.³⁰¹ Die am häufigsten verwendeten Polymere für diese Anwendung sind Polyurethan, Kollagen, Chitosan, Alginat und Hyaluronsäure. Die Verwendung von Filmen für die Behandlung von Wunden lässt sich bis Anfang des 20. Jahrhunderts zurückverfolgen. Heutzutage gibt es viele kommerziell erhältliche Produkte wie z.B. Bioclusive™ (Johnson & Johnson) und Tegaderm® Films (3M™) aus Polyurethan.³⁰² Darüber hinaus gibt es Zweischicht-Systeme, die normalerweise aus einer Siliziumschicht in Kombination mit einer Protein-, Polysaccharid- oder synthetischen Polymerschicht bestehen. Der Vorteil des zweischichtigen Aufbaus ist die Integration der Innenschicht in das Wundbett und der Wundschutz und verminderte Wasserdampfverlust durch die äußere Schicht, meistens das Silikon.³⁰¹ Neben den kommerziell erhältlichen Produkten gibt es eine Vielzahl von Biomaterialien, die als Filme in der Behandlung von Wunden untersucht werden. In den vergangenen Jahrzehnten wurde Chitosan aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften, Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit und seine ausgezeichneten mechanischen Eigenschaften immer beliebter für die oben beschriebene Anwendung.^{303, 304} Beispielsweise zeigten mit Lupeol beladene Chitosan/Gelatine-Filme, die durch ein Gießverfahren hergestellt wurden, antioxidative und antimikrobielle Eigenschaften und eine zusätzliche Biokompatibilität bei der Kultivierung von NIH/3T3 Fibroblasten.²⁴³ Viele Studien konnten sowohl die antimikrobielle Wirkung als auch das Potenzial von Chitosanfilmen in der Wundheilung *in vivo* stützen.³⁰⁵⁻³⁰⁸ Andere Polysaccharide wurden ebenfalls als Filme in der Wundbehandlung eingesetzt. Zum Beispiel zeigten Filme aus Carboxymethylcellulose (CMC) und Polyethylenglykol (PEG) ebenfalls keine

Toxizität bei der Kultivierung von NIH/3T3 Fibroblasten und ein besseres Heilungsverhalten als die unbehandelte Kontrollgruppe. Dies konnte sowohl bei normalen als auch bei diabetischen Wistar-Albino-Ratten beobachtet werden.³⁰⁹ Auch bei Proteinen, wie Kollagen, Fibroin oder Gelatine wird das Wundheilungspotenzial immer weiter untersucht. Filme aus Fibroin und Dextran zeigten eine vollständige Abwesenheit von Toxizität in L929 Fibroblasten und eine antimikrobielle Wirkung sowie eine kontrollierte Freisetzung bei einer Beladung mit Antibiotika.³¹⁰ Schließlich wurden Filme, die ausschließlich aus Kollagen oder Gelatine bestanden und mit verschiedenen Antioxidantien bzw. entzündungshemmenden und antimikrobiellen Substanzen (z.B. Astaxanthin) beladen wurden, kürzlich untersucht. Zusammengefasst zeigten beide Filme antibakterielle Eigenschaften bei einer völligen Abwesenheit von Toxizität *in vivo* und eine kontrollierte Freisetzung der Wirkstoffe.^{311, 312}

1.3.2.2 Zellfreie dreidimensionale (3D-) Gerüste

Im Gegensatz zu zweidimensionalen Strukturen, wie Filmen oder Zellen, die *in vitro* gezüchtet werden, spiegeln 3D-Gerüste das Zellverhalten in natürlicher Umgebung wesentlich besser wieder. Die 3D-Gerüste dienen als Leitstruktur für die Zellen und fördern somit die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen. 3D-Gerüste sind Konstrukte oder Matrizen, die Schutz bieten und Feuchtigkeit speichern und ihre therapeutische Wirkung in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung und/oder Ladung entfalten und damit die natürliche zelluläre Mikroumgebung nachahmen.^{300, 313} Als Gerüste werden z.B. Vliese und Hydrogele eingesetzt, die schließlich als künstliche extrazelluläre Matrix dienen.^{314, 315} Es gibt diverse Verfahren zur Herstellung dieser Gerüste aus Biomaterialien wie zum Beispiel das traditionelle Gießen, die Hydrogelbildung, dezellularisierte extrazelluläre Matrizen, Elektrospinning zur Herstellung von Vliesen aus Nanofasern bis hin zu 3D-Druck Techniken.

Dezellularisierte Matrizen

Dezellularisierte Matrizen sind eine von Tieren oder Menschen gewonnene EZM, bei denen während des Herstellungsprozesses entweder alle Zellen entfernt wurden oder von vorn herein nicht vorhanden sind. Durch die Gewinnung erhält man Polymere natürlichen Ursprungs (z.B. Kollagen oder Hyaluronsäure), die für die Wundheilung aufgrund der hohen

Biokompatibilität und Bioaktivität von großem Interesse sind.³¹⁶ Die EZM-Gerüste werden *in vivo* vollständig abgebaut und induzieren eine Wirtszellantwort, die eher eine konstruktive Umgestaltung als die Bildung von Narbengewebe unterstützt. Zu den gemeinsamen Merkmalen des EZM-assoziierten Gewebeumbaus gehören eine umfangreiche Angiogenese, Rekrutierung zirkulierender Vorläuferzellen, ein schneller Gerüstabbau und konstruktiver Umbau von beschädigtem oder fehlendem Gewebe.³¹⁷ Kommerziell erhältlich ist beispielsweise eine *Allograft Adipose Matrix (AAM)*, eine rein natürliche extrazelluläre injizierbare Matrix, die vor allem bei diabetischen Fußgeschwüren, Druckgeschwüren und tieferen Wunden Anwendung findet. Präklinische Studien über 12 Wochen mit athymischen Mäusen haben gezeigt, dass AAM eine extrazelluläre Matrix darstellt, die als Gerüst für patienteneigene Zellen fungiert.

Aufgrund der entscheidenden Funktion von Kollagen in der EZM ist es der Hauptbestandteil von dezellularisierten Matrizen. Wie zuvor beschrieben spielt Kollagen durch die Aufrechterhaltung der strukturellen und biologischen Integrität der EZM eine wichtige Rolle im Wundheilungsprozess (siehe auch 1.2.2.3). Aus diesem Grund gibt es viele Studien über Gerüste auf Kollagenbasis und kommerziell erhältliche dezellularisierte Matrizen, die größtenteils aus Kollagen Typ I bestehen (z.B. Oase®(Healthpoint), Graftjacket® (Wright Medical Group N.V.)).³¹⁸⁻³²¹ Die Matrizen werden mit verschiedenen anderen Komponenten der EZM und Wachstumsfaktoren kombiniert und erhöhen somit die biologische Aktivität, hemmen die Wirkung von MMPs und fördern die Vaskularisierung.^{318-320, 322, 323} Der Vorteil von diesen Produkten ist im Gegensatz zu xenogener dezellularisierter EZM, dass sie als menschliche Zellen und Gewebe klassifiziert werden und somit die gesetzlichen Regularien für die Zulassung und Anwendung niedriger sind.^{86, 316} Seit mehr als 100 Jahren werden zudem Matrizen aus der Plazenta verwendet, weil sie eine EZM aufweist, die reich an Kollagen und Wachstumsfaktoren ist.^{246, 324} Der entscheidende Vorteil ist die erhöhte Menge an Wachstumsfaktoren, MMPs, TIMPs und antimikrobiellen Peptiden, die die Zellantwort fördern, die Abstoßungsreaktionen reduzieren und somit die Wundheilung begünstigen.^{325, 326}

Poröse 3D-Gerüste

Poröse 3D-Gerüste wie beispielsweise Vliese oder Hydrogele aus Biomaterialien bieten mehrere Vorteile gegenüber azellulären natürlich gewonnenen Matrizen und zellbasierte

Therapien. Hierzu zählen zum einen die Kosteneffizienz, eine längere Haltbarkeit und eine reduzierte Abstoßungsreaktion. Allerdings eignen sich auch nicht alle Biomaterialien bzw. die Gerüste müssen bestimmte Anforderungen erfüllen, um für die Behandlung von Wunden verwendet werden zu können. Als Grundlage müssen die Biopolymere biokompatibel und biologisch abbaubar sein und der Herstellungsprozess muss ökonomisch sein. Zudem müssen die Gerüste eine ausreichende Mechanik bieten, um die Struktur zu stabilisieren. Sowohl die Benetzbarkeit als auch die Oberflächenladung spielen eine entscheidende Rolle. Die Porengröße und die Porosität müssen im Netzwerk für die Diffusion von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallprodukten sorgen und das Quellverhalten sollte hoch sein.³²⁷ Durch den Herstellungsprozess und die Polymerkonzentration kann die Porengröße und Porosität stark beeinflusst werden.³²⁸ Durch die hohe Porosität ist ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis gegeben, so dass die Zellen wachsen, migrieren und proliferieren können und sich neue EZM bilden kann. Zusammengefasst müssen die porösen Gerüste aus Biopolymeren bestmöglich die Struktur und Funktionalität einer menschlichen EZM simulieren. Viele Gerüste aus Biomaterialien werden mittlerweile kommerziell für die Behandlung von Wunden eingesetzt: Gerüste auf Polysaccharidbasis wie Hyalomatrix® (Anika Therapeutika); kollagenbasierte Gerüste wie Terudermis® (Olympus Terumo Biomaterilas Corp.); und rein synthetische Gerüste wie Suprathel® (Surgicorp), ein Lactidtrimethylen Carbonat mit Capronolacton-Matrix.³²⁹⁻³³⁶ Bei vielen Gerüsten wurden die mechanischen und funktionellen Eigenschaften immer weiter verbessert, um die Heilungsraten zu erhöhen. Deshalb werden Biopolymere verwendet, die eine gut organisierte Struktur bilden können (z.B. Chitosan, Alginat, Cellulose, PEG, PCL) in Kombination mit Komponenten der EZM (wie Kollagen, Hyaluronsäure, Fibrin), um zum einen die Stabilität und deren Biokompatibilität zu erhöhen.^{337, 338} Li et al. entwickelte ein GOcollagen Gerüst, das eine kontrollierte Freisetzung von N-Acetylcystein (NAC), einem antioxidativen Molekül, erlaubte. Darüber hinaus zeigten die Gerüste eine beschleunigte Wundheilung in Rattenmodellen, durch eine schnellere Kollagenablagerung, bessere Epithelisierung und erhöhte Angiogenese gegenüber der Kontrollgruppe ohne Gerüst und mit Gerüst, aber ohne NAC.^{337, 339} Eine sehr interessante Strategie, die vor kurzem veröffentlicht wurde, beschreibt, dass in ein Kollagengerüst ein phosphoreszierender Sauerstoffsensor zur Überwachung des physiologischen Sauerstoffgehaltes in diabetischen Mäusen eingesetzt wurde. Durch Bildgebungsinstrumente

kann so der Sauerstoffgehalt während der Wundheilung ohne invasive Methoden detektiert werden.³⁴⁰ Obwohl Kollagen das am meisten genutzte Protein für die Herstellung von porösen 3D-Gerüsten ist, werden auch andere Proteine wie z.B. Gelatine, Seidenprotein, Laminin, Fibrin und Sojaprotein für die Behandlung von Wunden untersucht.^{86, 341-345} Gelatinegerüste, die mit Silber-Nanopartikeln und Curcumin beladen wurden, zeigten eine antioxidative und – bakterielle Wirkung ohne dass es eine toxische Wirkung auf L929-Fibroblasten hatte.³⁴⁶ Schließlich können aber auch synthetische Polymere für die Herstellung von porösen Gerüsten verwendet werden. Beispielsweise konnte mit Hilfe eines zweiphasigen Calciumphosphat/PCL Gerüstes gezeigt werden, dass die Sauerstoffversorgung aufrechterhalten werden kann und die Zellen in der Lage sind zu proliferieren.³⁴⁷ Im Folgenden werden Vliese und Hydrogele als 3D-Matrizen und deren Herstellungsverfahren näher erläutert.

Vliesstoffe

Vliesstoffe aus Nanofasern sind Konstrukte, die im Allgemeinen durch das Anlegen eines elektrischen Feldes hergestellt werden. Durch Hochspannung kann die polymere Lösung durch eine Spinnöse gedrückt werden, so dass sich auf dem Kollektor ein Vlies aus Nanofasern ablegt. Durch dieses Herstellungsverfahren kann mit Hilfe des Faserdurchmessers und die Anzahl an Faserschichten die Porosität und Porengröße variiert und somit die Freisetzung der Wirkstoffe reguliert werden. Die Morphologie und Topographie der 3D-Gerüste aus Nanofasern kann so eingestellt werden, dass sie der natürlichen EZM der Haut bestmöglich ähnelt.^{348, 349} Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Vliese als Wundaufgabe eingesetzt werden können. Sie können zusätzlich mit Wirkstoffen beladen werden, die kontrolliert freigesetzt werden können.³⁵⁰⁻³⁵⁶ Zudem können sie Proteine und Zellen transportieren bzw. platzieren.^{348, 357-363} Interessanterweise kann beispielsweise durch die Layer-by-Layer Technik ein Gerüst hergestellt werden, dass die Bioaktivität von Wachstumsfaktoren und Zytokinen bewahrt. Alleine durch die Anzahl der Schichten, kann die Freisetzungsrates variiert werden.^{364,}
365

Im Vergleich zu Hydrogelen zeigen Vliese eine stabilere und offenporigere Struktur, was die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff sowie die Zellmigration unterstützt und fördert. Allerdings können sie nicht in den Patienten injiziert werden. So dass Hydrogele als

Wirkstoffdepot bzw. in der Wundheilung als injizierbare Systeme vermehrt zum Einsatz kommen.

Hydrogele

Hydrogele sind dreidimensionale vernetzte, hydrophile, wasserunlösliche Polymerketten, die bis zu 99% ihres Trockengewichtes an Wasser aufnehmen können und dabei physikalisch quellen ohne sich aufzulösen.³⁶⁶⁻³⁶⁸ Sie werden bereits seit Ende der achtziger Jahre aufgrund ihrer 3D-Struktur, hydrophilen Eigenschaften und der potentiellen Biokompatibilität in der Wundheilung eingesetzt.^{369, 370} Aufgrund ihres hohen Wassergehaltes sind sie ideal für die Behandlung von trockenen Wunden geeignet und spielen eine wichtige Rolle bei der Reinigung von nekrotischem Gewebe. Darüber hinaus sind Hydrogele meistens transparent und bieten die Möglichkeit einer einfachen Wundüberwachung.³⁷¹ Deshalb können Hydrogele bei der Behandlung verschiedener Wunden eingesetzt werden, einschließlich Verbrennungen, Operationswunden und Dekubitus.^{19, 372, 373} Hydrogele weisen sehr gute Abbaueigenschaften auf, so dass sie als Träger für eine gezielte Abgabe von Wirkstoffen Verwendung finden.³⁷⁴ Leider fehlt den Hydrogelen oft die strukturelle Stabilität, allerdings können die Hydrogele im Gegensatz zu Filmen und Vliesen injiziert und optimal an die Wunde des Patienten angepasst werden. Hydrogele für die Wundheilung werden ebenfalls entweder aus natürlichen Biomaterialien wie beispielsweise Kollagen, Hyaluronsäure, Fibronectin, Chitosan oder Alginat oder aus synthetischen Biomaterialien (z.B. Polymethacrylat, Polyvinylalkohol, PEG, PVP) hergestellt.^{86, 375-382} In Tab. 2 ist eine Auswahl an kommerziell erhältlichen Hydrogelen für die Behandlung von Wunden dargestellt, die ihre Vielfalt und Vielseitigkeit zeigt.

Tab. 2: Auswahl an kommerziell erhältlichen Hydrogelen, die für das Wundmanagement eingesetzt werden. Modifiziert nach Niculescu and Grumezescu, 2022.³⁶⁸

Produkt	Art der Wundauflage	Eigenschaften als Wundauflage	Referenzen
Activheal Hydrogel	amorphes Hydrogel	Bietet eine feuchte Umgebung, die die Heilung erleichtert Wirksam beim Debridement von nekrotischen, trockenen oder schorfigen Wunden Kann bis zu drei Tage <i>in situ</i> verbleiben Erfordert einen sekundären Verband, um ihn an Ort und Stelle zu halten	383, 384
AquaClear	Hydrogelgerüst	Behält ein optimales Feuchtigkeitsgleichgewicht bei, das die Heilung unterstützt Fördert die Reepithelisierung Verschließt die Wunde, ohne dass ein Sekundärverband erforderlich ist Geeignet für verschiedene Geschwüre, Verbrennungen und traumatische Wunden	384-386
Flaminal	antimikrobielles Hydrogel	Eingebettet in ein Enzymsystem, das freie Radikale bildet, die Bakterien abtöten Wundexsudat wird in der hydratisierten Form des Verbands absorbiert Gewährleistet ein kontinuierliches Debridement von nekrotischem Gewebe	19, 387
HydroTac	Hydrogelgerüst	Gibt aktiv Feuchtigkeit ab und erhöht die Wachstumsfaktorkonzentration Stimuliert den epithelialen Wundverschluss Hat eine luftdurchlässige, wasser- und bakteriendichte Folienrückseite Verschließt die Wunde, ohne dass ein Sekundärverband erforderlich ist	19, 384, 388
IntraSite	breites, steriles Hydrogel	Fördert das autolytische Debridement bei nekrotischen oder schorfigen Wunden bakteriostatische und fungistatische Wirkung Geeignet für Beingeschwüre, Druckgeschwüre und Operationswunden	19, 384, 389
Iodozyme / Oxyzyme	zweischichtiges Hydrogel	antimikrobielle Wirkung durch Jodfreisetzung Sorgt für eine enzymaktivierte <i>in-situ</i> -Sauerstoffproduktion Geeignet zur Behandlung chronischer Wunden	19, 390, 391
Solosite	amorphes, dünnes, konserviertes Hydrogel	Anwendung bei tiefen Wunden mit unregelmäßigen Konturen Geeignet für schwach bis mäßig exsudierende Wunden Kann zur Behandlung von Dekubitus und Wundhöhlen verwendet werden	19, 391

In den letzten Jahren wurden verschiedene präklinische und klinische Studien mit Hydrogelen als biologische Transportsysteme, da sie empfindliche Wirkstoffe (z.B. Peptide, Proteine, DNA) schützen können, zur Behandlung von chronischen Wunden mit vielversprechenden Ergebnissen durchgeführt. Zum Teil wurden Hydrogele mit Wachstumsfaktoren beladen und anschließend in Ratten oder Menschen appliziert.³⁹²⁻³⁹⁴ Aber auch komplexere Systeme in denen beispielsweise das Hydrogel aus HA, Vitamin E, Dopamin und β -Cyclodextrin hergestellt wurde, konnten so die fetale EZM nachahmen. Die dünne Hydrogelschicht gewährleistet eine Sterilität, eine Persistenz der Feuchtigkeit und eine nahtlose Haftung auf der Haut auch bei Beanspruchung (Widerstand bei Dehnung). Die BALB/c-Mäuse mit den verabreichten Hydrogelen zeigten eine erhöhte Fibroblastenmigration, eine unterdrückte Überexpression von TGF- β 1 und eine vermehrte Kollagensynthese. Infolgedessen führten die Hydrogele zu einer beschleunigten Wundheilung und einer normalen Kollagenarchitektur.³⁹⁵ Blacklow et al. entwickelte ein mechanisch aktives Hydrogel aus Alginat und Chitosan mit einer hohen Dehnbarkeit, Gewebearhaftung und antimikrobiellen Eigenschaften. Das Ziel dieses Hydrogels war die Nachahmung der embryonalen Wundkontraktion, durch eine starke Anhaftung an der Haut und eine aktiv kontrahierende Wunde als Reaktion auf die Hauttemperatur. *In vitro* und *in vivo* Studien bewiesen die Wirksamkeit des Hydrogels bei der Unterstützung und Beschleunigung der Wundheilung.³⁹⁶

Der größte Nachteil von Hydrogelen selber sind ihre schlechten bakteriellen Barriereigenschaften.¹⁹ Deshalb berichten kürzlich veröffentlichte Arbeiten über verschiedene Strategien von beladenen Hydrogelen als Molekül-Nanoträger mit z.B. Gold/Silber-Nanopartikeln und Protamin Komplexen, um die antibakteriellen Eigenschaften zu verbessern.³⁹⁷⁻⁴⁰² Hydrogele können auch als DNA-Transporter für die Behandlung von Wunden eingesetzt werden. Beispielsweise führten Hydrogele aus Hyaluronsäure, die DNA-Plasmide enthielten, die wiederum für den Wachstumsfaktor VEGF kodieren, zu einer verbesserten proangiogenen Wirkung bei der Wundheilung von diabetischen Mäusen.⁴⁰³

All die oben beschriebenen Strategien zeigen, dass poröse 3D-Gerüste mit unterschiedlichen Eigenschaften aus natürlichen und synthetischen Biomaterialien hergestellt werden können, um die Wundheilung zu fördern. Allerdings werden immer häufiger 3D-Gerüste untersucht, die bereits mit Zellen beladen sind bevor sie in die Wunde injiziert oder appliziert werden. Im

nachfolgenden Kapitel werden zellbeladene Biomaterialien als Therapieansatz zur Beschleunigung der Wundheilung näher erläutert.

1.3.3 Therapieansätze mit Biomaterialien – zellbeladen

In den letzten zwei Jahrzehnten kam es in der Geweberegeneration und Wundheilung zu beträchtlichen Fortschritten. Dabei wurde intensiv an alternativen Herstellungsverfahren mit Biomaterialien in Kombination mit Zellen geforscht (Abb. 5).

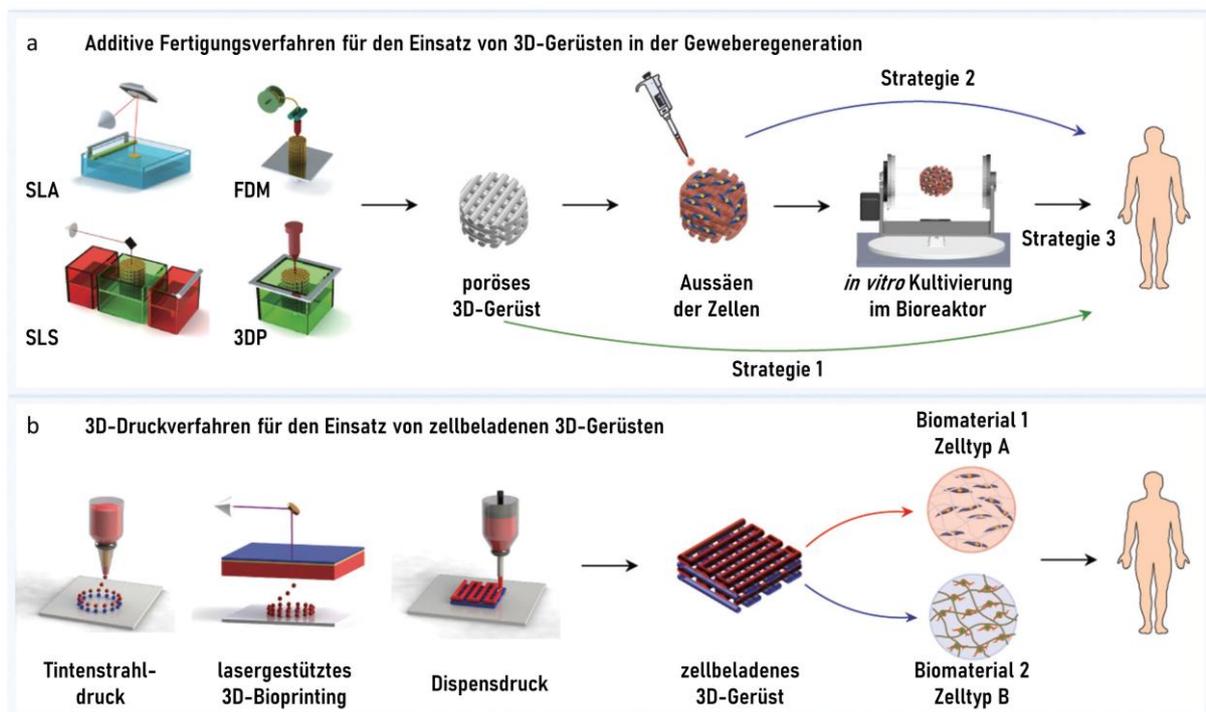


Abb. 5: Alternative Herstellungsverfahren von 3D-Gerüsten aus Biomaterialien mit Zellen für die Gewebezüchtung und Behandlung von Wunden. A) Herstellung von 3D-Gerüsten durch additive Fertigungsverfahren. Die Gerüste werden dabei entweder ohne Zellen (Strategie 1), nach dem Aussäen der Zellen (Strategie 2) oder nach der *in vitro* Kultivierung beispielsweise im Bioreaktor implantiert (Strategie 3); B) Biofabrikationsverfahren für die Herstellung von zellbeladenen 3D-Gerüsten, die anschließend implantiert werden. SLA: Stereolithographie, FDM: Fused Deposition Modeling (Schmelzschichtung), SLS: selektives Lasersintern, 3DP: 3D-Druck. Modifiziert nach Pereira & Bártolo, Engineering 2015, 1(1): 90-112 mit freundlicher Genehmigung des Verlages Chinese Academy of Engineering & Higher Education Press.

Bei der klassischen Gewebezüchtung bzw. Stammzelltherapie werden Zellen entweder vom Patienten (autolog) selbst oder von einem Donor (allogen oder xenogen) gewonnen und anschließend *in vitro* in einer 2D-Zellkultur gezüchtet. Dieser Therapieansatz ist recht einfach

durchführbar, allerdings ist der entscheidende Nachteil, dass die Zellen oft nur schwer in einem klinisch relevanten Zeitraum ohne dass die Zellviabilität abnimmt in der gewünschten Position überleben. Wie bereits in Kapitel 1.3.2.2 beschrieben werden deshalb bei schwerwiegenderen Verletzungen oft 3D-Gerüste eingesetzt. Zellbeladene Trägermatrizes können durch die nachfolgend beschriebenen Fertigungsverfahren hergestellt werden, so dass ein komplexes System aus Biomaterial und Zellen entwickelt werden kann. Dies kann zudem mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen und/oder Antibiotika beladen werden.

1.3.3.1 Additive Fertigungsverfahren zur Herstellung von 3D-Gerüsten

Für die Herstellung von porösen 3D-Gerüsten werden immer noch traditionelle Fabrikationstechniken, wie z.B. Gefriertrocknung oder *Salt leaching* (Auslaugen von Salz), eingesetzt.^{404, 405} Der Vorteil dieser Verfahren sind die einfache Herstellungsweise und die geringen Kosten. Allerdings kann die Porengröße und Porosität nur schwer kontrolliert werden, so dass sie kaum an die Anforderungen der Zellen und das Freisetzungprofil von Wirkstoffen angepasst werden können.⁴⁰⁶ Ein weiterer Nachteil ist, dass während der Herstellung aufgrund der Lösungsmittel, langen Fertigungszeiten und rauen Bedingungen keine lebenden Zellen oder Wachstumsfaktoren hinzugegeben werden können.⁴⁰⁶ Deshalb werden immer häufiger additive Fertigungsverfahren für die Herstellung von 3D-Gerüsten verwendet. Mit Hilfe von Stereolithographie (SLA), *Fused Deposition Modeling* (FDM), selektives Lasersintern (SLS) und 3D-Druck (3DP) können Gerüste mit erhöhter Auflösung und Reproduzierbarkeit hergestellt werden, die im Anschluss mit Zellen besiedelt werden können (Abb. 5 a).^{405, 407} Mit Hilfe dieser Techniken werden die 3D-Gerüste Schicht für Schicht durch ein automatisiertes Verfahren hergestellt, so dass komplexe und heterogene Strukturen entstehen. Durch die additiven Fertigungsverfahren kann die Integration mit medizinischen Bildsystemen erfolgen und die Gerüsteigenschaften können besser kontrolliert werden. Bei der Stereolithographie können komplexe 3D-Gerüste beispielsweise durch die Verarbeitung von Hydrogelen hergestellt werden. Mit Hilfe von Licht kann eine meist radikale Polymerisation räumlich begrenzt induziert werden, um definierte Strukturen zu erstellen. Durch diese Methode können Gerüste im Zentimeterbereich hergestellt werden. Der größte Nachteil dieser licht-induzierten Technologie ist die begrenzte Anzahl an prozesskompatiblen Materialien. Wenn die Hydrogele zudem mit Zellen beladen werden, darf der Photoinitiator

nicht zytotoxisch sein.^{408, 409} Als alternative Fertigungsmethode gilt FDM. Mit Hilfe dieser können 3D-Gerüste aus thermoplastischen Materialien mit einer Auflösung von 200-400 µm hergestellt werden.⁴¹⁰ Mittels hoher Temperaturen wird zunächst das Material geschmolzen und im Anschluss entstehen die 3D-Gerüste durch ein kontrolliertes Aushärten des Thermoplasts. Die Wahl der Methode hängt zum einen von dem zu druckenden Material und zum anderen von der daraus resultierenden Struktur (Größe, Auflösung, Architektur) ab.

Intini et al. entwickelte 3D-Gerüste auf Chitosanbasis, die eine verbesserte diabetische Wundheilung in Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen zeigten.⁴¹¹ Nach wie vor bleibt allerdings die Versorgung des Wundbetts mit Nährstoffen und Sauerstoff eine große Herausforderung in der Behandlung von Wunden. Deshalb konzentrieren sich viele Forschungsarbeiten darauf, eine Lösung für dieses Problem zu finden, indem sie beispielsweise sauerstofffreisetzende Materialien in ihrem gedruckten Gerüst einbinden. Touri et al. entwickelte ein 3D-gedrucktes Calciumphosphatgerüst mit Calciumperoxid als Sauerstofffreisetzer in einer PCL Matrix.³⁴⁷ Es konnte demonstriert werden, dass die 3D-gedruckten sauerstofffreisetzenden Gerüste Hypoxie linderten, die Sauerstoffverfügbarkeit aufrechterhalten konnten und sogar die Zellproliferation der ausgesäten Zellen gewährleisten konnten, während die Hypoxie-induzierte Apoptose reduziert wurde.³⁴⁷

Große Nachteile der oben beschriebenen additiven Fertigungsverfahren bestehen in Bezug auf die inhomogene Aussaat von Zellen, unzureichende Vaskularisierung und das heterogene Gewebewachstum, denn die Zellen werden erst nach dem Herstellungsprozess der Gerüste auf diese ausgesiedelt.⁴¹²

Zellbeladene 3D-Gerüste, also die gleichzeitige Verarbeitung von Biomaterialien und Zellen, scheint eine vielversprechende Alternative darzustellen (Abb. 5 b).⁴¹³⁻⁴¹⁸ Dieses Verfahren wird als Biofabrikation bzw. *Bioprinting* bezeichnet bei dem mittels Computer-Aided-Design (CAD) 3D-Gerüste mit hoher Auflösung und Reproduzierbarkeit gefertigt werden können.⁴¹³ Im Allgemeinen umfasst *Bioprinting* die folgenden drei Schritte: 1) das Sammeln genauer Informationen über das Gewebe und die Wunde und die richtige Materialauswahl; 2) das Übertragen der Informationen in das Computerprogramm um den 3D-Drucker zu steuern; 3) der eigentliche 3D-Druck, um stabile Strukturen zu erstellen. Mittlerweile gibt es vier Formen von Biodruck Technologien: Tintenstrahldruck, lasergestütztes 3D-*Bioprinting*, Dispensdruck und dynamische optische Projektions-Stereolithographie (DOPsL).^{410, 413, 419-421} Details über die

einzelnen Technologien sind in Jungst et al. und He et al. gut beschrieben.^{410, 422} Die Viabilität der Zellen kann durch mehrere Faktoren, einschließlich der verwendeten Bioprinting-Technik, die Druckgeschwindigkeit und Druckzeit bestimmt werden.^{419-421, 423}

Wie bereits für die porösen zellfreien 3D-Gerüste und Hydrogele beschrieben, können ebenfalls eine Reihe von natürlichen (z.B. Kollagen, Hyluronsäure, Cellulose, Alginat, Seide und Fibrinogen) und synthetischen (z.B. PCL, PLGA) Polymeren für das *Bioprinting*-Verfahren eingesetzt werden.⁴¹⁹⁻⁴²³ Beim *Bioprinting* kann die Biotinte bestehend aus Biomaterial, suspendierten Zellen und biologisch aktiven Molekülen direkt in gewebeartige Strukturen überführt werden.^{406, 413, 424} Dadurch kann das Gerüst zum einen der natürlichen EZM (aus struktureller und biochemischer Sicht) nachempfunden werden und zum anderen an die Wunde des Patienten angepasst werden.^{412, 413} In Abb. 6 sind die wichtigsten Vor- und Nachteile des 3D-*Bioprintings* zusammengefasst.^{414, 422, 425}

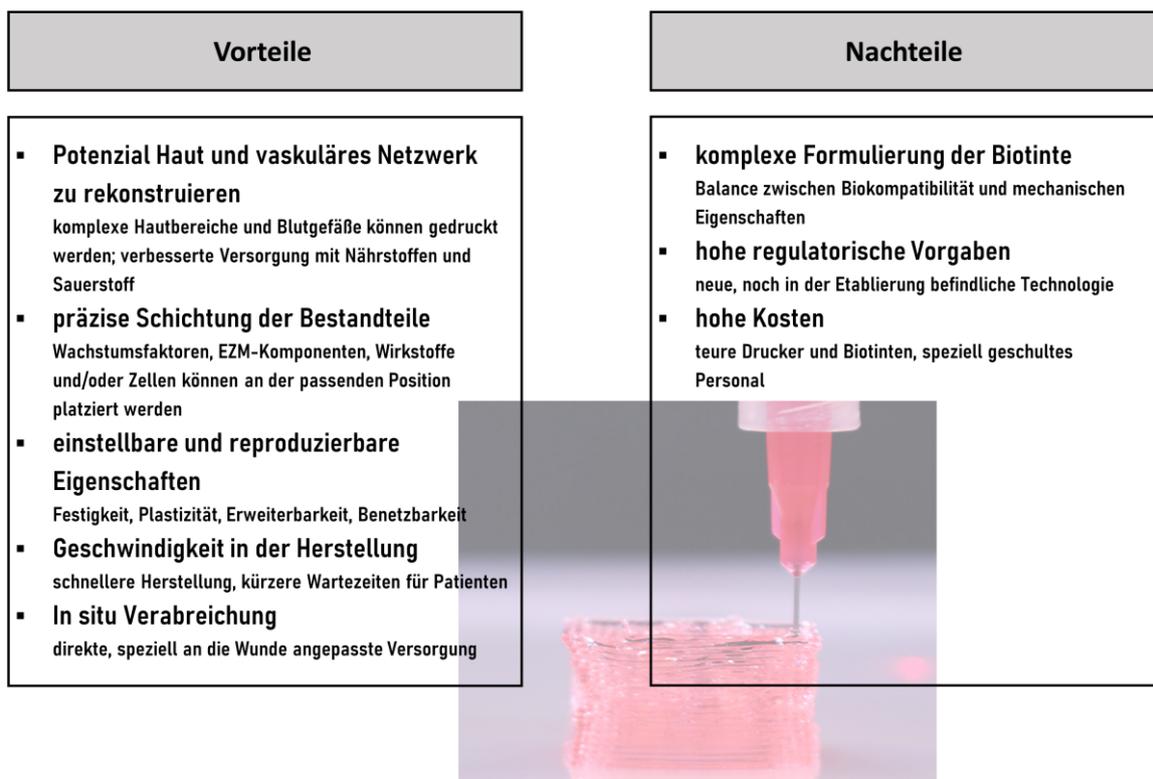


Abb. 6: Die wichtigsten Vor- und Nachteile der 3D-*Bioprinting* Technologie. Foto: Copyright 2022 von Advanced Solutions Life Sciences, LLC. Alle Rechte vorbehalten.

Die Technologie ermöglicht eine schnelle Herstellung von komplexen Konstrukten. Die notwendige Reifungszeit in Kultur kann dabei minimalisiert werden. Im Vergleich zu anderen Herstellungsverfahren für Wundauflagen ist das 3D-*Bioprinting* personalisierter und präziser, ist flexibel im Herstellungsprozess und bietet einen schnellen und reproduzierbaren Aufbau (Verkürzung der Patientenwartezeit) mit der Möglichkeit einer *in situ* Verabreichung.

Das *Bioprinting* Verfahren wurde bereits erfolgreich bei der Herstellung von zellbeladenen Gerüsten mit einem erhöhten Grad an Heterogenität eingesetzt, die im Anschluss den Zellen als Leitstruktur dienen und zu einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung führen.⁴²⁶ Ein weiterer Vorteil dieses schichtweisen Aufbaus des Gerüsts ist, dass die eine Schicht aus Biomaterial 1 und Zelltyp A und die darauffolgende Schicht aus Biomaterial 2 und Zelltyp B bestehen kann. So können verschiedene Zelltypen verwendet werden, die zum einen wichtig für den Wundheilungsprozess sind und zum anderen sich gegenseitig unterstützen in dem beispielsweise Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden (Abb. 5 b). Mit Hilfe dieser Technologie kann die 3D-Struktur der Haut, die aus mehreren 2D-Schichten wie subkutanem Gewebe, Dermis und Epidermis besteht, die wiederum verschiedene Zelltypen beheimaten, bestmöglich nachempfunden werden (Aufbau der Haut siehe Abb. 1). *In vitro* Studien zeigten, dass Maus NIH3T3 Swiss Albino Fibroblasten und menschliche immortalisierte HaCaT Keratinozyten verwendet wurden, um 3D-Hautkonstrukte zu drucken.^{420, 427} Da das Keratinozytenwachstum durch Wachstumsfaktoren unterstützt wird, die von NIH3T3 Fibroblasten ausgeschüttet werden, werden sie üblicherweise co-kultiviert.⁴²⁸⁻⁴³⁰ Kollagen Typ I aus einem Rattenschwanz wurde als Hydrogel, in dem die Zellen während des Druckprozesses eingebettet waren und das im Anschluss als EZM diente, verwendet.^{420, 431, 432} So konnten 20 Schichten mit Fibroblasten und 20 Schichten mit Keratinozyten durch einen laserunterstützten Bioprinter auf einem Matriderm® (dezellularisierte dermale Matrix) gedruckt werden, um eine einfache 3D-Hautäquivalente bestehend aus einer dermalen und epidermalen Struktur zu generieren.⁴²⁰ Es konnte eine erfolgreiche Kultivierung der Zelllinien über 10 Tage mit dem Fluoreszenzmikroskop bestätigt werden. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe eines Extrusionsdruckers zwar ebenfalls 3D-Gerüste, die Dermis- und Epidermisstrukturen erzeugen, hergestellt werden konnten, allerdings zeigten sie keine Gewebebildung oder Etablierung interzellulärer Verbindungen.^{431, 433} Neben *in vitro* Studien gibt es auch *in situ* Arbeiten, die zeigen, dass *Bioprinting* für die Behandlung von

Wunden eingesetzt werden kann. Binder et al. konnte die Machbarkeit von *in situ Bioprinting* auf dem Rückendefekt von athymischen Mäusen mit Hilfe des Tintenstrahldruckverfahrens demonstrieren.⁴³⁴ Dabei wurden Fibroblasten und Kreationzyten jeweils in einem Fibrinogen/Kollagen-Hydrogel-Vorläufer gebettet, bevor die Biotinte direkt auf den Hautdefekt (3,0 x 2,5 cm) gedruckt wurde. Die Studie zeigt, dass die gedruckten Konstrukte mit den beiden unterschiedlichen Hautzelltypen die Mäusehaut nachahmen konnten. In einer weiteren *in situ* Studie wurden aus dem Fruchtwasser gewonnenen Stammzellen (AFSCs) und MSCs direkt in eine Vollhautwunde (2,0 x 2,0 cm) von nu/nu Mäusen mittels *Bioprinting* gedruckt.⁴³⁵ Zuvor wurden die Zelllinien in einem Fibrin/Kollagen-Hydrogel suspendiert und im Wechsel mit einer Thrombinschicht, die als Quervernetzer dient, gedruckt. Obwohl die AFSCs nur über einen bestimmten Zeitraum in der Wunde existierten, war der Wundverschluss und die Reepithelisierung vermutlich durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren durch die MSCs verbessert.

1.3.3.2 Biotinten für die Wundheilung

Zellen in Kombination mit druckbaren Biomaterialien werden in der Biofabrikation als Biotinten bezeichnet. Oft stellen Biotinten den limitierenden Faktor im Bioprinting-Prozess dar, weil die Anforderungen an die gewählten Materialien sehr hoch sind. Neben der Druckbarkeit und Biokompatibilität muss das gedruckte 3D-Gerüst eine hohe mechanische Stabilität aufweisen.⁴³⁶ Zum einen muss das Gerüst selbst formstabil sein und zum anderen hat die Stabilität einen entscheidenden Einfluss auf die Zellviabilität, -migration und -proliferation. Es muss eine uneingeschränkte Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet sein, während durch die physikochemischen Eigenschaften des Biomaterials die Abbaubarkeit gesteuert werden kann. Die Zellverteilung kann sowohl durch die rheologischen Eigenschaften des gedruckten Materials als auch die Drucktechnologie gesteuert werden.^{410, 436, 437} Wenn die Biomaterialien nicht selbstassemblieren, müssen entweder physikalische oder chemische Quervernetzer eingesetzt werden, um formstabile 3D-Gerüste zu erhalten. Die physikalische Quervernetzung ist zwar oft zellfreundlicher, allerdings werden oft nur schwache Netzwerke ausgebildet und der anschließende Abbau des Gerüsts erfolgt unkontrolliert.^{410, 437} Deshalb werden oft chemische Quervernetzer (z.B. Glutaraldehyd) eingesetzt, die allerdings häufig eine toxische Wirkung auf die immobilisierten Zellen haben.

Die aufgrund der Fertigungsverfahren wichtigen physikochemischen Eigenschaften stehen oft im Konflikt mit den physiologischen. Das gedruckte Material muss nicht nur die Zellmigration, -proliferation und -differenzierung zulassen, sondern sogar fördern.⁴³⁸ Deshalb kommen oft Komponenten der extrazellulären Matrix oder Biopolymere, die ähnliche makromolekulare Eigenschaften zu der natürlichen EZM aufweisen, als Biotinten zum Einsatz.

Wenn das Biomaterial nicht direkt gedruckt werden kann, können auch Stützgerüste aus beispielsweise Pluronic oder anderen synthetischen Polymeren mittels 3D-Drucker hergestellt werden, die im Anschluss als Gussform verwendet werden. Als alternatives Verfahren können zwei oder mehr Materialien gemischt werden, so dass Material A die mechanische Stabilität bietet, während Material B für die Biokompatibilität sorgt. Dies ist eine vielversprechende Alternative um aus beispielsweise schwerer druckbaren natürlichen Biomaterialien präzise 3D-Strukturen herzustellen.

In den letzten Jahren war die Kombination von *Bioprinting* und Stammzelforschung ein intensiv untersuchtes Feld. Stammzellen, wie MSCs, embryonale Stammzellen (ESCs) und ASCs können direkt mit Biomaterialien kombiniert und gedruckt werden und so für die Hautregeneration eingesetzt werden.⁴³⁹⁻⁴⁴² Aufgrund der Fähigkeiten der Stammzellen sich zu differenzieren und sich selbst zu erneuern, können mit Hilfe von epidermalen Stammzellen untergeordnete Strukturen wie Haarfollikel oder Schweißdrüsen gebildet werden. Außerdem können Stammzellen verwendet werden, um Zellen zu etablieren und im Hautgewebe das Gefäßnetzwerk zu regenerieren. Deshalb haben Stammzellen die potenzielle Fähigkeit das 3D-gedruckte Gerüst strukturell und funktional als Hautersatz zu integrieren. Es konnte demonstriert werden, dass die Überlebensrate von Stammzellen vor und nach dem Bioprinting bei 97% bzw. 94% lag, was die Effektivität dieser Technik als mögliche Anwendung zur Wundheilung zeigt.⁴⁴³⁻⁴⁴⁵

1.4 Zielsetzung

Die Behandlung von Wunden, insbesondere chronischen Wunden, ist eine der wichtigsten therapeutischen und wirtschaftlichen Herausforderungen für die Gesundheitsversorgung. Das Verständnis und das Überwinden von spezifischen Faktoren bzw. Variablen, die dazu beitragen den Heilungsprozess zu verzögern oder zu stören, sind entscheidende Komponenten für einen umfassenden Ansatz der Wundversorgung. Dabei muss nach einem umfangreichen Diagnoseverfahren eine patientenspezifische Wundbehandlungsstrategie mit neuartigen therapeutischen Ansätzen, wie zum Beispiel 3D-Wundauflagen, entwickelt werden. Derzeit gibt es auf dem Markt noch keine ideale Wundaufgabe, die universell an alle Wundtypen angepasst werden kann und die Heilung dabei beschleunigt. Bei dem Wundmanagement sollte eine Optimierung der Wundaufgaben durch das Design der Auflage und die Materialauswahl erreicht werden. In dieser Arbeit sollte ein 3D-Gerüst designed werden, das an die Bedürfnisse des Patienten angepasst werden kann, die Angiogenese fördert und somit der Wundheilungsprozess beschleunigt werden kann. Deshalb sollte ein 3D-Druckverfahren etabliert werden, das die Herstellung von biokompatiblen 3D-Gerüsten erlaubt. Das Biomaterial ist oft der limitierende Faktor beim 3D-Drucken, da es zum einen physikochemische und zum anderen physiologische Eigenschaften aufweisen muss. Kollagen Typ I, der Hauptbestandteil der EZM, fördert die natürliche Wundheilung in allen Wundheilungsphasen. Es unterstützt die Bildung der komplexen Struktur der EZM und fördert die Angiogenese und Reepithelisierung. Allerdings weist Kollagen nicht die benötigten mechanischen Eigenschaften (z.B. scherverdünnende Eigenschaften) auf, so dass es nur schwer alleine gedruckt werden kann. Pluronic hingegen wird bereits seit vielen Jahren aufgrund seiner Formstabilität im 3D-Druckverfahren eingesetzt. Deshalb sollte in dieser Arbeit zunächst eine gedruckte Stützstruktur aus Pluronic mit Hilfe eines Computergesteuerten Programmes entwickelt werden, um anschließend 3D-Kollagengerüste mittels Gussverfahren herzustellen. Zellen können aufgrund der hohen Biokompatibilität von Kollagen direkt mit diesem kombiniert werden und da Stammzellen die Fähigkeit haben sich zu differenzieren und die Angiogenese zu fördern, sollten diese mit Kollagen kombiniert werden. Zudem zeigten sie bereits hohe Überlebensraten nach der Immobilisierung in 3D-gedruckten Biomaterialien. Zunächst sollte mittels 2D-Proliferationstest die Co-Kultivierung von HUVECs und ASCs analysiert werden. Anschließend sollten mit dem oben beschriebenen

Fertigungsverfahren Kollagengerüste in Kombination mit der Co-Kultur hergestellt werden, da ASCs durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren die Zellproliferation von HUVECs beeinflussen können. Mittels Fluoreszenzmikroskopie sollte die Biokompatibilität der zellbeladenen 3D-Gerüste als Trägermatrix untersucht werden. Die Charakterisierung der Kollagengerüste, insbesondere die Struktur der Kollagenfasern und deren Biomechanik, sollten mittels Rasterlektronenmikroskopie und Rasterkraftelektronenmikroskopie analysiert werden. Das möglicherweise erhöhte angiogene Potenzial durch die Co-Kultivierung von HUVECs und ASCs im 3D-Kollagengerüst sollte schließlich *in vitro* mit Hilfe eines Angiogenese Arrays und Tube Formation Assays demonstriert werden. In einem weiteren Projekt sollte AAM mittels Dispensdruckverfahrens in eine 3D-Struktur überführt werden. Da AAM aufgrund der unzureichenden mechanischen Eigenschaften nicht alleine druckbar ist, sollte zunächst eine Biotinte (ohne Zellen) entwickelt werden. Das 3D-Gerüst könnte im Anschluss ebenfalls als Leitstruktur für Zellen in der Behandlung von Wunden dienen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tab. 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Leneva® Allograft Adipose Matrix (AAM)	MTF Biologics (Edison, USA)
AIM V™ serumfreies Medium	Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
Antibiotische/antimykotische Lösung (ab/am)	Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund, Deutschland)
Basales <i>Endothelial Cell Growth Medium 2</i>	PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i> (DMEM)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland) ist jetzt PAN- Biotech (Aidenbach, Deutschland)
<i>Endothelial Cell Growth Medium 2</i> (ECGM 2)	PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Flüssigstickstoff	Linde Gas Deutschland (Pullach, Deutschland)
Gold target	Micro to Nano, ET Haarlem, Niederlande
Kollagen Typ I (L 7213)	Merck Millipore (Burlington MA, USA)
Matrigel	BD Biosciences (Franklin Lakes NJ, USA)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Pluronic F127	Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA)
Polymilchsäure (PLA)	Ultimaker (Utrecht, Niederlande)
Resazurin Alamar Blue	Promega Corporation (Madison WI, USA)
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen, Deutschland)

Chemikalie	Hersteller
Trypanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten)
Trypsin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland) ist jetzt PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)

Anorganische Salze, Säuren und Basen sowie organische Lösungsmittel wurden von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und hatten, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad p.a.. Für die Herstellung von Puffern wurde, soweit nicht anders angegeben, zweifach destilliertes oder ultrareines Wasser aus einer Milli-Q-Anlage von Merck Millipore (Burlington MA, USA) verwendet.

2.1.2 Geräte und Zubehör

Tab. 4: Geräte und Zubehör

Gerät	Modell	Hersteller
Analysenwaage	ABJ	Kern (Balingen-Frommern, Deutschland)
3D Drucker	Ultimaker 3	Ultimaker (Utrecht, Niederlande)
3D Bioplotter	3DDiscovery	regenHU (Villaz-Saint-Pierre, Schweiz)
Brutschrank	Heracell 150	Thermo Fischer (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
Casy TT Counter	TT	Omni Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axio Observer Z1	Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Inverses optisches Mikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)

Gerät	Modell	Hersteller
Kryostat	Leica CM 1950	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Lichtmikroskop	Zeiss Axiovert 25	Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Magnetrührer mit Heizplatte	RH-basic2	IKA (Staufen, Deutschland)
pH-Meter	Inolab pH 720	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipetten	Research 0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
<i>Microplate Reader</i>	Mithras LB 940	Berthold Technologies (Sprendlingen, Deutschland)
Rasterelektronenmikroskop	JSM 6390	JEOL Ltd. (Akishima Japan)
Rasterkraftmikroskop	NanoWizard I	JPK Instruments (Berlin, Deutschland)
Reinstwasseranlage	Millipore Q-Pod mit 0,22 µm Filter, Millipak®	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Siliziumnitrid-Cantilever	MLCT	Bruker GmbH (Mannheim, Deutschland)
Sputter-Gerät	BAL-TEC SCD 005	BalTec AG (Pfefficon, Schweiz)
Sterilwerkbank Klasse II	BDK-SK	BDK (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Tischzentrifuge	Eppendorf 54152 oder Rotanda 6460R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) oder Hettich (Tuttlingen, Germany)
Vakuum-Planetenzentrifugalmischer	ARV-310P	THINKY U.S.A., Inc. (Laguna Hills, USA)
Vortexer	Genius 3	IKA (Staufen, Deutschland)
Wasserbad	EH4 basic	IKA (Staufen, Deutschland)

2.1.3 Sonstige Materialien

Tab. 5: Sonstige Materialien

Material	Hersteller
6-, 12-, 24-, 96-Well-Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
Angiogenese-Objektträger	ibidi GmbH (Gräfelfing, Deutschland)
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Petri-Schalen	Greiner Bio One (Frickenhausen, Germany)
Spritzen Nordson EFD	Nordson Corporation (Westlake, USA)
<i>Transwell</i> für 24-Well-Platte (0,4 µm)	Corning Inc. (Corning, USA)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio One (Frickenhausen, Germany)

Alle sonstigen Verbrauchsmaterialien wurden über die Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1.4 Medien, Puffer, Lösungen und Kits

Tab. 6: Medien, Puffer, Lösungen und Kits

Material	Hersteller
Human Thrombospondin-1 DuoSet ELISA	R&D Systems Inc. (Minneapolis MN, USA)
Mitotracker Green FM	Life Technologies (Carlsbad CA, USA)
Mitotracker Red CMXRos	Life Technologies (Carlsbad CA, USA)
Proteom-Profiler-Human- Angiogenese-Array-Kit	R&D Systems Inc. (Minneapolis MN, USA)

2.1.5 Zelllinien

Tab. 7: Zelllinien

Name	Herkunft	ATCC Nr.	Hersteller
Humane adipose Stromazellen (ASCs)	Isoliert aus adulten Lipoaspiraten	PT-5006	Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland
Humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs)	Isoliert aus Nabelschnurvenen	C-12203	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland

2.1.6 Software

Tab. 8: Software

Software	Hersteller
Axiovision	Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
JPK-Datenanalyse Software	JPK BioAFM - Bruker Nano GmbH (Berlin, Deutschland)
Endnote V 7.3.1	Thomson Reuters Corp. (New York City NY, USA)
IGOR Pro 8.03	WaveMetrics, Inc. (Portland OR, USA)
Image Lab 6.0	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules CA, USA)
MATLAB Version R2018a	MathWorks, Inc. (Natick MA, USA)
Microsoft Office 2016	Microsoft Corp. (Redmond WA, USA)
Smile Shot™	JEOL Ltd. (Akishima Japan)
Servier Medical Art	Les Laboratoires Servier S.A.S (Suresnes, Frankreich)
SolidWorks (CAD)	Dassault Systèmes Solidworks SE (Vélizy-Villacoublay, Frankreich)
Wimasis	Onimagin Technologies SCA (Córdoba, Spanien)

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkultur

In dieser Arbeit wurden ASCs verwendet, da sie Wachstumsfaktoren abgeben und so das Wachstum, die Migration und Proliferation von HUVECs positiv beeinflussen können. HUVECs haben einen entscheidenden Einfluss auf die Angiogenese und die damit verbundene Nähr- und Sauerstoffzufuhr in das betroffene Gewebe und sind somit essentiell für die Geweberegeneration. Die ASCs wurden aus normalen (nicht diabetischen) adulten Lipoaspiraten isoliert, die während eines Fettabsaugungsverfahrens gewonnen wurden. Sie haben das Potenzial sich in chondrogene, osteogene, adipogene sowie neurale Zellen zu differenzieren. Bei der Primärpassage wurden die ASCs kryokonserviert. Die HUVECs wurden aus der Nabelschnurvene isoliert und werden für physiologische und pharmakologische Analysen wie Angiogenese, Blutgerinnung und Fibrinolyse verwendet. Die Zellen werden entweder von Einzelspendern oder von gepoolten Spendern (aus bis zu vier verschiedenen Nabelschnüren) geliefert.

Die ASCs wurden in *StemMACS™ MSC Expansion Medium* (StemMACS) und die HUVECs in *Endothelial Cell Growth Medium 2* (ECGM2) kultiviert. Beide Zellkulturmedien wurden zuvor mit 1 % (v/v) antibiotischer/antimykotischer (ab/am) Lösung versetzt, um eine Kontamination durch Mikroorganismen zu vermeiden. Die Zellen wurden in einer kontrollierten Atmosphäre von 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Für die Zellkultivierung wurden die eingefrorenen Zelllinien (dies gilt für alle genutzten Zelllinien), die in flüssigem Stickstoff in Kryoröhrchen gelagert wurden, zunächst im Wasserbad bei 37 °C zügig erwärmt. Schnellstmöglich wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen mit 9 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt. Das im Kryomedium vorhandene zytotoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) muss entfernt werden, damit die Zellen nicht geschädigt werden. Deshalb wurden die Zellen im Anschluss mittels fünfminütiger Zentrifugation bei 340 x g und 20 °C pelletiert und in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Sowohl ASCs als auch HUVECs wachsen in adhärennten *Monolayern* in Kultur. Daher erfolgte während der Zellkultivierung das Passagieren der Zellen bei 80-90 % Konfluenz. Die adhärennten Zellen wurden zunächst mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) zweimal gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,05 % (v/v) Trypsin nach dreiminütiger Inkubation im Zellinkubator abgelöst. Die Zellen wurden

entweder in 5 ml StemMACS- oder ECGM2-Medium aufgenommen und 8 min bei 340 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml des jeweiligen Mediums resuspendiert und 1/3 verdünnt. Die Zellzahl sowie die Zellviabilität (>90 %) wurde mittels Casy TT Counter vor dem jeweiligen Experiment bestimmt, um die gewünschte initiale Zelldichte einzustellen.

2.2.2 2D-Proliferationstests

Um die Zellviabilität, das Zellverhalten sowie die Zellproliferation der HUVECs über mehrere Tage in Co-Kultivierung mit ASCs zu analysieren, wurde ein Zellproliferationstest mittels Resazurin Alamar Blue in einer 2D-Zellkulturplatte durchgeführt. Bei dem Test wird die Fluoreszenz von Resorufin, das durch die Reduktion von Resazurin durch die Zellen entsteht, analysiert (Abb. 7).

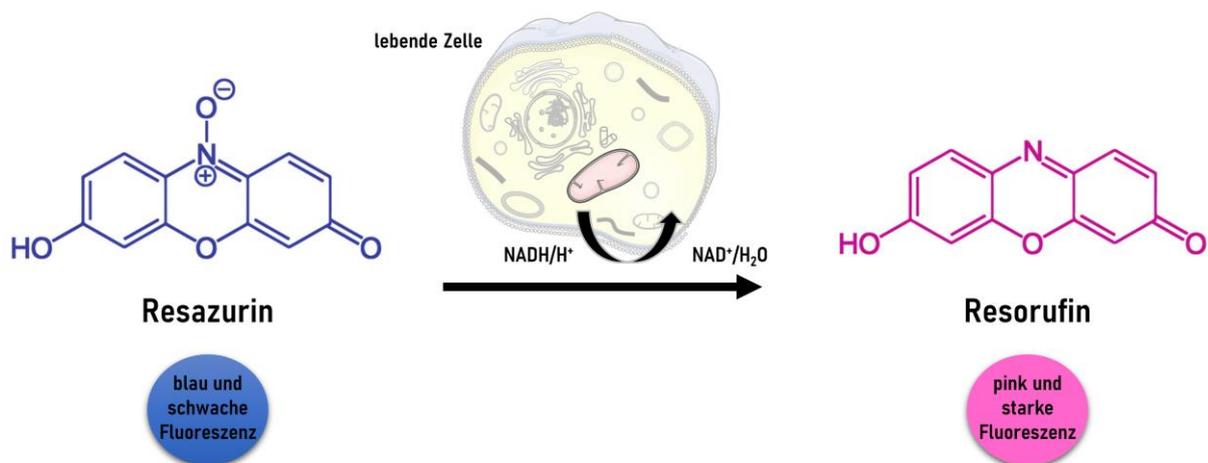


Abb. 7: Umsetzung von Resazurin zu Resorufin . Resazurin ist ein blauer Redox-Farbstoff, der bei Reduktion unter NADH in den Zellen irreversibel zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Resorufin umgesetzt wird.

Dabei wurden jeweils 10000 Zellen/cm² auf behandelte 24-Well-Platten ausgesät und für 19 Tage bei einer kontrollierten Atmosphäre von 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Bei der Co-Kultivierung wurden ASCs und HUVECs im Verhältnis 1:1 kultiviert und als Kontrolle dienten HUVECs alleine. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um die nicht-adhären und toten Zellen zu entfernen, und mit 10 % (v/v) Resazurin Alamar Blue in *Endothelial Cell Growth Medium 2* und dem Zusatz von 1 % (v/v) ab/am-Lösung für 2 Stunden unter kontrollierter Atmosphäre inkubiert. Die Zellproliferation

wurde durch die Messung der relativen Fluoreszenzintensität von Resorufin (λ_{ex} 530 nm; λ_{em} 590 nm) unter Verwendung eines *Microplate Readers* quantifiziert.

2.2.3 Herstellung von zellbeladenen 3D-Kollagengerüsten mittels *Computer-aided design* (CAD) und 3D-Druckverfahren

Kollagen, als Bestandteil der extrazellulären Matrix, induziert Zellen wie beispielsweise Fibroblasten und Keratinozyten sich in der Wunde anzusiedeln, fördert die Ablagerung von neuem Kollagen und stimuliert die Angiogenese des Gewebes, was den kritischen Schritt in der Wundheilung und Geweberegeneration darstellt. In dieser Arbeit wurden 3D-gedruckte Halterungen in Zusammenarbeit mit dem Center for Applied Tissue Engineering and Regenerative Medicine (CANTER), Hochschule München entworfen, um zum ersten Mal auf diese Weise Kollagen Typ-I Gerüste herzustellen. Die Grundplatte und die Halterung zur Fixierung des dreidimensionalen Kollagengerüsts sowie die Gießform zum Eingießen des zellbeladenen Kollagenhydrogels wurden in dem *Computer-aided design* (CAD) SolidWorks entworfen. Die Abmessungen der Grundplatte und der Halterung sowie der anpassbaren gegossenen Kollagenplatten sind in Abb. 8 dargestellt.

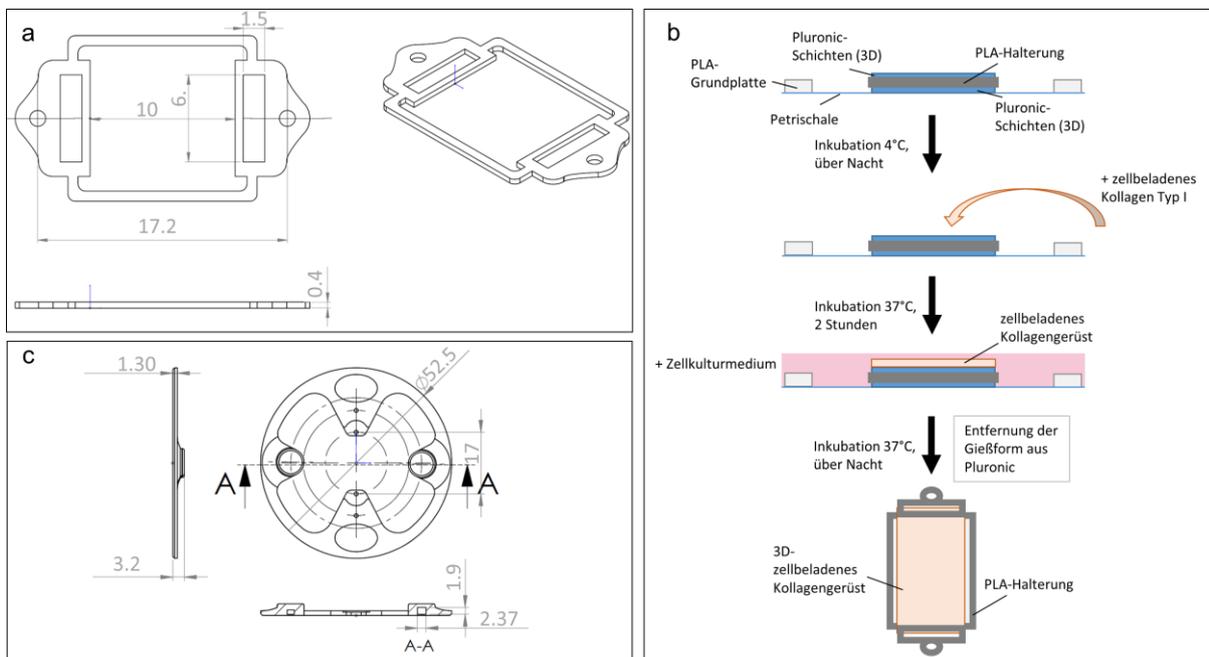


Abb. 8: Design der 3D-Kollagengerüste . a) Design der Halterung des Kollagengerüsts, das aus PLA gedruckt wurde (Maße in mm); b) Schematischer Herstellungsprozess der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste. Das 3D gedruckte Pluronic dient als Gießform. Kollagen Typ I wird zuvor mit ASCs und HUVECs gemischt und anschließend in die

Material und Methoden

Pluronicform gegossen. Nach der Inkubation für die Gelbildung von Kollagen kann das Pluronic mittels Zellkulturmedium entfernt werden; c) Grundplatte aus PLA zur Fixierung der Position der Halterung während der Kultivierung und Bebilderung (Maße in mm).

Durch die Flexibilität des Druckverfahrens lässt sich das Design des Gerüsts aus Kollagen und Zellen individuell an die Wunde des Patienten anpassen. Die Grundplatte bzw. Stützstruktur wurde unter Verwendung eines 3D-Druckers (0,25 mm Düsendurchmesser, 0,1 mm Schichtdicke, 100 % Füllichte und 9 mm/s Druckgeschwindigkeit) mittels eines Polymilchsäure (PLA) Thermoplast-Filaments hergestellt. Zunächst wurde die Grundplatte in eine 35 mm Petrischale mit Magneten zur Justierung platziert. Im Anschluss wurden die ersten Schichten Pluronic F127 (0,33 mg/ml) auf einer maßgeschneiderten Mehrzweck-Bioprinting Plattform direkt in die Petrischale in der Mitte der Grundplatte mittels 3D-Drucker gedruckt. Die PLA-Halterung für das Kollagengerüst wurde in die Mitte der Grundplatte auf die Pluronicsschichten eingesetzt und weitere Pluronicsschichten wurden auf die Halterung gedruckt. Die gesamte Gießform wurde über Nacht bei 4 °C gelagert. Für die 3D-Zellkulturexperimente mit Kollagen Typ I wurde dieses nach dem Protokoll des Herstellers vorbereitet, bevor 115 µl Kollagen Typ I Lösung mit 20000 Zellen (HUVECs) gemischt wurde. Für die Co-Kultivierung wurden jeweils 10000 ASCs und 10000 HUVECs mit der Kollagen Typ I Lösung versetzt. Die zellbeladenen Kollagengerüste wurden auf die vorbereitete Pluronicform gegossen und anschließend bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Bei kürzeren Inkubationszeiten wiesen die Kollagengerüste Risse auf, da die Fibrillogenese noch nicht abgeschlossen war. Um das Pluronic, was ausschließlich als Gießform diente, zu entfernen, wurde die gesamte Form mit *Endothelial Cell Growth Medium 2* und 1 % (v/v) antibiotische/antimykotischer Lösung über Nacht bei 37 °C versetzt. Das aufgelöste Pluronic wurde zusammen mit dem Medium entfernt und 8 ml frisches Zellkulturmedium wurde zu den Kollagengerüsten hinzugegeben. Das Zellkulturmedium wurde nur nach dem Farbwechsel des Mediums (Indikator für den Verbrauch der Nährstoffe) und in Kombination mit der Probenentnahme des Zellkulturüberstandes gewechselt, um eine mögliche Schädigung des Kollagengerüsts zu vermeiden. Für die weiteren Analysen (Angiogenese Array, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Tube Formation Assay*) wurden die Überstände alle 5-6 Tage über einen Zeitraum von 19 Tagen gesammelt und bei -80 °C gelagert. Je nach Größe und Form der

Grundplatte und Halterung des Kollagengerüsts können individuelle Kollagengerüste hergestellt werden.

2.2.4 Herstellung von 3D-gedruckten Gerüsten aus Allograft Adipose Matrix und Pluronic

AAM wird aus menschlichem Fettgewebe zur Geweberekonstruktion gewonnen.⁴⁴⁶ Das injizierbare AAM setzt sich aus den Bestandteilen der extrazellulären Matrix zusammen und wird überwiegend, aber nicht ausschließlich, für die Behandlung von Weichgeweben, vor allem chronischen Wunden, und zur Rekonstruktion von Fettpolstern verwendet. Die natürlich abgeleiteten endogenen Komponenten wie Matrixproteine, Wachstumsfaktoren und Zytokine sind für die Angiogenese und Adipogenese von entscheidender Bedeutung. AAM dient als Gerüst für die Infiltration der patienteneigenen Zellen, um Wunden zu schließen und den Heilungsprozess zu beschleunigen.

In dieser Arbeit wurde zusammen mit dem Center for Tissue Engineering der University of California, Irvine eine Methode entwickelt, um 3D-Gerüste aus AAM als Füllmaterial für Wunden zu drucken (

Abb. 20 a). Für die Herstellung der Biotinte wurde zunächst eine Lösung mit 29 % (w/v) AAM mit ultrareinem Wasser bei 2000 rpm für 1 min im Vakuum-Planetenzentrifugalmischer hergestellt. Parallel wurde eine Lösung mit 25 % (w/v) Pluronic bei 2000 rpm für 10 min im Planetenmischer produziert. Beide Lösungen wurden im Anschluss bei 2000 rpm für 5 min in einem Verhältnis von 25 % (v/v) AAM und 75 % (v/v) Pluronic vermischt und entschäumt.

Die 3D-Gerüste wurden mittels Dispensdruckverfahrens unter der Verwendung eines Bioplotters gedruckt. Der Druckkopf (CF-300N/H) bewegte sich in x-y-Richtung, während die Kollektorplatte in z-Richtung betrieben wurde. Die zuvor hergestellte Biotinte aus AAM und Pluronic wurde in eine 3 ml Spritze überführt. Das präzise Drucken erfolgte mittels elektromagnetischem Ventil, das im Inneren der Düse positioniert war. Der Durchmesser des Druckkopfes betrug 0,5 mm, die Distanz zwischen Druckkopf und Kollektorplatte lag bei 900 µm, die Ventilöffnungszeit betrug 700-900 ms, der eingestellte Druck lag bei 0,7-0,8 bar und der Druckkopf wurde bei 20 mm/min betrieben. Die gedruckten Gerüste wurden im Anschluss makroskopisch analysiert (Abb. 20).

2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste

Um die lebenden HUVECs und ASCs, die in den 3D-Kollagengerüsten co-kultiviert wurden, zu visualisieren, wurden die Zellen 24 Stunden vor dem 3D Drucken der Zellen über Nacht mit einem Mitotracker-Kit angefärbt.⁴⁴⁷ Als Vergleich wurden HUVECs, die zuvor ebenfalls mittels Mitotracker angefärbt wurden, über 19 Tage in den gedruckten Kollagengerüsten inkubiert und analysiert. Dabei kann das Wachstum, sowie die Proliferation und Interaktion der beiden Zelllinien sowie von HUVECs alleine analysiert werden. Mit den fluoreszierenden Farbstoffen können die Mitochondrien der Zellen angefärbt und somit die lebenden Zellen sichtbar gemacht werden. HUVECs wurden mit Mitotracker Green FM, einem grün fluoreszierenden Farbstoff, der unabhängig vom mitochondrialen Membranpotenzial in den Mitochondrien lokalisiert ist, angefärbt. Der Farbstoff bindet dabei kovalent über reaktive Chlormethylgruppen an Thiolreste von Proteinen der inneren Mitochondrienmembran. Dafür wurde das Medium von den zuvor kultivierten HUVECs entfernt und die Zellen mit frischem Medium, das 200 nM Mitotracker Green FM (1 mM in DMSO gelöst) enthält, versetzt. Die Zellen wurden im Anschluss über Nacht bei 37 °C inkubiert bevor das Medium erneut gewechselt wurde. Die lebenden Zellen können 1-3 Wochen, abhängig von der Proliferationsrate und der Effizienz der Markierung mittels Fluoreszenzmikroskop (Anregung: 490 nm, Emission: 516 nm) visualisiert werden. ASCs wurden mit 500 nM Mitotracker Red CMXRos, einem rot fluoreszierenden Farbstoff, der die Mitochondrien in lebenden Zellen färbt und dessen Akkumulation vom Membranpotenzial abhängig ist, wie zuvor für Mitotracker Green FM beschrieben, gefärbt. Da der Farbstoff Membranpotenzial abhängig in Mitochondrien aufgenommen wird, werden nur Mitochondrien mit intaktem Membranpotenzial angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der 3D-Kollagengerüste mit den Zellen erfolgten nach 6 und 19 Tagen bei einer Anregung von 579 nm und einer Emission von 599 nm in Dreifachbestimmung.

2.2.6 Rasterelektronenmikroskopie der zellbeladenen 3D Kollagengerüste

Um den Einfluss beider Zelltypen (HUVECs und ASCs) auf die Anordnung der Kollagenfasern zu analysieren, wurden die Kollagengerüste, die entweder mit HUVECs alleine oder mit ASCs und HUVECs beladen waren, über 19 Tage inkubiert. Die Oberflächen der Kollagengerüste

sowie die Kollagenfasern an sich wurden nach 6 und 19 Tagen mittels Rasterelektronenmikroskops (REM) untersucht. Mit Hilfe eines REMs können Oberflächen, sowohl glatte als auch raue, morphologisch und analytisch untersucht werden. Dabei wird die Probe mit einem Elektronenstrahl rasterförmig abgescannt und von der Probe zurückgestreute bzw. emittierte Elektronen detektiert.

Die große Tiefenschärfe, das hohe Auflösungsvermögen und die hohen Vergrößerungen stellen große Vorteile gegenüber anderen mikroskopischen Methoden dar.^{448, 449} Die Proben müssen vor der Analyse fixiert, entwässert, getrocknet und zur Erhöhung des Kontrastes mit einer dünnen Schicht aus Edelmetallen leitfähig gemacht werden.⁴⁵⁰

Für die rasterelektronischen Aufnahmen der Kollagengerüste mit den Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 % (v/v) Glutaraldehyd bei 4 °C für 2 Tage fixiert. Durch Glutaraldehyd werden benachbarte Proteinmoleküle kovalent vernetzt.⁴⁵⁰

Im Anschluss wurden die Proben erneut mit PBS gewaschen und mittels Ethanolreihe (50 %, 70 %, 80 %, 99 % (v/v)) für jeweils 30 min pro Schritt entwässert. Das 99 %ige Ethanol verdampfte über Nacht und abschließend wurden die Proben mit Gold (BAL-TEC SCD 005) durch Vakuumverdampfung für 40 sec bei 40 mA, 8 nm leitfähig gemacht. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Rasterelektronenmikroskop JSM 6390 (Smile Shot™ Software) und wurden mit einer Hochspannung von 10 kV durchgeführt.

2.2.7 Probenvorbereitung für die Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Um die Struktur und Anordnung der Kollagengerüste sowie den Einfluss der Zellen auf die Umstrukturierung der Kollagenfasern zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Rasterkraftmikroskopische Analysen am CANTER durchgeführt.

Dafür wurden die Kollagengerüste mit den enthaltenen Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben 4 Stunden bei Raumtemperatur mit 1,85 % Paraformaldehyd, das 10 µl/ml Natriumhydroxid (NaOH) und 40 mg/ml Saccharose enthielt, fixiert. Danach wurden die Proben erneut dreimal mit PBS gewaschen und im Anschluss bei 4 °C in 30 % (w/w) Saccharose inkubiert. Nach weiteren 20 Stunden wurden die Proben in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound unter Verwendung von flüssigem Stickstoff eingefroren. Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound besteht aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen. Es dient als Einbettmedium beim Gefrierschneiden, zudem können Zellproben bei -80 °C Langzeit gelagert

werden. Für das Schneiden wurden die eingebetteten Kollagengerüste auf einem Probenhalter so platziert, dass die Gerüste parallel zur x-y-Ebene geschnitten werden konnten. Wie zuvor beschrieben wurde vor jedem Schnitt ein Klebeband auf die Proben geklebt und mit einem Kryostat 50 μm dicke Schnitte hergestellt.⁴⁵¹ Die Schnitte auf den Klebebändern wurden mit dem Blattschnitt nach oben auf gefrorene Objektträger gelegt, auf die zuvor doppelseitiges Klebeband aufgebracht worden waren. Die Schnitte wurden über Nacht bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Untersuchung mit dem Rasterkraftmikroskop gelagert.

2.2.8 AFM Messungen der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste

Die Rasterkraftmikroskopie basiert auf einer rasterförmigen Abtastung einer Probe mit einem sogenannten Cantilever, dessen topographiebedingte Auslenkung in ein mikroskopisches Bild umgesetzt wird. Unter Verwendung geeigneter Cantilever können damit nahezu atomare Auflösungen erreicht werden.

Die Schnitte der Kollagengerüste mit den eingebetteten Zellen wurden direkt vor den AFM-Messungen aufgetaut. Die Messungen erfolgten mit einem NanoWizard I. Unter Verwendung eines inversen optischen Mikroskops wurde der Siliziumnitrid-Cantilever mit einer Nennfederkonstante von $0,03\text{ N/m}$ und einer vierseitigen Pyramidenspitze mit einem Nennradius von 20 nm im interessierenden Bereich positioniert. Zunächst wurden Bilder unterschiedlicher Abmessungen mit der Kontaktmodus Bildgebung in Luft sowohl in der Nähe der anfänglichen Montageposition als auch in der Mitte der Kollagengerüste aufgenommen. Anschließend wurden den Schnitten ein Tröpfchen PBS zugesetzt und das Kollagengerüst etwa 10 min rehydratisiert. *Indentation-Type* AFM (IT-AFM) Messungen wurden im Anschluss in den Bereichen, in denen die Bilder zuvor aufgenommen wurden, jeweils innerhalb eines $30\text{ }\mu\text{m} \times 30\text{ }\mu\text{m}$ Rasters mit mindestens 32×32 Kraft-Abstands-Kurven durchgeführt. Für jedes Kollagengerüst, die die jeweiligen Zelltypen enthalten haben, wurden zwei verschiedene Schnitte (zwischen $50\text{ }\mu\text{m}$ und $200\text{ }\mu\text{m}$ Abstand) analysiert. Für die IT-AFM Messungen wurden die gleichen Cantilever wie für die AFM-Bildgebung verwendet. Als Kontrolle wurde die Empfindlichkeit des optischen Hebels sowie die tatsächliche Federkonstante jedes Cantilevers nach jedem IT-AFM Experiment in dreifacher Ausfertigung mit der Methode des thermischen Rauschens in PBS und auf einer sauberen Glasoberfläche bestimmt.⁴⁵²

2.2.9 Rasterkraftmikroskopische Datenanalyse

Für die Datenanalyse der AFM-Bilder wurde die JPK-Datenanalyse Software verwendet. Die Steifigkeit (Young-Modul) der Kollagengerüste wurde an jeder gemessenen Eindruckposition mit einer im Labor erstellten MATLAB-Anwendung unter Verwendung der individuell aufgezeichneten optischen Hebelempfindlichkeit und der Federkonstante des Cantilevers bestimmt. Mittels MATLAB wurde automatisch Offset und Neigung der Basislinie korrigiert und der Kontaktpunkt jeder IT-AFM Kraftkurve bestimmt.⁴⁵³ Anschließend wurde ein modifiziertes Hertz-Modell für einen vierseitigen pyramidenförmigen Cantilever mit einer Poissonzahl von 0,5 und einer Spitze mit einem halbseitigen Öffnungswinkel zum Rand von 17,5° an die Eindrückung der Kurven angepasst.^{454, 455} Die gesamte Kraft-Abstand-Kurve einschließlich des Kontaktpunktes, allerdings ohne die ersten 500 nm, wurde angepasst, um den Young-Modul an jeder Position auf den Kollagengerüsten zu definieren. Die Kraftkurven und Anpassungen wurden manuell überprüft und gegebenenfalls verworfen, wenn die Qualität der Kurven keine zuverlässige Anpassung zuließ. Die Young-Modul Daten wurden aufgetragen und die Gaußsche Verteilungen wurden unter Verwendung von IGOR Pro 8.03 daran angepasst.

2.2.10 Angiogenese Array der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste

Zur Analyse des Angiogenese-Potenzials der Zelllinien (Co-Kultivierung von HUVECs und ASCs sowie HUVECs alleine) in den Kollagengerüsten wurde ein Angiogenese Array durchgeführt. Für ein Screening von multiplen Angiogenese-bezogenen Faktoren wurden die Überstände der Kollagengerüste nach 6 und 19 Tagen Inkubation gesammelt und unter Verwendung des Proteom-Profiler-Human-Angiogenese-Array-Kits analysiert. Das Kit ist ein membranbasierter Immunoassay zur gleichzeitigen Bestimmung relativer Konzentrationen ausgewählter Angiogenese-assoziiierter Proteine. Zunächst wurden die Proben mit einem Cocktail aus biotinylierten Detektionsantikörpern gemischt und anschließend mit der Array-Membran zusammen inkubiert. Die Membran ist mit doppeltbindenden Antikörpern gegen spezifische Zielproteine versehen. Abschließend wurden die gebundenen Proteine mit Hilfe von Chemilumineszenz-Nachweisreagenzien sichtbar gemacht. Das detektierte Signal ist proportional zur Menge des gebundenen Analyten. Zu den zu detektierenden Proteinen

gehören lösliche Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix, Proteasen, membrangebundene Rezeptoren und intrazelluläre Signalmoleküle. Mit Hilfe des Kits können bis zu 55 verschiedene Proteine parallel analysiert werden. In den Überständen der inkubierten Kollagengerüste mit den Zelllinien wurden gemäß Herstelleranleitung die Proteine Serpin E1, Serpin F1, TIMP-1, TSP-1 und uPa analysiert (siehe Produkt-Datenblatt Proteome Profiler Array). Die Aufnahmen der Plots wurden mit dem ChemiDoc Imaging System durchgeführt, während die Quantifizierung der Proteine mit dem Image Lab 6.0 erfolgte. Als Kontrolle diente *Endothelial Cell Growth Medium 2*. Die Signifikanz wurde mittels 1-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) bestimmt.

2.2.11 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) von TSP-1*

Um die Konzentration des TSP-1 im Überstand über die Zeit zu quantifizieren, wurden die zuvor gewonnenen Proben aus den Überständen verwendet. Dafür wurde ein Human Thrombospondin-1 DuoSet ELISA gemäß Herstelleranweisung durchgeführt und die Proben mittels *Microplate Readers* analysiert. Das Human Thrombospondin-1 Kit ist ein enzymgebundener *in vitro* Immunosorbent Assay zur quantitativen Bestimmung von TSP-1 in Serum-, Plasma- und Zellkulturüberständen. In dem Assay wird ein für TSP-1 spezifischer Antikörper in 96-Well Platten verwendet. Der immobilisierte Antikörper bindet das in den Proben vorhandene TSP-1 und anschließend wird ein biotinylierter TSP-1 Antikörper hinzugegeben. Nach dem Waschen ungebundener biotinylierter Antikörper wird ein HRP-konjugiertes Streptavidin hinzugefügt. Nach einem erneuten Waschen erfolgt die Zugabe einer TMB-Substratlösung. Die Intensität des Farbstoffes korreliert proportional zum gebundenen TSP-1. Durch die Zugabe der Stopplösung verändert sich die Farbe von blau nach gelb und die Intensität wird mittels optischer Dichte bei 450 nm gemessen. Die Messung erfolgte in Dreifachbestimmung.

2.2.12 *HUVECs Tube Formation Assay*

Neben dem Angiogenese Array wurde ein *Tube Formation Assay* zur Bewertung des angiogenen Potenzials der 3D-Kollagengerüste mit den Zelllinien (HUVECs in Co-Kultivierung mit ASCs und HUVECs alleine) durchgeführt. Hierfür wurden die gewonnenen Zellüberstände

wie nachfolgend beschrieben analysiert. Ein Matrigel mit reduzierten Wachstumsfaktoren wurde über Nacht auf Eis aufgetaut und sowohl Pipettenspitzen als auch Angiogenese-Objekträger wurden auf 4 °C vorgekühlt. 10 µl Matrigel wurde in jede Vertiefung des Angiogenese-Objekträgers pipettiert und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. HUVECs wurden wie zuvor beschrieben kultiviert und ausgezählt. Die Zellen wurden in basalem *Endothelial Cell Growth Medium 2* ohne Wachstumsfaktoren resuspendiert und 10.000 Zellen/Vertiefung wurden auf das Matrigel gegeben. Im Anschluss wurden 40 µl des Zellüberstandes, der zuvor aus den Kollagengerüsten mit den Zellen gewonnen wurde, in jede Vertiefung pipettiert. *Endothelial Cell Growth Medium 2* diente als Positivkontrolle, während AIM V™ serumfreies Medium als Negativkontrolle diente. Die Proben wurden unter kontrollierter Atmosphäre bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und 37 °C für 4 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden von den Proben zunächst in Dreifachbestimmung mit einem Zeiss Axiovert 25 lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht und das angiogene Potenzial mit der Software Wimasis bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 2D Proliferationstest mit Resazurin Alamar Blue

Für die Analyse der Zellviabilität von HUVECs in Co-Kultivierung mit ASCs wurden 10000 Zellen/cm² HUVECs alleine sowie in Kombination mit ASCs im Verhältnis 1:1 über 19 Tage in einer 24-Wellplatte kultiviert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen jeweils gewaschen und anschließend für 2 Stunden mit Resazurin-Natriumsalz wie zuvor beschrieben inkubiert. Die Zellproliferation wurde im Anschluss durch die Messung der Fluoreszenzintensität von Resorufin quantifiziert (Abb. 9).

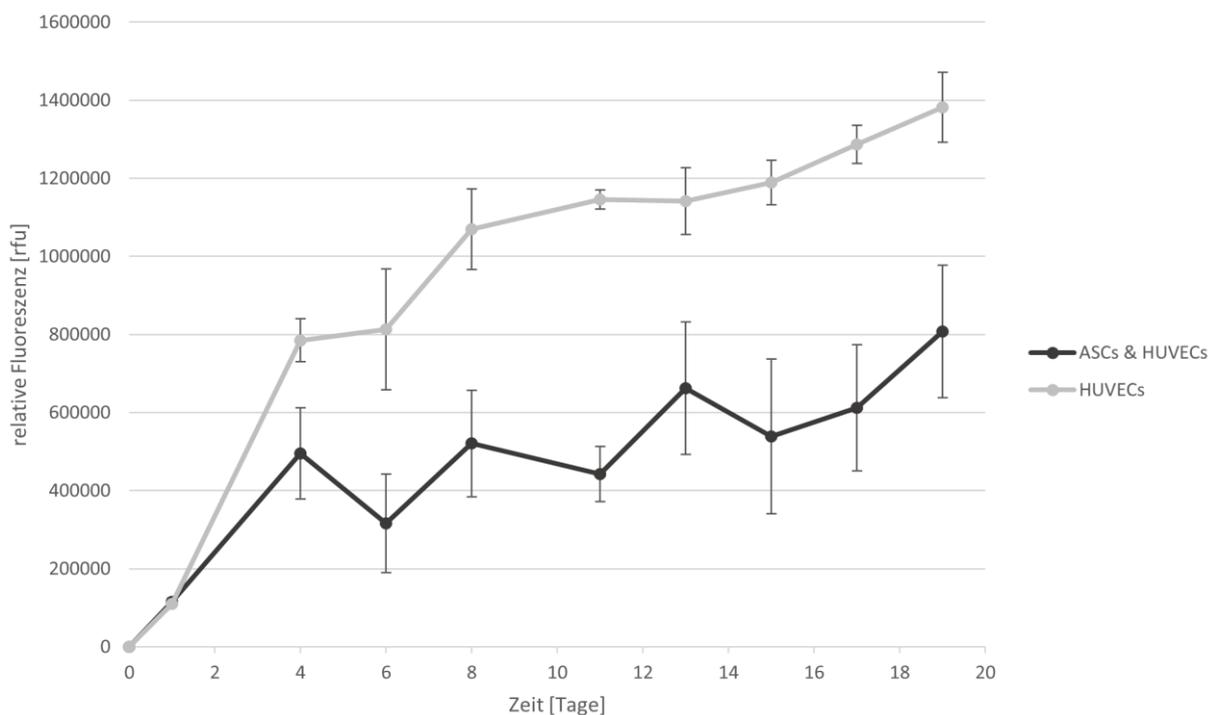


Abb. 9: Resazurin-Natriumsalz-Assay von 2D-Zellkulturen (mit HUVECs allein und HUVECs und ASCs in Co-Kultur). Die Proliferation der Zellkulturen wurde mittels relativer Fluoreszenz (rfu) über 19 Tage analysiert.

Über 19 Tage nahm die relative Fluoreszenz von HUVECs alleine sowie in Co-Kultivierung mit ASCs zu, so dass eine Zellviabilität bestätigt werden konnte. Die ASCs schädigen das Wachstum von HUVECS über den gemessenen Zeitraum nicht. HUVECS alleine zeigten eine relative Fluoreszenz von 1.400.000 rfu, wohingegen die Co-Kultivierung von HUVECS und ASCs eine relative Fluoreszenz von 800.000 rfu nach 19 Tagen zeigte. Die reduzierte relative Fluoreszenz der HUVECS und ASCs in Kombination ist mit dem kleineren Zelldurchmesser von HUVECS im

Vergleich zu ASCs zu erklären (Abb. 11). So können mehr Zellen auf einer kleineren Fläche kultiviert werden, bevor eine Zellkonfluenz entsteht. Eine lichtmikroskopische Analyse der Zellen zeigte, dass beide Zelllinien über den analysierten Zeitraum eine typische Zellmorphologie aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

3.2 Charakterisierung der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste

Um die Wundheilung und Geweberegeneration zu fördern, wurden 3D-Kollagengerüste aus Kollagen Typ I erstmalig mit diesem speziell entwickelten Verfahren hergestellt (Abb. 10).

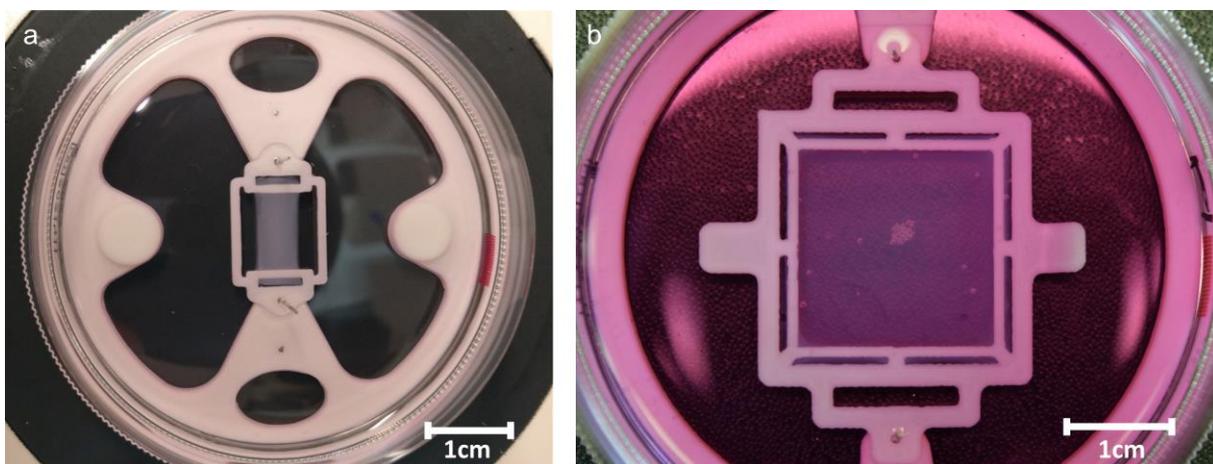


Abb. 10: Design von 3D-Kollagengerüsten. a) Gegossenes Kollagengerüst, das nach dem Entfernen der Gießform aus Pluronic an der Halterung befestigt ist; b) Beispiel für ein benutzerdefiniertes *Scale-up* eines gegossenen Kollagengerüstes mit Halterung und einer Grundplatte aus PLA in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

Das Kollagengerüst dient in dieser Arbeit sowohl als Leitstruktur für die Zellen, um Zelladhäsion, -migration und -proliferation zu begünstigen als auch als potentielle personalisierte Wundauflage. Die Grundplatte und Halterung aus PLA wurde zunächst mittels CAD und Druckverfahren so entworfen, dass Pluronic als Gießform 3D-gedruckt werden konnte und dies im Anschluss wieder entfernt werden kann. In die Gießform aus Pluronic konnten die zellbeladenen Kollagengerüste direkt gegossen werden. Da die Halterung und somit die Gießform individuell angepasst werden kann, können die Kollagengerüste individuell hergestellt werden. Sowohl die Zellzahl als auch die Zelllinien können innerhalb des Kollagens variiert werden. Das Kollagen wurde in der Halterung nur an 2 Achsen befestigt, um eine bestmögliche Nährstoffversorgung während der Kultivierung der Zellen zu gewährleisten. Abb. 10 a zeigt, dass das Kollagengerüst in der Halterung flexibel ist, indem die Zellen eine

Zugkraft auf das Kollagen ausüben können. Aufgrund des Herstellverfahrens ist auch ein *Up-Scaling* Prozess der 3D-Kollagengerüste möglich und die Gerüste können so an die Größe der Wunden der Patienten angepasst werden (Abb. 10 b).

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste

Um das Zellwachstum, die Zellproliferation und die Interaktion von HUVECs und ASCs in den 3D-Kollagengerüsten zu analysieren, wurden die Mitochondrien der Zellen mit einem Mitotracker Kit gefärbt. Mittels der Färbung der Mitochondrien kann die Zellzahl in den Kollagengerüsten visualisiert werden. Die HUVECs wurden grün während die ASCs rot gefärbt wurden. 24 Stunden nach der Inkubation mit den Farbstoffen wurden die Zelllinien, entweder HUVECs alleine oder in Co-Kultivierung mit ASCs, mit Kollagen-Typ I gemischt und in die zuvor hergestellten Formen gegossen. Die Inkubation erfolgte insgesamt über 19 Tage, wobei an Tag 6 und 19 fluoreszenzmikroskopische Bilder der 3D-Kollagengerüste aufgenommen wurden (Abb. 11).

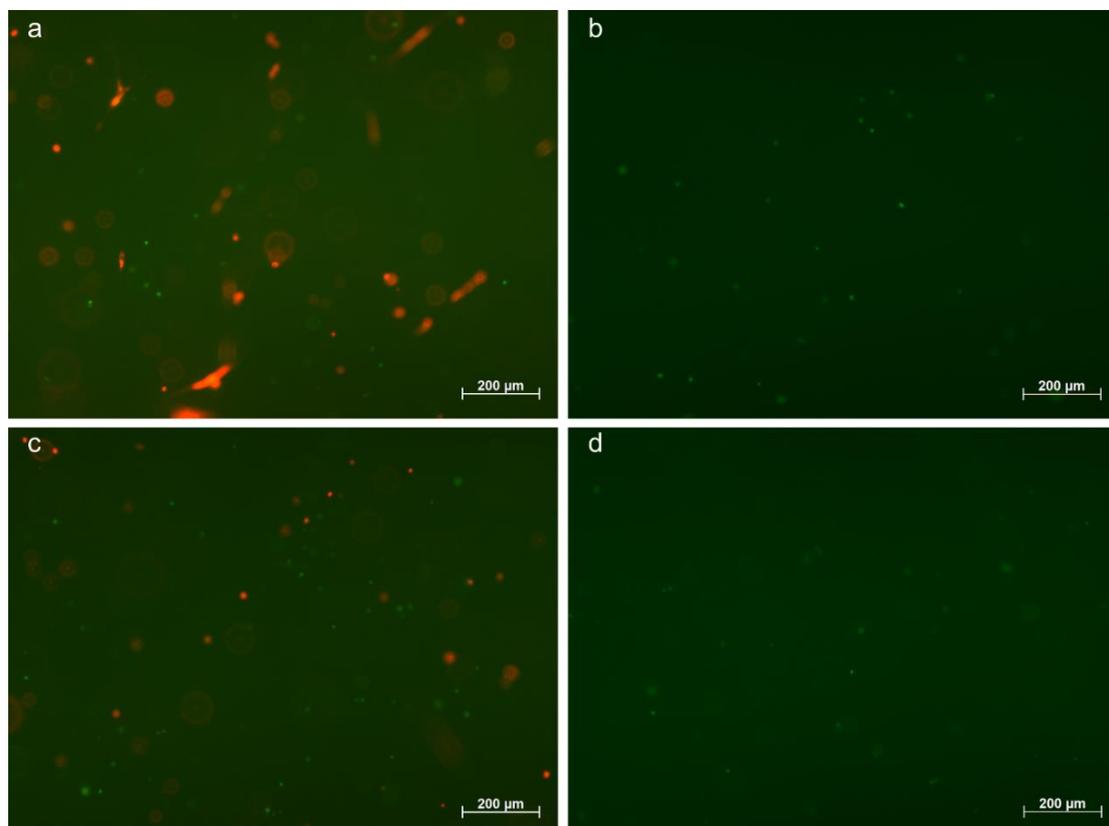


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellen in den Kollagengerüsten während der Inkubation über 19 Tagen. a) HUVECs & ASCs nach 6 Tagen; b) HUVECs nach 6 Tagen; c) HUVECs & ASCs nach 19 Tagen; d) HUVECs nach 19 Tagen. Die Mitochondrien von HUVECs wurden grün und von ASCs rot gefärbt.

Beide Zelllinien (HUVECs in grün und ASCs in rot) konnten über 19 Tage koexistieren und waren somit lebensfähig (Abb. 11 a & c). Die Kontrolle (HUVECs alleine) zeigte ein unauffälliges Wachstumsverhalten. Das Zellverhältnis zwischen HUVECs und ASCs, welches durch eine Zellzählung bestimmt wurde, blieb über 19 Tage konstant (Daten nicht gezeigt). Sowohl HUVECs als auch ASCs waren homogen über das gesamte Kollagengerüst innerhalb der x-, y- und z-Achse verteilt (Abb. 11 a & c). Es konnte gezeigt werden, dass die ASCs keinen negativen Einfluss auf die Proliferation von HUVECs hatten. Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass die Zellmorphologie in den 3D-Kollagengerüsten mit den Morphologien der Zelllinien in 2D-Kultur vergleichbar war (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie der zellbeladenen 3D Kollagengerüste

Um die Auswirkung beider Zelllinien auf die Kollagenfaseranordnung im 3D-Gerüst zu analysieren, wurden entweder mit HUVECs alleine oder mit HUVECs und ASCs beladenen Kollagengerüste hergestellt und über 19 Tage kultiviert. Die Oberfläche der Kollagengerüste wurde mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) an Tag 6 und 19 der Inkubation untersucht (Abb. 12).

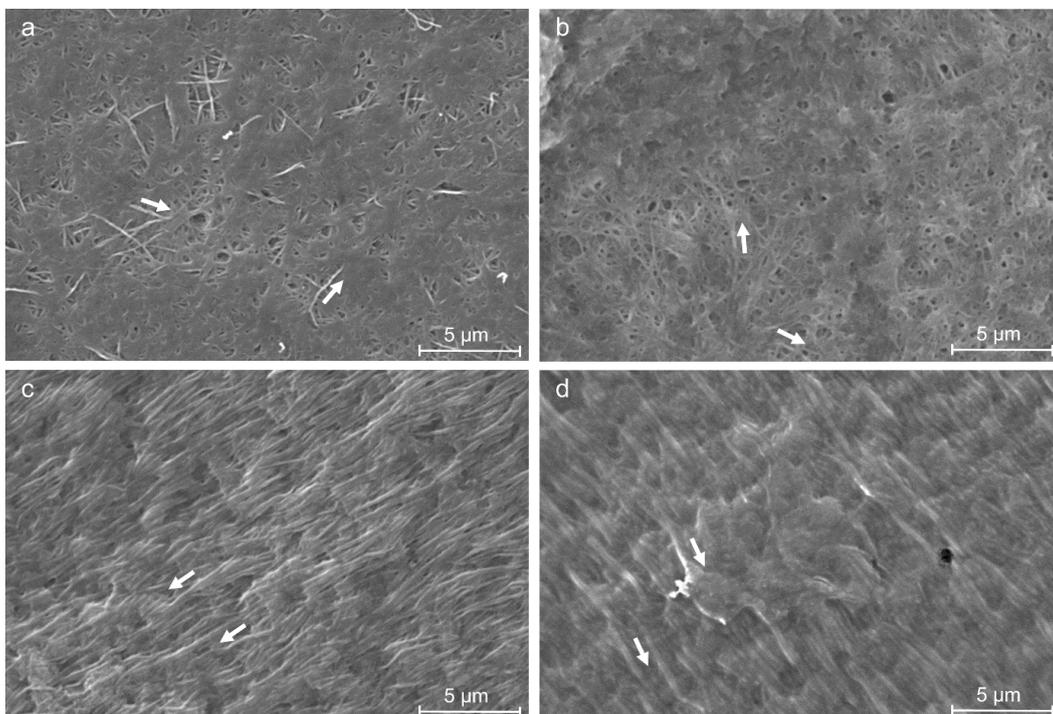


Abb. 12: REM-Aufnahmen von Kollagengerüsten, die zusammen mit verschiedenen Zelllinien über 19 Tage inkubiert wurden. a) HUVECs & ASCs nach 6 Tagen; b) HUVECs nach 6 Tagen; c) HUVECs & ASCs nach 19 Tagen; d) HUVECs nach 19 Tagen. Pfeile: Ausrichtung der Kollagenfasern.

Während der Inkubationszeit von 19 Tagen veränderte sich die Kollagenfaseranordnung bei allen Zelltypen über den untersuchten Zeitraum. Nach 6 Tagen Inkubation der Zellen in den 3D-Kollagengerüsten sind die Kollagenfasern zufällig angeordnet und nur wenige Fasern sind ausgerichtet und parallel zueinander orientiert. Dies zeigt sich sowohl bei der Kultivierung mit HUVECs alleine als auch in Co-Kultivierung mit ASCs (Abb. 12 a & b). Nach 19 Tagen Inkubation hingegen hat sich die Anordnung der Kollagenfasern mit HUVECs alleine sowie in Co-Kultivierung verändert und zeigt eine einheitliche Faserorientierung (gezeigt durch die weißen Pfeile) (Abb. 12 c & d). Die Inkubation beider Zellkulturen in den 3D-Kollagengerüsten zeigte, dass die Kollagenfasern zwischen Tag 6 und 19 neu strukturiert und oberflächlich parallel zueinander ausgerichtet wurden. Zudem zeigten alle Kollagengerüste eine Schrumpfung senkrecht zu der durch die Verankerungspunkte definierten Achse (Abb. 10 a). Interessanterweise war die Schrumpfung der Kollagengerüste bei den HUVECs in Co-Kultivierung mit den ASCs deutlicher ausgeprägter.

3.2.3 Rasterkraftmikroskopie der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste

Um die Struktur und Biomechanik der zellbeladenen Kollagengerüste genauer zu analysieren und die Ausrichtung der Kollagenfasern zu untersuchen, wurden Kryoschnitte der Kollagengerüste nach 19 Tagen Inkubation mit den Zellen angefertigt. Im Anschluss wurden AFM-Messungen anhand der aufgetauten Kryoschnitte durchgeführt. Für die Untersuchung der Struktur der Kollagengerüste, der Kollagenfaserorientierung sowie der Ultrastruktur der Kollagenfasern wurde zunächst an den aufgetauten Kryoschnitten eine Kontaktmodus-AFM-Bildgebung in Luft durchgeführt. Um anschließend die beobachteten strukturellen Unterschiede mit den biomechanischen Eigenschaften der zellbeladenen Kollagengerüste zu korrelieren, wurden in einem zweiten Schritt an ausgewählten Bereichen der aufgetauten Kryoschnitte, die jeweils charakteristische Kollagenstrukturen aufwiesen, Indentationstyp-AFM-Messungen (IT-AFM) durchgeführt. Für die Details der Probenvorbereitungen der AFM-Bildgebung und IT-AFM siehe Material und Methoden.

Repräsentative AFM-Ergebnisse eines kryogeschneidene Kollagengerüsts, das eine Co-Kultur von HUVECs und ASCs enthält, sind in Abb. 13 zusammengefasst.

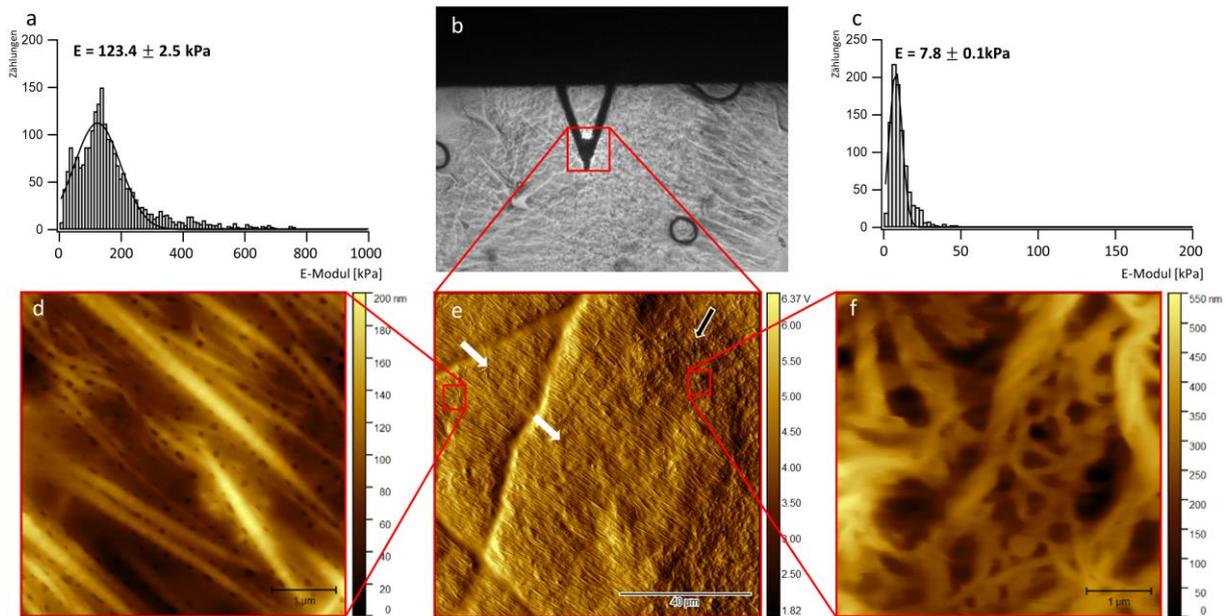


Abb. 13: AFM-Messung der Co-Kultur von HUVECs und ASCs in Kollagengerüsten nach 19 Tagen Inkubation. a) Verteilung des Elastizitätsmoduls (E-Modul) in einer Region ausgerichteter Kollagenfasern; b) Hellfeld-Lichtmikroskopie Aufnahme die das Kollagengerüst (grauer Hintergrund) und den AFM-Cantilever auf dem Kollagengerüst (Dreieck) zeigt; c) Verteilung des E-Moduls in einer Region mit nicht-orientierten Kollagenfasern; d) Kontaktmodus-AFM-Bild (Höhenbild) in der Region ausgerichteter Kollagenfasern; e) 100 x 100 μm AFM-Übersichtsbild (Cantilever-Durchbiegungsbild); f) Kontaktmodus-AFM-Bild (Höhenbild) in der Region ungeordneter Kollagenfasern.

Die Abb. 13 b zeigt exemplarisch eine optische Hellfeldmikroskopie Aufnahme des Kollagengerüstes (grauer Hintergrund), den AFM-Cantilever mit Spitze (dunkles Dreieck) und die Region, in der ein 100 x 100 μm großes AFM-Übersichtsbild (Abb. 13 e) aufgezeichnet wurde (rotes Quadrat). Das AFM-Übersichtsbild der zellbeladenen Kollagengerüste zeigt große Bereiche hochgeordneter paralleler Kollagenfasern (weiße Pfeile) sowie kleinere Bereiche mit zufälliger Kollagenfaserorientierung (schwarzer Pfeil) (Abb. 13 e). Eine 5 x 5 μm große Nahaufnahme des Übersichtsbildes zeigt die Details der gleichmäßig orientierten hochparallel ausgerichteten Kollagenfasern mit einer deutlich sichtbaren 67-nm-D-Band-Struktur entlang der Kollagenfasern (Abb. 13 d und e; Abb. 14).

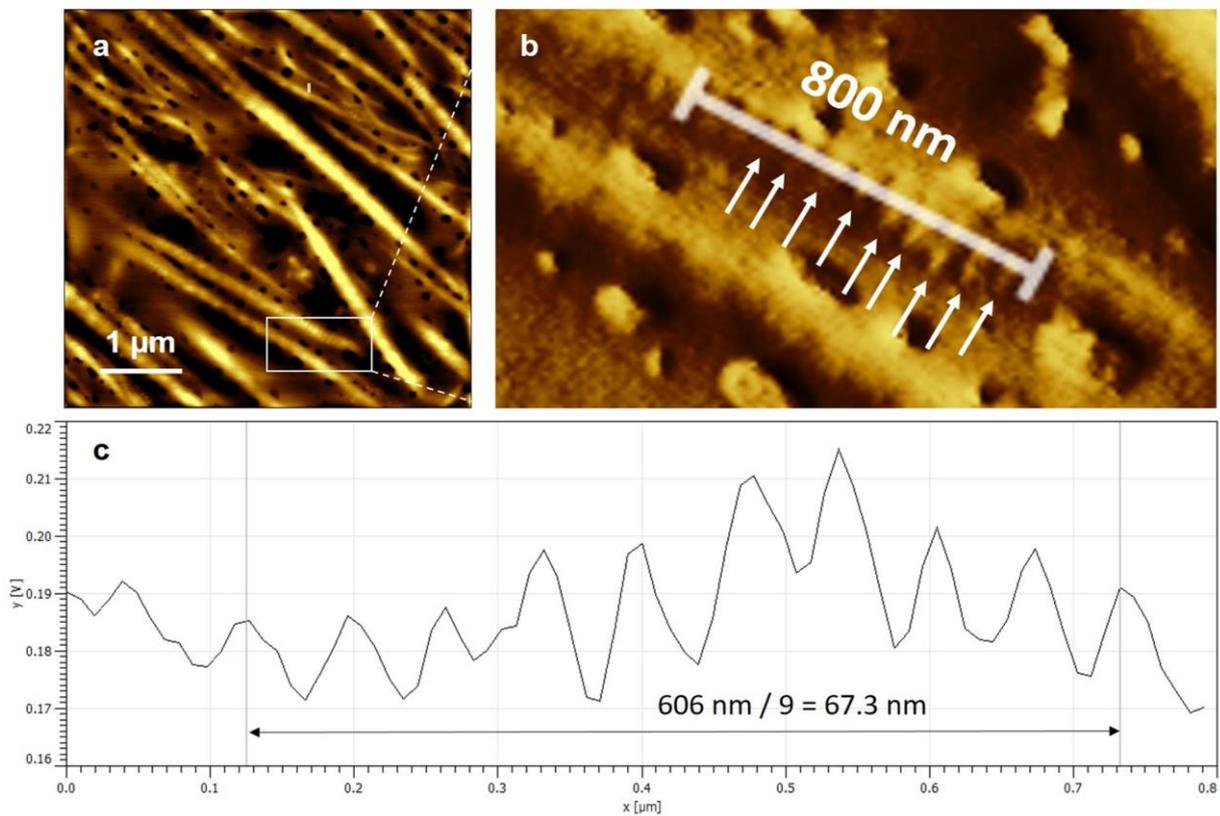


Abb. 14: D-Band-Struktur von Kollagengerüsten mit HUVECs und ASCs. a) 5 μm x 5 μm Nahaufnahme, gezeigt in Abb. 13 d mit erhöhtem Kontrast; b) vertikales Cantilever-Ablenkungsbild des Bildausschnittes, das die periodische 67-nm-D-Band-Struktur des Kollagens zeigt (weiße Pfeile); c) Profil der 800 nm langen Messlinie, die die D-Band-Struktur mit einer Periodizität von ~ 67 nm zeigt.

In Abb. 13 f ist eine 5 x 5 μm große Nahaufnahme der ungeordneten und zufällig orientierten Kollagenfasern mit einer größeren Varianz an Faserdurchmessern und ohne klare D-Band-Struktur gezeigt. Interessanterweise erreicht die Elastizitäts-Modul-Verteilung in der Region mit der parallelen Kollagenfaserorientierung (Abb. 13 a) einen fast 16-mal höheren Wert (123,4 kPa) als die E-Modul-Verteilung in der Region mit zufälliger Kollagenfaserorientierung (7,8 kPa) (Abb. 13 c). Es sollte erwähnt werden, dass die absoluten Werte des E-Moduls nicht den Werten der nativen Kollagengerüste entsprechen, da die Kollagengerüste vor dem Kryoschnitt mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert wurden. Der zwischen den beiden Bereichen des fixierten Kollagengerüsts beobachtete Unterschied des E-Moduls spiegelt jedoch die zugrundeliegenden strukturellen Unterschiede in den beiden unterschiedlichen Bereichen und die entsprechenden Unterschiede des E-Moduls in den nativen Kollagengerüsten wider.

Die AFM-Ergebnisse eines repräsentativen Kryoschnitts eines Kollagengerüsts, das zuvor nur mit HUVECs beladen wurde, sind in Abb. 15 zusammengefasst.

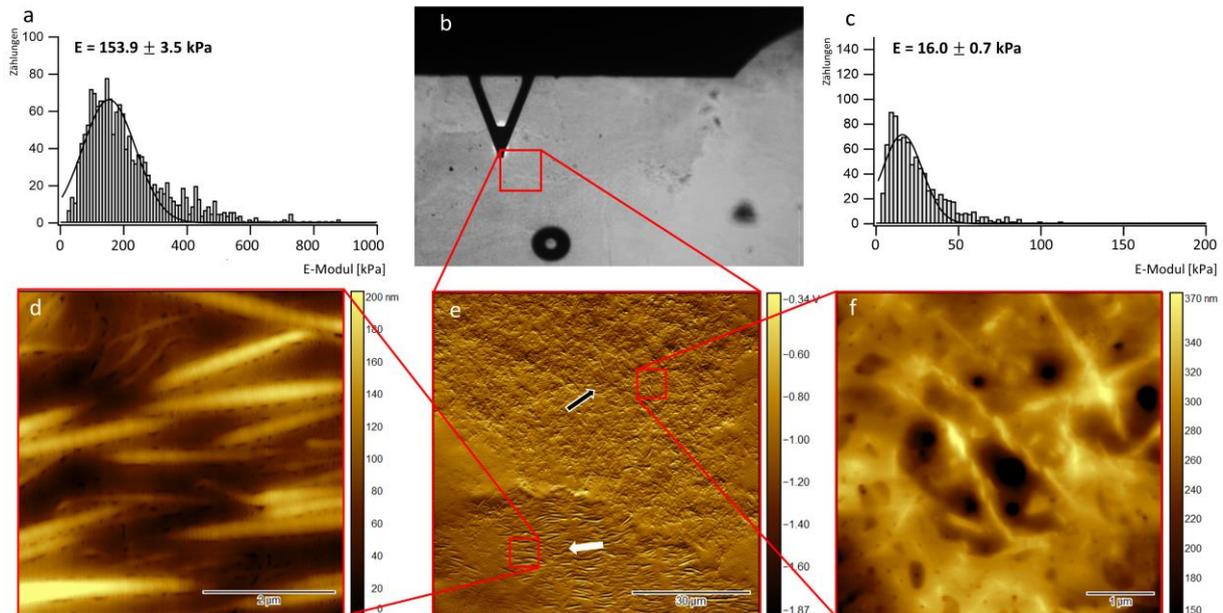


Abb. 15: AFM-Messung von HUVECs in Kollagengerüsten nach 19 Tagen Inkubation. a) Verteilung des E-Moduls in einer Region ausgerichteter Kollagenfasern; b) Hellfeld-Lichtmikroskopie Aufnahme, die das Kollagengerüst (grauer Hintergrund) und den AFM-Cantilever auf dem Kollagengerüst (Dreieck) zeigt; c) Verteilung des E-Moduls in einer Region mit nicht-orientierten Kollagenfasern; d) Kontaktmodus-AFM-Bild (Höhenbild) in der Region ausgerichteter Kollagenfasern; e) 100 x 100 μm AFM-Übersichtsbild (Cantilever-Durchbiegungsbild); f) Kontaktmodus-AFM-Bild (Höhenbild) in der Region ungeordneter Kollagenfasern.

Wie bereits zuvor für die zellbeladenen Kollagengerüste mit HUVECs und ASCs beschrieben, zeigt Abb. 15 b eine lichtmikroskopische Hellfeldaufnahme des Kollagengerüsts, das mit HUVECs beladen wurde, die Position des AFM-Cantilevers sowie die Region, in der ein 100 x 100 μm großes Übersichtsbild (Abb. 15 e) aufgenommen wurde. Bei der Kultivierung von HUVECs alleine zeigt das Übersichtsbild kleine Bereiche hochgeordneter paralleler Kollagenfasern (weißer Pfeil) und größere Bereiche mit zufälliger Kollagenfaserorientierung (schwarzer Pfeil) (Abb. 15 e). Die 5 x 5 μm große Nahaufnahme der gleichmäßig orientierten parallelen Kollagenfasern zeigt erneut die 67-nm-D-Band-Struktur in diesem Bereich (Abb. 15 d; Abb. 16).

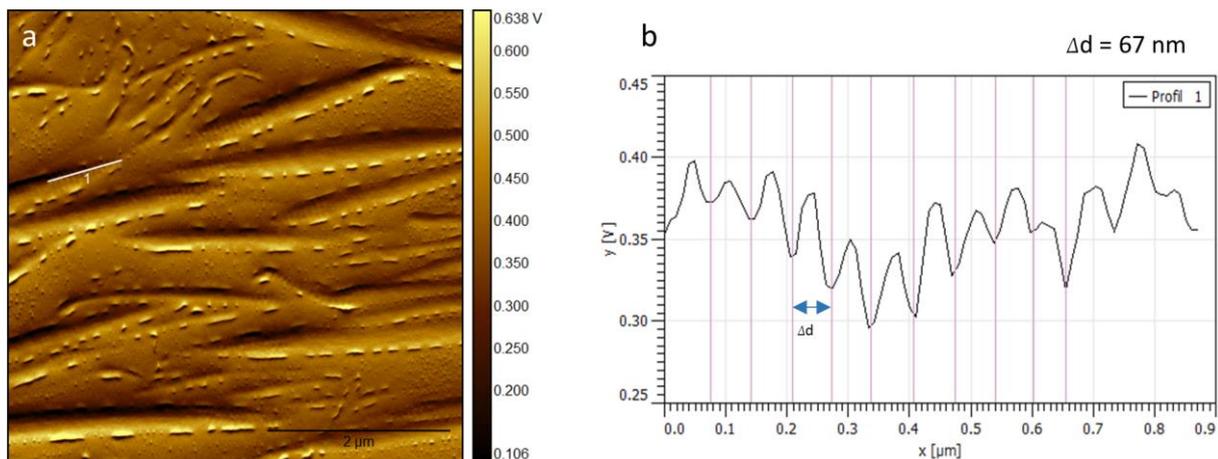


Abb. 16. AFM-Messungen ausgerichteter Kollagenregionen der Kollagengerüste mit HUVECs alleine zur Analyse der d-Periodizität. Die weiße Linie zeigt den Bereich der d-Periodizitätsmessung. a) AFM-Aufnahme der vertikalen Ablenkung des Kollagengerüsts; b) D-Band-Struktur mit einer Periodizität von ~ 67 nm.

Die Nahaufnahme der zufällig orientierten Kollagenfasern zeigt verschiedene Faserdurchmesser und keine klare D-Band-Struktur (Abb. 15 f). Wie bei der Co-Kultivierung von HUVECs und ASCs erreicht die E-Modul-Verteilung in der Region mit paralleler Kollagenfaserorientierung einen fast 10-mal höheren Wert (153,9 kPa) (Abb. 15 a) als die E-Modul-Verteilung in der Region mit zufälliger Kollagenfaserorientierung (10,6 kPa) (Abb. 15 c). Dies spiegelt wiederum die Strukturunterschiede in den beiden Bereichen und die E-Modul-Unterschiede in den Kollagengerüsten wider.

3.3 Angiogenes Potenzial der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste

Um das angiogene Potenzial in der Co-Kultivierung der HUVECs und ASCs in den 3D-Kollagengerüsten zu analysieren wurde sowohl ein Angiogenese Array, ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) als auch ein *Tube Formation Assay* durchgeführt.

3.3.1 Angiogenese Array

Die Hoch- und Herunterregulation bestimmter Wachstumsfaktoren gibt einen Aufschluss über das angiogene Potenzial von HUVECs und ASCs in den 3D-Kollagengerüsten. Hierfür wurde untersucht, ob eine Co-Kultivierung von HUVECs und ASCs ein höheres angiogenes Potenzial im Vergleich zu HUVECs alleine zeigt. Für ein Screening von multiplen Wachstumsfaktoren, die

in Bezug zu Angiogenese stehen, wurde der Überstand der Zellen, die in den 3D Kollagengerüsten kultiviert wurden, an Tag 6 und Tag 19 gewonnen. Die Überstände wurden mittels eines Proteom-Profiler-Human-Angiogenese-Array-Kits analysiert und die Wachstumsfaktoren Serpin E1, Serpin F1, TIMP-1, TSP-1 und uPA über die Zeit bestimmt (Abb. 17).

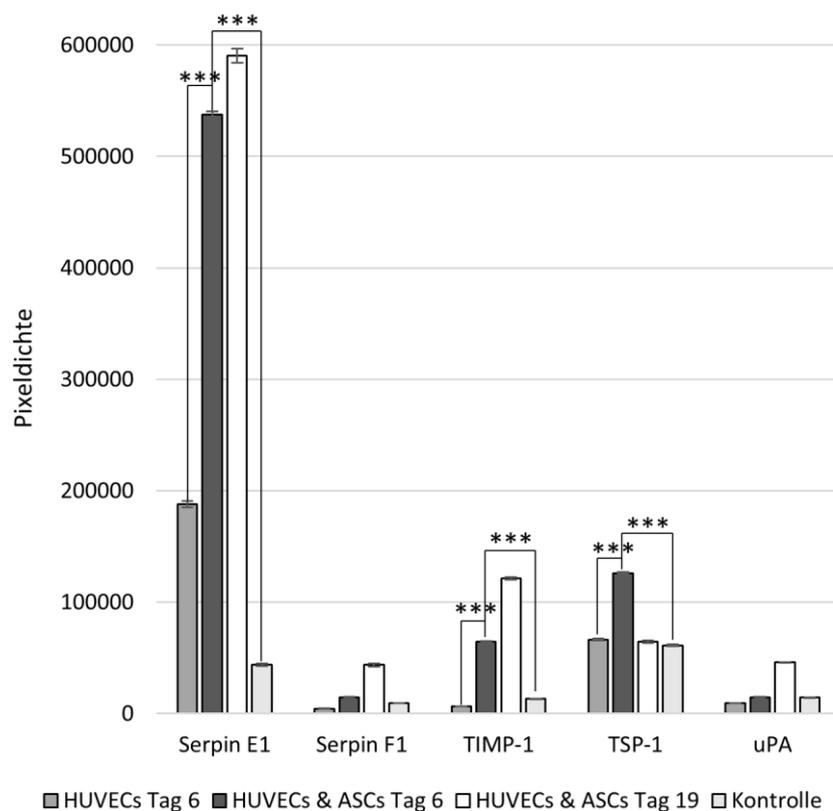


Abb. 17: Analyse von definierten Wachstumsfaktoren in den Zellkulturmedien im zeitlichen Verlauf mit dem Proteom-Profiler-Human-Angiogenesis-Array-Kit. Der Zellkulturüberstand wurde nach 6 und 19 Tagen gesammelt und auf potentielle Wachstumsfaktoren analysiert. Um den Assay zu validieren wurde Endothelial Cell Growth Medium 2 als Kontrolle verwendet. Die * zeigen den signifikanten Unterschied zwischen den Werten. Dafür wurden die Daten unter Verwendung der 1-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Wahrscheinlichkeitswerte (*) $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Für Wahrscheinlichkeitswerte (**) $p < 0,01$ wurden als hochsignifikant und Wahrscheinlichkeitswerte (***) $p < 0,001$ wurden als am signifikantesten betrachtet.

Für die Wachstumsfaktoren Serpin F1 und uPa konnte nach 6 Tagen nur ein leicht erhöhter Anteil in den Überständen der Co-Kultur von HUVECs und ASCs im Vergleich zu HUVECs alleine detektiert werden. Sowohl Serpin E1, TSP-1, als auch TIMP-1 waren hingegen in der Co-Kultur

von HUVECs und ASCs im Vergleich zu HUVECs alleine und der Kontrolle (Zellkulturmedium) nach 6 Tagen signifikant hochreguliert. Nach 19 Tagen wurde ein zusätzlicher Anstieg von Serpin E1 und TIMP-1 für die Co-Kultur im Vergleich zu Tag 6 bestimmt. Interessanterweise wird TSP-1 zwischen Tag 6 und 19 bei den HUVECs in Kombination mit ASCs, die in den Kollagengerüsten inkubiert wurden, herunterreguliert. Im Allgemeinen zeigte die Kontrolle, für die *Endothelial Cell Growth Medium 2* ohne das 3D-Kollagengerüst verwendet wurde, zu allen Messzeitpunkten den niedrigsten Gehalt an Wachstumsfaktoren.

Um die Konzentration von TSP-1 über die Zeit zu quantifizieren, wurde zusätzlich zum Angiogenese Array ein ELISA Assay durchgeführt. Das verwendete ELISA-Kit hat eine Nachweisgrenze von 1,6 ng/ml. Die gemessene TSP-1 Konzentration war nicht nachweisbar und lag somit sowohl bei der Co-Kultur als auch bei HUVECs alleine über 19 Tage unter 1,6 ng/ml (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Tube Formation Assay

Der 2D-*Tube Formation Assay* mit HUVECs ermöglicht eine weitere Aussage über das angiogene Potenzial des gesammelten Zellkulturüberstandes der zellbeladenen Kollagengerüste. Für den Assay wurden HUVECs auf Matrigel mit reduzierten Wachstumsfaktoren in Angiogenese-Objektträgern wie zuvor in Material und Methoden beschrieben inkubiert. Der Zellkulturüberstand, der aus den vorherigen Experimenten mit HUVECs und ASCs sowie HUVECs alleine in den 3D-Kollagengerüsten nach 6, 12 und 19 Tagen gewonnen wurde, wurde in die Vertiefungen der Angiogenese-Objektträger gegeben. *Endothelial Cell Growth Medium 2* diente als Positivkontrolle, während AIM V™ serumfreies Medium als Negativkontrolle diente. In Abb. 18 sind repräsentative Hellfeld-Aufnahmen nach einem Tag Inkubation der HUVECs mit den verschiedenen Zellkulturüberständen dargestellt.

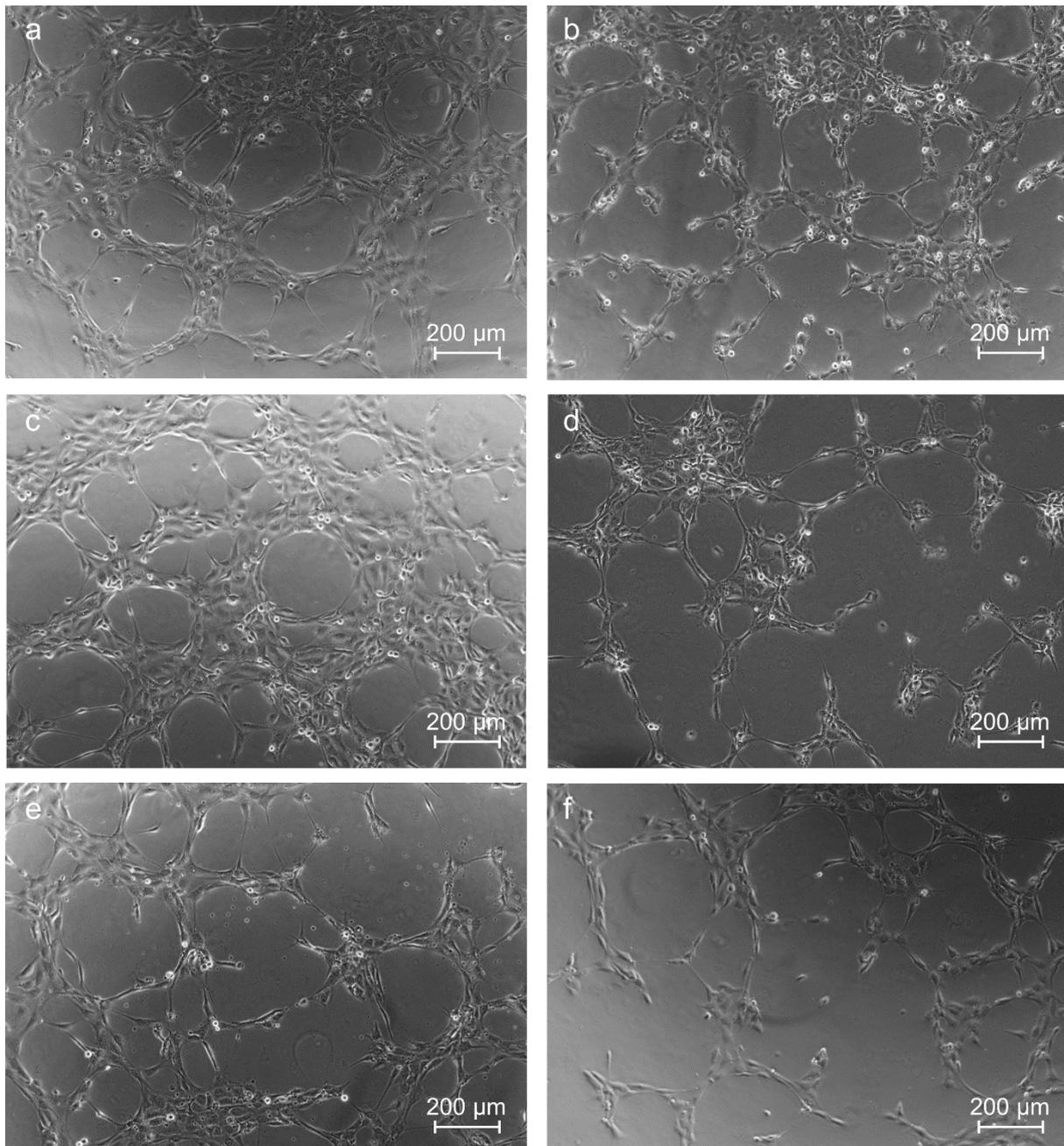


Abb. 18: Lichtmikroskopische Hellfeld-Aufnahmen der HUVECs in Kombination mit dem zuvor gewonnenen Zellkulturüberständen nach einem Tag Inkubation. Der Zellkulturüberstand für den Assay wurde aus der Inkubation verschiedener Zellkulturen in Kombination mit den 3D-Kollagengerüsten gewonnen. a) HUVECs & ASCs nach 6 Tagen; b) HUVECs nach 6 Tagen; c) HUVECs & ASCs nach 19 Tagen; d) HUVECs nach 19 Tagen; e) Positivkontrolle; f) Negativkontrolle.

HUVECs, die für den *Tube Formation Assay* mit dem Zellkulturüberstand der HUVECs und ASCs in Co-Kultur in den 3D-Kollagengerüsten behandelt wurden, zeigten eine bemerkenswerte Röhrenbildung (Abb. 18 a und c). Dabei ordnen sich die Zellen so an, dass mehr geschlossene

Röhrchen und Verzweigungspunkte entstehen im Vergleich zu den HUVECs, die mit den Zellkulturüberständen aus den Experimenten der HUVECs alleine in den 3D-Kollagengerüsten gewonnen wurden (Abb. 18 a-d). Die Ausbildung der Röhrchen kann man bereits mit den Zellkulturüberständen, die nach 6 Tagen Inkubation in den Kollagengerüsten gewonnen wurden, beobachten. Wenn die HUVECs mit den Überständen aus der Co-Kultivierung behandelt wurden, ist die Röhrchenbildung vergleichbar mit der Positivkontrolle, bei der die HUVECs mit *Endothelial Cell Growth Medium 2* behandelt wurden (Abb. 18 e). Die Negativkontrolle mit serumfreiem Medium zeigte hingegen eine deutlich reduzierte Röhrchenbildung (Abb. 18 f). Die Proben, die mit dem Überstand, der aus der Kultivierung von HUVECs alleine in den Kollagengerüsten erhalten wurde, induzierte zwar im Vergleich zur Negativkontrolle ebenfalls eine Röhrchenbildung allerdings deutlich weniger als die HUVECs, die mit dem Überstand aus der Co-Kultur gewonnen wurde (Abb. 18).

Um den *Tube Formation Assay* zu quantifizieren wurde die Gesamtzahl der gebildeten Röhrchen pro Well, die Gesamtzahl der Verzweigungspunkte der Röhrchen sowie die von den Röhrchen bedeckte Fläche mittels der Bildanalyse Software Wimasis analysiert (Abb. 19).

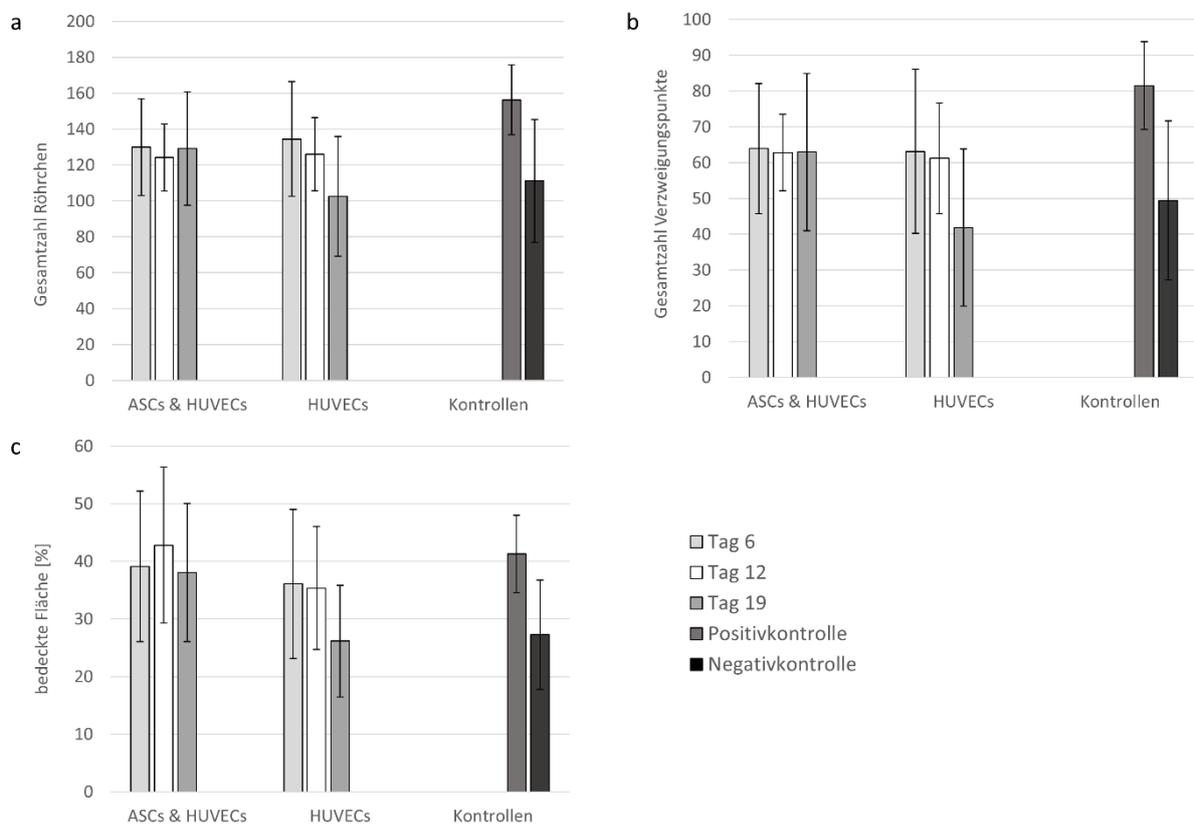


Abb. 19: Quantitative Analyse des *Tube Formation Assays* a) Gesamtzahl der gebildeten Röhren pro Well; b) Gesamtzahl der Verzweigungspunkte der Röhren; c) Von den Röhren bedeckte Fläche. Die Zellkulturüberstände wurden nach 6, 12 und 19 Tagen Inkubation in den Kollagengerüsten gesammelt, um das angiogene Potenzial zu untersuchen.

Abb. 19 zeigt, dass die Überstände, die sowohl von der Kultivierung von HUVECs und ASCs als auch von HUVECs alleine aus den Kollagengerüsten gewonnen wurden, ein angiogenes Potenzial aufweisen. Die Zellen wurden über 19 Tage in den gedruckten Kollagengerüsten inkubiert und die gewonnenen Überstände zeigten bei der Co-Kultivierung von HUVECs und ASCs nach 19 Tagen keine Abnahme der Gesamtzahl der Röhren, der Gesamtverzweigungspunkte und der bedeckten Fläche im Vergleich zu der Gruppe, die nur HUVECs enthält. Die Röhrenbildung ist bei den HUVECs alleine an Tag 19 vergleichbar mit der Negativkontrolle. Die Co-Kultivierung von HUVECs und ASCs hat somit einen positiven Einfluss auf das angiogene Potenzial.

3.4 3D-gedruckte Gerüste aus Allograft Adipose Matrix und Pluronic

Um die Wundheilung und Geweberegeneration zu fördern, wurden in diesem Projekt in Zusammenarbeit mit dem Center for Tissue Engineering (University of California, Irvine) eine Methode entwickelt, um 3D-gedruckte Gerüste aus AAM und Pluronic herzustellen (Abb. 20).

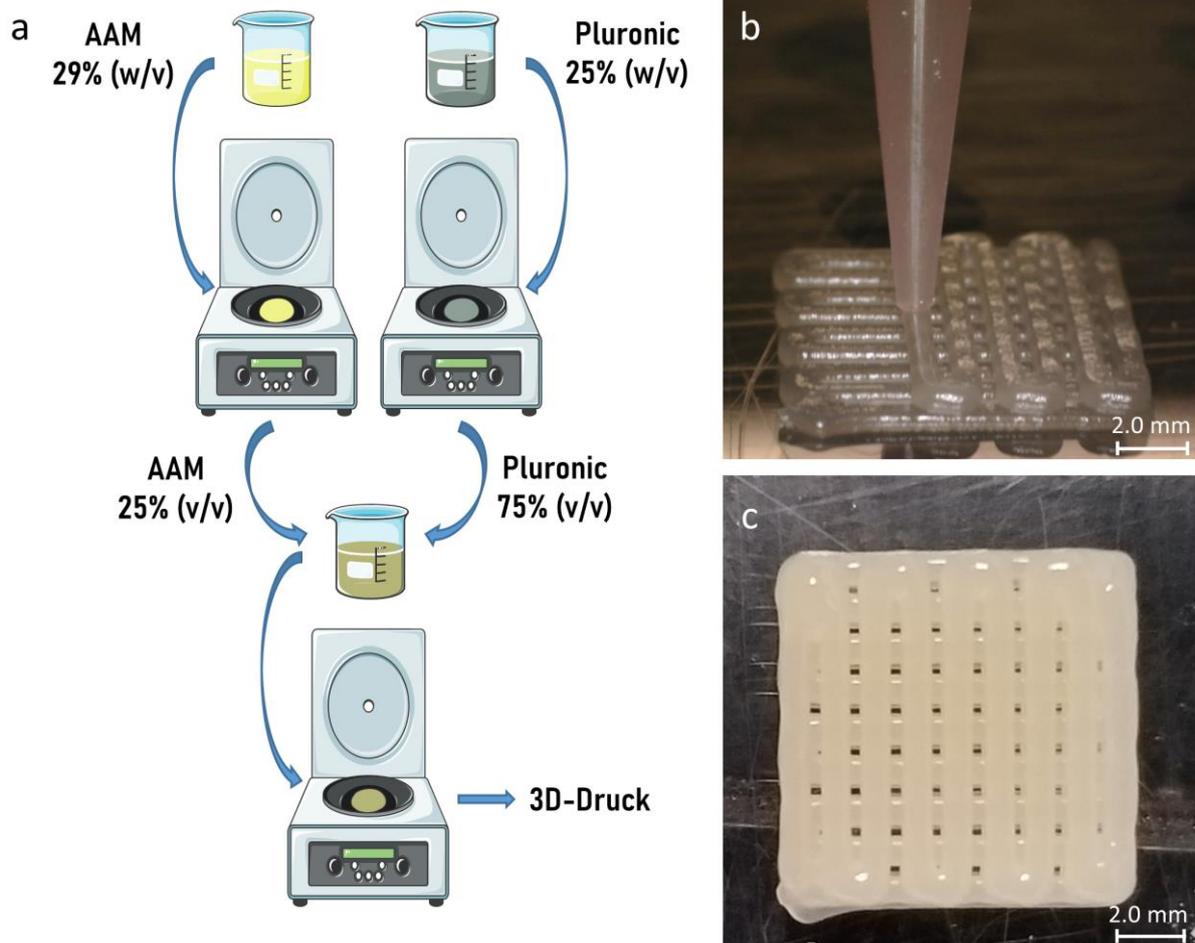


Abb. 20: Design von 3D-gedruckten Gerüsten aus Allograft Adipose Matrix (AAM) und Pluronic. a) Herstellungsprozess der Biotinte, die im 3D-Druckverfahren verwendet wurde. b) Makroskopische Aufnahme während des Dispensdruckverfahrens mit AAM und Pluronic. c) Makroskopische Aufnahme eines gedruckten 7-lagigen 3D-Gerüstes aus AAM und Pluronic.

Zunächst wurde ein Protokoll entwickelt, um eine druckbare Biotinte aus AAM herzustellen. Dabei muss die Tinte sowohl biologische als auch physikalische Eigenschaften aufweisen. Deshalb wurden zwei unterschiedliche Materialien verwendet. AAM fördert die Zelladhäsion, -migration und -proliferation innerhalb des Gerüstes, kann alleine allerdings aufgrund des schlechten Fließverhaltens nicht verdruckt werden. Zudem ändert sich bei einem konstanten Druck die Flussrate über die Zeit. Dies kann durch die inhomogene Zusammensetzung sowie die unterschiedlich starke Vernetzung der extrazellulären Matrixkomponenten des AAMs erklärt werden. Pluronic hingegen verleiht der Biotinte die nötigen physikalischen Eigenschaften während des Druckes sowie dem gedruckten Gerüst seine stabile Struktur. Pluronic wurde bereits für die zellbeladenen Kollagengerüste als Stützstruktur verwendet,

weil es im 3D-Druckverfahren bereits etabliert ist. Das richtige Verhältnis von AAM (25% v/v) und Pluronic (75% v/v) wurde zunächst identifiziert, um reproduzierbare 1 x 1 cm große 3D-Gerüste aus 7 Lagen drucken zu können. Die Strangbreite der Gerüste betrug $\sim 750 \mu\text{m}$. Sie waren stabil und konnten bis zum weiteren Gebrauch gelagert werden. Im nächsten Schritt muss die Stabilität der Gerüste in Zellkulturmedium untersucht werden, bevor die Biotinte mit Zellen beladen und gedruckt wird. HUVECs in Kombination mit ASCs könnten für die Herstellung der zellbeladenen 3D-Gerüste dienen. Das angiogene Potenzial sollte wie zuvor für die 3D-Kollagengerüste beschrieben analysiert werden, um das Potenzial als Wundauflage zu untersuchen.

4. Diskussion

Die Gewebereparatur bzw. der Wundheilungsprozess ist eine komplexe Wechselwirkung zwischen Zellen, Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen sowie Komponenten der extrazellulären Matrix.⁴⁵⁶ Der natürliche Wundheilungsprozess ist in vier Phasen unterteilt: Hämostase, Entzündung, Proliferation und Umbau/Reifung.¹⁵ Zunächst wird die Blutung an der verletzten Stelle durch die Bildung eines Thrombozytenpfropfens und die Aktivierung der Gerinnungskaskade kontrolliert.^{3, 23, 24} In der Entzündungsphase strömen Leukozyten in das Wundbett ein, was die antimikrobielle Abwehr verstärkt und die Synthese von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Faktoren (d.h. Zytokine und Wachstumsfaktoren) auslöst, die für die nachfolgenden Schritte der Gewebereparatur verantwortlich sind.⁴⁴⁻⁴⁶ Geleitet von Molekülen wie PDGF, FGF und TGF- β , bedeckt die nächste Phase (Proliferationsphase), die durch intensive Zellproliferation und Sekretion einer provisorischen EZM gekennzeichnet ist, den verletzten Bereich mit stark vaskularisiertem und hydratisiertem Gewebe.^{26, 36, 63} Anschließend führt die Apoptose von Leukozyten, die Herunterregulierung entzündungsfördernder Mediatoren und die Erhöhung entzündungshemmender Mediatoren, die zu einem Umbauprozess führen, zu einer Geweberegeneration oder -heilung.⁴⁴ Chronische Wunden sind durch eine anhaltende Entzündung, beeinträchtigte Angiogenese, schwierige Reepithelisierung und oder dysregulierte Menge von Zytokinen und Wachstumsfaktoren gekennzeichnet.¹⁹¹ Dabei werden beispielsweise TIMPs herunterreguliert, während Wachstumsfaktoren wie IL-6, TNF- α und MMPs ständig hochreguliert sind.⁶⁴ Für den Heilungsprozess ist es dabei wichtig, dass die Zellen migrieren und proliferieren können, deshalb gibt es für einen beschleunigten Wundheilungsprozess komplexer Gewebe oder chronischer Wunden verschiedene Therapieansätze. Die Wundaufgabe sollte so konzipiert sein, dass es die Gewebereparatur fördert, das Exsudat entfernt und eine Infektion an der Wunde verhindert.¹⁸⁸ Ein Ansatz ist, dass Zellen wie beispielsweise MSCs lokal transplantiert werden, allerdings ist die Lebensfähigkeit an der transplantierten Stelle oft schlecht.^{216, 217} 2D-Filme als Wundaufgabe haben den entscheidenden Nachteil, dass sie nicht quellen können, so dass es zu einer übermäßigen Ansammlung an Exsudat führen kann.³⁰¹ Deshalb ist ein vielversprechender Ansatz die Herstellung von 3D-Gerüsten aus Biomaterialien als künstliche extrazelluläre Matrix

für eine beschleunigte Wundheilung. Die 3D-Gerüste spiegeln das Zellverhalten in natürlicher Umgebung wieder. Dieser Therapieansatz hat den Vorteil, dass die 3D-Gerüste als Leitstruktur dienen und die Infiltration von Zellen erleichtert wird sowie Zelladhäsion, -migration und -proliferation begünstigt werden.^{313, 407} Zudem bieten sie Schutz, speichern Feuchtigkeit und fördern die Synthese neuer extrazellulärer Matrix und Angiogenese.^{300, 313} Gerüste oder Wundauflagen aus natürlichen Biomaterialien führen dazu, dass der Wundverband nicht wieder entfernt werden muss.²⁴ In dieser Arbeit wurde ein spezielles Herstellungsverfahren entwickelt, um 3D-Gerüste aus Kollagen Typ I herzustellen, die eine Umgebung bieten sollen, in der Zellen überleben, migrieren und proliferieren können. Anschließend sollte das Potenzial des zellbeladenen Kollagengerüsts für die Behandlung von Wunden analysiert werden, in dem die Zellen und Gerüste charakterisiert wurden und das angiogene Potenzial untersucht wurde. Ramanathan et al. zeigten, dass NIH 3T3-Fibroblasten und menschliche Keratinozyten (HaCaT) eine hervorragende Zelladhäsion und -proliferation in einem 3D-Kollagengerüst unterstützten. Das Kollagen wurde mit einem bioaktiven Extrakt kombiniert, um die Infektion an der Wundstelle zu reduzieren.⁴⁵⁷ Kürzlich wurde ebenfalls gezeigt, dass menschliche Fibroblasten ein normales Zellwachstum innerhalb von Wundauflagen auf der Basis von ZnO-Nanopartikeln mit Kollagen und ätherischem Öl zeigten.⁴⁵⁸

Mit Hilfe von CAD konnten verschiedene Formen für die Halterungen aus PLA designed werden. Durch das anschließende 3D-Drucken von Pluronic können die Strukturen einfach an die Wundgeometrie der Patienten angepasst werden. Pluronic dient dabei als Gießform, da Kollagen selbst aufgrund der fehlenden Formstabilität und scherverdünnenden Eigenschaften schwer gedruckt werden kann. Durch dieses Herstellungsverfahren konnte gezeigt werden, dass die 3D-Gerüste skalierbar sind, die Materialien sind recht kostengünstig und der Prozess selbst einfach durchführbar, so dass ein ökonomischer Herstellungsprozess entwickelt wurde. Kollagen selbst wird oft in der Wundheilung eingesetzt, da es der Hauptbestandteil der natürlichen EZM ist und durch die großen fibillären Strukturen für die mechanische Stabilität der EZM sorgt.⁴⁵⁹ Zudem ist Kollagen entscheidend für die Aufrechterhaltung der strukturellen und biologischen Integrität der EZM und zeigt keine Abstoßungsreaktionen. Im Wundheilungsprozess, insbesondere bei chronischen Wunden, spielt Kollagen aufgrund seiner chemotaktischen Fähigkeit eine wichtige Rolle.⁴⁶⁰ Es ist bekannt, dass Kollagen Typ I die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* durch die Bindung von spezifischen Integrinen stimuliert.

Zudem sorgt es für die Rekrutierung von Endothelzellen, die wiederum Angiogenese in heilenden Wunden fördern.¹⁷⁰ Kollagenfragmente dienen in der natürlichen Wundheilung als potente angiogene Signale, fördern die Proliferation von Fibroblasten, Migration von Keratinozyten und die Synthese von Wachstumsfaktoren.^{73, 74} Das Hydrogel aus Kollagen weist hydrophile Eigenschaften auf, hat einen hohen Wassergehalt und kann physikalisch quellen ohne sich aufzulösen, deshalb wäre es ideal für die Behandlung von trockenen Wunden geeignet. Zudem ist das 3D-Kollagengerüst transparent und bietet die Möglichkeit einer einfachen Wundüberwachung.³⁷¹ Da Kollagen als körpereigene Komponente biologisch abbaubar ist, eignet sich Kollagen ideal als Träger für eine gezielte Abgabe von Wirkstoffen.⁴⁶¹ Die lokale Behandlung von Wunden ist oft besser als eine systemische Verabreichung, da Wirkstoffe gezielter verabreicht werden können.^{205, 208, 210, 212} Deshalb wäre es im nächsten Schritt besonders interessant, die zellbeladenen Kollagengerüste zusätzlich mit Antibiotika, Antiseptika oder extrazellulären Vesikeln zu mischen, um zu untersuchen, ob die Wundheilung zusätzlich beschleunigt werden kann.

Neben der EZM selbst spielt die Interaktion zwischen Zellen und der EZM eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung. Deshalb wurde in dieser Arbeit das Kollagen vor dem Gießen mit HUVECs und ASCs beladen. Dabei sollte die Wechselwirkung zwischen den beiden Zelllinien und der Aufbau gefäßähnlicher Strukturen durch HUVECs analysiert werden. Die Zellzahl und auch die Zelllinien können innerhalb des Kollagens variiert werden, so dass durch den flexiblen Herstellungsprozess individuelle Wundaufgaben produziert werden können.

ASCs können leicht bei Eingriffen wie einer Liposuktion gewonnen werden. Sie haben ein hohes angiogenes Potenzial und können Wachstumsfaktoren und Zytokine sezernieren und so den Wundheilungsprozess durch ihre parakrine Aktivität stimulieren.^{103, 462} Zudem rekrutieren sie endogene Stammzellen und fördern deren Differenzierung, können toxische Substanzen durch die Produktion von antioxidativen Stoffen entfernen und sich selbst in verschiedene Zelltypen differenzieren.¹⁰³ Aus diesem Grund werden diese Stammzellen oft in der Behandlung von chronischen Wunden eingesetzt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stromazellen aus der Dermis (DSCs) gewonnen ebenfalls ein hohes Potenzial für die Behandlung von Wunden haben.⁴⁶³ *In vitro* Ansätze zeigten, dass DSCs im Vergleich zu ASCs eine erhöhte Heilungskapazität, eine größere parakrine Wirkung beim Schließen der Wunde von dermalen Fibroblasten und Keratinozyten und beim Induzieren von Angiogenese

aufwiesen. Allerdings führte das Isolierungsverfahren bei den ASCs zu 100-mal mehr Zellen als bei den DSCs. Nichtsdestotrotz sollten DSCs für zukünftige Anwendungen in der Wundbehandlung in Betracht gezogen werden.

Neben Stammzellen spielen auch Endothelzellen eine entscheidende Rolle im Wundheilungsprozess. Endothelzellen ermöglichen das Wachstum und das Überleben von neu gebildetem Gewebe, da die Endothelzellen für die Blutversorgung der Gewebe sorgen. Sie sorgen für die Bildung von neuen Kapillaren und somit für den Aufbau des Blutgefäßsystems.^{105, 106} Für die Zellen an weiter entfernten Orten vom Wundrand hängt das Überleben nur von der Kapillarbildung ab. Deshalb ist die Neovaskularisation eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Wundheilung.¹²² HUVECs dienen aus diesem Grund oft als Modellsystem für die Untersuchung von Hypoxie, Entzündungen, oxidativem Stress und Reaktionen auf Infektionen.¹²⁵ Wachstumsfaktoren fördern das Wachstum von Endothelzellen, allerdings sind bis jetzt nur wenige Wachstumsfaktoren von der FDA und EMA zugelassen. Zudem ist entscheidend, dass die Faktoren aufgrund der kurzen Halbwertszeit und des enzymatischen Abbaus in der Wunde nach und nach freigesetzt werden.²⁰⁹ Durch den in dieser Arbeit entwickelten Herstellungsprozess des Kollagengerüsts kann die Abgabe beispielsweise durch die Kollagenkonzentration und Dicke der Schicht gesteuert werden. Hierbei wurden HUVECs mit ASCs kultiviert, da ASCs selbst Wachstumsfaktoren sezernieren und so der aufwendige Zulassungsprozess umgangen werden kann. Zudem haben Rocha et al. im Jahr 2020 eine synergistische Wirkung von ASCs und HUVECs in einem Gellangum-Hydrogel mit hohem Potenzial für die Behandlung von Rückenmarksverletzungen gezeigt. HUVECs waren dabei nur in der Lage, gefäßähnliche Strukturen in Gegenwart von ASCs zu bilden.⁴⁶⁴ Durch die Zellbeladung während der 3D-Gerütherstellung kann eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleistet werden. So kann entweder ein schichtweiser Aufbau mit verschiedenen Zelllinien erfolgen oder die Zellen werden im Vorfeld in dem Biomaterial gemischt und zusammen kultiviert.⁴⁰⁵ Dadurch kann verhindert werden, dass es zu einer unzureichenden Vaskularisierung und einem heterogenen Gewebewachstum kommt. Dies ist oftmals der Fall bei der Besiedelung der Gerüste nach dem Herstellungsprozess.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem entwickelten Herstellungsverfahren stabile 3D-Kollagengerüste hergestellt werden können, die das Potenzial haben als Wundauflagen eingesetzt zu werden. Dabei mussten keine physikalischen oder chemischen Quervernetzter

eingesetzt werden, was die Biokompatibilität erhöht und die Kosten senkt.⁴¹⁶ Die Gerüste waren so konzipiert, dass sie nur an 2 Achsen befestigt waren und somit schwebten und eine bestmögliche Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gewährleistet war. In 2D-Kultivierung zeigte die Co-Kultivierung von HUVECs und ASCs eine Zellviabilität und Proliferation sowie typische Zellmorphologie beider Zelllinien über 19 Tage. Auch die Immobilisierung dieser beiden Zelllinien in den 3D-Kollagengerüsten zeigte keine toxische Wirkung auf die Zelllinien und die Zellen waren homogen verteilt. Dementsprechend muss die Porosität in den Kollagengerüsten gegeben sein, um ausreichend Nährstoffe und Sauerstoff zu transportieren. Zudem kann durch das Herstellungsverfahren die Porengröße und Porosität individuell variiert werden. Interessanterweise können die Zellen in Co-Kultivierung im Kollagengerüst eine Zugkraft auslösen und so das Kollagennetzwerk umgestalten. Es erfolgte eine Schrumpfung der Gerüste senkrecht zu der durch die Verankerungspunkte definierten Achse. Diese konnte stärker bei den Proben mit der Co-Kultur beobachtet werden. Mittels REM konnte demonstriert werden, dass die Kollagenfasern von Tag 6 zu Tag 19 durch die beiden Zelllinien neu strukturiert und oberflächlich parallel zueinander ausgerichtet wurden. Im natürlichen Wundheilungsprozess wird Kollagen ebenfalls umorganisiert, abgebaut und wieder neu abgelagert.⁸⁹ Dieser Prozess fördert die Wundheilung da der Umbau der EZM eine entscheidende Unterstützung für die Gefäßentwicklung bietet. Auch mittels AFM konnte beobachtet werden, dass die Kollagengerüste mit der Co-Kultur im Vergleich zu der Kultivierung von HUVECs alleine größere Bereiche hochgeordneter parallel angeordneter Kollagenfasern aufweist. Die Elastizitätsmodul-Verteilung weist einen deutlich höheren Wert auf, was die strukturellen Unterschiede innerhalb des Gerüsts zeigt. Bei den HUVECs alleine können große Bereiche ungeordneter Kollagenfasern beobachtet werden. Die ausgerichteten Kollagenfasern zeigten in beiden Zellkulturgruppen eine d-Periodizität von 67 nm. Das D-Band-Muster mit einer ~67 nm-Periode von Kollagenfibrillen wurde mit einer Vielzahl von Techniken bestimmt.⁴⁶⁵

Mittels Angiogenese Array konnte das angiogene Potenzial der zellbeladenen 3D-Kollagengerüste untersucht werden. Sowohl ASCs, die selbst ein angiogenes Potenzial besitzen, als auch HUVECs sind entscheidend für die Gefäßneubildung. Bei der Co-Kultivierung sind die Wachstumsfaktoren Serpin F1 und uPa nach 6 Tagen Kultivierung in den Kollagengerüsten im Vergleich zu HUVECs alleine leicht erhöht. Deutlich stärker beobachtet

man die Hochregulation bei Serpin E1 und TIMP-1. Nach 19 Tagen sind die beiden Wachstumsfaktoren erneut angestiegen im Vergleich zu dem Zeitpunkt nach 6 Tagen Inkubation. Serpin E1 fördert die Zelladhäsion und -migration und spielt eine wesentliche Rolle im Matrixumbau. Eine Fehlregulation von Serpin E1 ist ein ursächlicher Faktor für eine abnormale Wundheilung und Fibrose.¹⁵⁰ TIMP-1 hingegen steht im engen Zusammenspiel mit MMPs und verhindert somit den weiteren Abbau der EZM und durch die reversible Hemmung der MMP-Aktivität fördert es den Aufbau von neuer EZM.¹⁴⁰ TIMP-1 induziert zudem die Veränderungen in den Zellmorphologien und stimuliert das Zellwachstum verschiedener Zelltypen.⁵⁵ Die Hochregulation dieser beiden entscheidenden Wachstumsfaktoren während der Wundheilung zeigt das angiogene Potenzial der Kollagengerüste mit HUVECs und ASCs. Interessanterweise wird TSP-1 herunterreguliert. Wie bereits zuvor erwähnt, ist die Rolle von TSP-1 in der Geweberegeneration und -reparatur umstritten. Es konnten erhöhte Mengen von TSP-1 in der EZM von frühen Wundstadien und um die Gefäße des Wundverschlusses während der späten Stadien nachgewiesen werden.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass die Heilung von Hautwunden in TSP-1 transgenen Mäusen stark verzögert war, und mit einer verringerten Bildung von Granulationsgewebe und einer stark verminderten Angiogenese der Wunde verbunden war.¹⁴⁵ Zusammengefasst zeigen die Daten, dass durch TSP-1 vorzugsweise die mit der Wundheilung verbundene Angiogenese gestört ist. Deshalb ist die Herunterregulation in der Co-Kultur ein weiterer Anhaltspunkt für das angiogene Potenzial. Der kritischste Schritt im Wundheilungsprozess ist die Versorgung des neu gebildeten Gewebes mit Sauerstoff und essentiellen Nährstoffen. Daher ist die Bildung neuer Blutgefäße in der Wunde zwingend erforderlich. Mittels *Tube Formation Assay* konnte eine deutliche Röhrenbildung der HUVECs beobachtet werden, wenn sie mit dem Überstand aus den in den Kollagengerüsten kultivierten HUVECs und ASCs inkubiert wurden. Die kapillarähnlichen Strukturen werden von den Endothelzellen als Reaktion auf das Vorhandensein von angiogenen Wachstumsfaktoren gebildet.⁴⁶⁶ Mit dem Zellüberstand der Co-Kultur in den Kollagengerüsten nach 19 Tagen Inkubation konnte eine Röhrenbildung beobachtet werden, während bei den HUVECs alleine die Gesamtzahl der gebildeten Röhren, die Gesamtzahl der Verzweigungspunkte und die von den Röhren bedeckte Fläche über 19 Tage abnimmt. Somit konnte erneut gezeigt werden, dass die freigesetzten Wachstumsfaktoren der ASCs in Kombination mit dem Kollagengerüst einen positiven Einfluss

auf das angiogene Potenzial aufweisen. Sierra-Parraga et al. konnte sogar zeigen, dass MSCs in direktem Kontakt mit verletzten HUVECs die Wundheilungskapazität um 45% verbessern und die angiogene Kapazität der HUVECs vollständig wiederherstellen konnten.⁴⁶⁷ HUVECs wurden zuvor einer Hypoxie- und Reoxygenierungsbehandlung unterzogen. Im Anschluss wurde untersucht, ob eine physikalische Interaktion oder lösliche Faktoren, die von MSCs freigesetzt werden, für die potenziellen regenerativen Wirkungen von MSCs auf Endothezellen verantwortlich sind. Die Ergebnisse zeigten, dass MSCs über einen Mechanismus verfügen, der sowohl physische als auch parakrine Interaktionen erfordert, und dadurch eine regenerative Wirkung auf verletzte HUVECs haben.

Zusammengefasst zeigen die in der vorliegenden Arbeit entworfenen 3D-Kollagengerüste zusammen mit der Co-Kultur aus HUVECs und ASCs ein hohes Potenzial für die Behandlung von Wunden. In weiterführenden *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen könnte die antimikrobielle Wirkung untersucht werden. Ein Nachteil von Hydrogelen ist ihre schlechte bakterielle Barriereeigenschaft, deshalb wäre es interessant die Kollagengerüste neben den Zellen noch mit beispielsweise Antibiotikum, Antiseptikum oder Antioxidantien zu beladen.¹⁹ Dadurch kann die Keimbelastung der Wunde und eine Ausbreitung der Infektion vermieden werden.²⁹⁹ Eine potentielle neuartige Wundauflage auf der Basis von Kollagen, einem Öl und funktionalisierten ZnO-Nanopartikeln wurde kürzlich entwickelt, das eine Wundsepsis in chronischen Wunden reduzieren soll.⁴⁵⁸ *In vitro* konnte keine Toxizität der Nanopartikel festgestellt werden, da menschliche Fibroblasten ein normales Wachstum und ihre Membranintegrität in Gegenwart der mit Orangenöl funktionalisierten Nanopartikel beibehielten. Zudem konnte eine gute antibakterielle Aktivität demonstriert werden. Die Freisetzung der antimikrobiellen Substanzen aus dem Gerüst kann durch die Zusammensetzung oder Ladung gesteuert werden. Kollagen kann beispielsweise mit einem weiteren Biomaterial gemischt werden, so dass eine gut organisierte Struktur gebildet werden kann bei der die Porosität und Porengröße variiert werden kann. Ramanathan et al. veröffentlichte 2020 eine Studie in der eine zweischichtige Matrix durch Elektrosponning einer hybriden Celluloseacetat-Nanofaser und einer 3D-Matrix aus Kollagen hergestellt wurde.⁴⁶⁸ So bestand die obere Schicht aus dem nanofaserigen Teil und die untere aus einem schwammartigen porösen Teil. Dadurch konnten die physikalischen und biologischen Eigenschaften verstärkt werden und eine hohe Porosität, Quellung und Stabilität der Gerüste

sowie eine hohe Biokompatibilität konnte demonstriert werden. Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Kollagengerüste könnten ebenfalls mit einem Nanovlies als obere Schicht kombiniert werden. Interessant wäre auch die Verkapselung der Wirkstoffe bevor sie mit dem Kollagen gemischt werden. Liposomen werden bereits eingesetzt, die im Inneren Wachstumsfaktoren wie z.B. bFGF enthalten.^{231, 232} Zudem werden bereits mit Gold oder Silber beladene Nanopartikel aus Polymeren aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung eingesetzt.^{230, 233-236} Um die Nährstoffversorgung zu verbessern, werden in neuesten Studien sauerstofffreisetzen Materialien wie Calciumperoxid in 3D-Gerüste integriert. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch die Hypoxie gelindert werden konnte und die Zellproliferation gewährleistet wurde.³⁴⁰ Mit Hilfe der oben beschriebenen Technologien könnten die 3D-Kollagengerüste modular aufgebaut werden und an die Bedürfnisse des Patienten individuell angepasst werden.

In einem weiteren Projekt wurde, statt Kollagen, AAM, eine dezellularisierte Matrix, die rein natürlich gewonnen wurde und injizierbar ist, für die Herstellung eines 3D-Gerüsts verwendet. Sie kann im Anschluss als Gerüst für patienteneigene Zellen oder diverse Zelllinien dienen. Leider weist AAM schwache mechanische Eigenschaften auf, so dass es aufgrund des schlechten Fließverhaltens alleine nicht gedruckt werden kann. Zudem ändert sich die Flussrate über die Zeit durch eine inhomogene Zusammensetzung von AAM und eine unterschiedlich starke Vernetzung der EZM-Komponenten. Deshalb wurde eine Mischung mit optimalen Verhältnis aus AAM und Pluronic entwickelt, so dass formstabile Gerüste hergestellt werden konnten. AAM sorgt dabei für die Biokompatibilität während Pluronic dem Gerüst die nötige Stabilität gibt. Mittels 3D-Druck können so Schicht-für-Schicht komplexe und heterogene Strukturen hergestellt werden.⁴¹⁸ Im nächsten Schritt sollte die Stabilität der Gerüste in Zellkulturmedium überprüft werden bevor das AAM/Pluronic-Gemisch mit Zellen beladen wird. Eine umfangreiche Charakterisierung der vorliegenden 3D-Gerüste mit möglichen Modifikationen, sollte das angiogene Potenzial demonstrieren. Mit Hilfe des *Bioprinting* Verfahrens können potentielle Wundauflagen für die Verbesserung der Heilung designed werden, die an die Bedürfnisse des Patienten angepasst werden können.

5. Literaturverzeichnis

1. Reinke J and Sorg H. Wound repair and regeneration. *European surgical research* 2012; 49: 35-43.
2. Krafts KP. Tissue repair: The hidden drama. *Organogenesis* 2010; 6: 225-233.
3. Enoch S and Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)* 2008; 26: 31-37.
4. Mehendale HM. Role of Tissue Repair and Death Proteins in Liver Injury. *Drug-Induced Liver Disease*. Elsevier, 2013, pp.195-213.
5. Montagna W. *The structure and function of skin*. Elsevier, 2012.
6. Nejati R, Kovacic D and Slominski A. Neuro-immune-endocrine functions of the skin: an overview. *Expert review of dermatology* 2013; 8: 581-583.
7. Zhao R, Liang H, Clarke E, et al. Inflammation in chronic wounds. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 2085.
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell, 6th Edition. *Garland Science* 2014.
9. Pasparakis M, Haase I and Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 289-301.
10. Rousselle P, Braye F and Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2019; 146: 344-365.
11. Kupper TS and Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 211-222.
12. Cañedo-Dorantes L and Cañedo-Ayala M. Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International journal of inflammation* 2019; 2019.
13. Sen CK. Human wound and its burden: updated 2020 compendium of estimates. Mary Ann Liebert, Inc., Publishers 140 Huguenot Street, 3rd Floor New ..., 2021, p. 281-292.
14. Olsson M, Järbrink K, Divakar U, et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a systematic review. *Wound Repair Regen* 2019; 27: 114-125.
15. Las Heras K, Igartua M, Santos-Vizcaino E, et al. Chronic wounds: Current status, available strategies and emerging therapeutic solutions. *J Control Release* 2020; 328: 532-550.
16. Eming SA, Martin P and Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine* 2014; 6: 265sr266-265sr266.
17. Groah SL, Libin A, Spungen M, et al. Regenerating matrix-based therapy for chronic wound healing: a prospective within-subject pilot study. *International Wound Journal* 2011; 8: 85-95.
18. Gould L, Abadir P, Brem H, et al. Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research. *Wound Repair Regen* 2015; 23: 1-13.
19. Weller CD, Team V and Sussman G. First-line interactive wound dressing update: a comprehensive review of the evidence. *Frontiers in Pharmacology* 2020; 11: 155.
20. Powers JG, Higham C, Broussard K, et al. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. *J Am Acad Dermatol* 2016; 74: 607-625.
21. Cheng Q, Gibb M, Graves N, et al. Cost-effectiveness analysis of guideline-based optimal care for venous leg ulcers in Australia. *BMC Health Services Research* 2018; 18: 1-13.
22. Sun H, Pulakat L and Anderson DW. Challenges and New Therapeutic Approaches in the Management of Chronic Wounds. *Current Drug Targets* 2020; 21: 1264-1275.
23. Shah SA, Sohail M, Khan S, et al. Biopolymer-based biomaterials for accelerated diabetic wound healing: A critical review. *Int J Biol Macromol* 2019; 139: 975-993.
24. Kalashnikova I, Das S and Seal S. Nanomaterials for wound healing: scope and advancement. *Nanomedicine* 2015; 10: 2593-2612.
25. Bernardes BG, Del Gaudio P, Alves P, et al. Bioaerogels: promising nanostructured materials in fluid management, healing and regeneration of wounds. *Molecules* 2021; 26: 3834.

26. Sun BK, Sibrashvili Z and Khavari PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science* 2014; 346: 941-945.
27. Li J, Chen J and Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology* 2007; 25: 9-18.
28. Singer AJ and Clark RA. Cutaneous wound healing. *New Engl J Med* 1999; 341: 738-746.
29. Monaco JL and Lawrence WT. Acute wound healing: an overview. *Clin Plast Surg* 2003; 30: 1-12.
30. Rodero MP and Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *International journal of clinical and experimental pathology* 2010; 3: 643.
31. Gouin O, L'herondelle K, Lebonvallet N, et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein & cell* 2017; 8: 644-661.
32. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, et al. Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews* 2019; 99: 665-706.
33. Maynard J and Collings C. How Wounds Heal: The 4 Main Phases of Wound Healing. *Ostomy and Wound Care Shield HealthCare* 2015.
34. Reish RG and Eriksson E. Scars: a review of emerging and currently available therapies. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122: 1068-1078.
35. Golebiewska EM and Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood reviews* 2015; 29: 153-162.
36. Hardwicke J, Schmaljohann D, Boyce D, et al. Epidermal growth factor therapy and wound healing—past, present and future perspectives. *The Surgeon* 2008; 6: 172-177.
37. Tamagawa-Mineoka R. Important roles of platelets as immune cells in the skin. *Journal of Dermatological Science* 2015; 77: 93-101.
38. Nami N, Feci L, Napoliello L, et al. Crosstalk between platelets and PBMC: new evidence in wound healing. *Platelets* 2016; 27: 143-148.
39. Thushara R, Hemshekhar M, Kemparaju K, et al. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: an outlook. *Critical reviews in oncology/hematology* 2015; 93: 149-158.
40. Sinno H and Prakash S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plastic surgery international* 2013; 2013.
41. Björk J, Hugli TE and Smedegård G. Microvascular effects of anaphylatoxins C3a and C5a. *The Journal of Immunology* 1985; 134: 1115-1119.
42. Clark RA. *The molecular and cellular biology of wound repair*. Springer Science & Business Media, 2013.
43. Hasnain MS, Nayak AK and Alkahtani S. *Polymeric and Natural Composites*. Springer, 2021.
44. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314-321.
45. Su Y and Richmond A. Chemokine regulation of neutrophil infiltration of skin wounds. *Adv Wound Care* 2015; 4: 631-640.
46. Ridiandries A, Tan J and Bursill CA. The role of chemokines in wound healing. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 3217.
47. Wilgus TA, Roy S and McDaniel JC. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv Wound Care* 2013; 2: 379-388.
48. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 519-531.
49. Morton LM and Phillips TJ. Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *J Am Acad Dermatol* 2016; 74: 589-605.
50. Havran WL and Jameson JM. Epidermal T cells and wound healing. *The Journal of Immunology* 2010; 184: 5423-5428.
51. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology* 2013; 229: 176-185.

52. Ferrante CJ and Leibovich SJ. Regulation of macrophage polarization and wound healing. *Adv Wound Care* 2012; 1: 10-16.
53. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, et al. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Frontiers in physiology* 2018; 9: 419.
54. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, et al. Regulation of Matrix Metalloproteinase Activity a. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994; 732: 31-41.
55. Gomez D, Alonso D, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European journal of cell biology* 1997; 74: 111-122.
56. Hu MS, Borrelli MR, Lorenz HP, et al. Mesenchymal stromal cells and cutaneous wound healing: a comprehensive review of the background, role, and therapeutic potential. *Stem cells international* 2018; 2018.
57. Gonzales KAU and Fuchs E. Skin and its regenerative powers: an alliance between stem cells and their niche. *Developmental cell* 2017; 43: 387-401.
58. Liu L, Yu Y, Hou Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *Plos One* 2014; 9: e88348.
59. Yeung AW, Terentis AC, King NJ, et al. Role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in health and disease. *Clinical science* 2015; 129: 601-672.
60. Motegi S-i and Ishikawa O. Mesenchymal stem cells: the roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth. *Journal of Dermatological Science* 2017; 86: 83-89.
61. Wynn TA and Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* 2016; 44: 450-462.
62. Landén NX, Li D and Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2016; 73: 3861-3885.
63. Efron PA and Moldawer LL. Cytokines and wound healing: the role of cytokine and anticytokine therapy in the repair response. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 2004; 25: 149-160.
64. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 585-601.
65. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of dermatological science* 2013; 72: 206-217.
66. Werner S, Krieg T and Smola H. Keratinocyte–fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 998-1008.
67. Xu J, Lamouille S and Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research* 2009; 19: 156-172.
68. Donovan J, Abraham D and Norman J. Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013; 18: 106-119.
69. Kaltalioglu K and Coskun-Cevher S. A bioactive molecule in a complex wound healing process: platelet-derived growth factor. *International journal of dermatology* 2015; 54: 972-977.
70. Wynn TA and Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. In: *Seminars in liver disease* 2010, pp.245-257. © Thieme Medical Publishers.
71. Narauskaitė D, Vydmantaitė G, Rusteikaitė J, et al. Extracellular vesicles in skin wound healing. *Pharmaceuticals* 2021; 14: 811.
72. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, et al. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Adv Wound Care* 2014; 3: 445-464.
73. Rousselle P, Montmasson M and Garnier C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix Biology* 2019; 75: 12-26.
74. Nyström A and Bruckner-Tuderman L. Matrix molecules and skin biology. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2019, pp.136-146. Elsevier.
75. Moccia F, Negri S, Shekha M, et al. Endothelial Ca²⁺ signaling, angiogenesis and vasculogenesis: just what it takes to make a blood vessel. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 3962.

76. Dejana E, Languino L, Polentarutti N, et al. Interaction between fibrinogen and cultured endothelial cells. Induction of migration and specific binding. *The Journal of clinical investigation* 1985; 75: 11-18.
77. Manes S, Mira E, Gomez-Mouton C, et al. Cells on the move: a dialogue between polarization and motility. *IUBMB life* 2000; 49: 89-96.
78. Velnar T and Gradisnik L. Tissue augmentation in wound healing: the role of endothelial and epithelial cells. *Medical Archives* 2018; 72: 444.
79. Brancato SK and Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *The American journal of pathology* 2011; 178: 19-25.
80. Epelman S, Lavine KJ and Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 2014; 41: 21-35.
81. Willenborg S, Lucas T, Van Loo G, et al. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2012; 120: 613-625.
82. Murdoch C, Muthana M and Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *The Journal of Immunology* 2005; 175: 6257-6263.
83. Skuli N, Majmundar AJ, Krock BL, et al. Endothelial HIF-2 α regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122: 1427-1443.
84. Rezvani HR, Ali N, Serrano-Sanchez M, et al. Loss of epidermal hypoxia-inducible factor-1 α accelerates epidermal aging and affects re-epithelialization in human and mouse. *Journal of cell science* 2011; 124: 4172-4183.
85. Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, et al. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circulation research* 2015; 116: 1231-1244.
86. Xue M, Zhao R, Lin H, et al. Delivery systems of current biologicals for the treatment of chronic cutaneous wounds and severe burns. *Advanced drug delivery reviews* 2018; 129: 219-241.
87. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *the Journal of immunology* 2008; 180: 2581-2587.
88. Rustad KC, Wong VW, Sorkin M, et al. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials* 2012; 33: 80-90.
89. Xue M and Jackson CJ. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv Wound Care* 2015; 4: 119-136.
90. Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing. *Current research in translational medicine* 2016; 64: 171-177.
91. Marshall CD, Hu MS, Leavitt T, et al. Cutaneous scarring: basic science, current treatments, and future directions. *Adv Wound Care* 2018; 7: 29-45.
92. Venkei ZG and Yamashita YM. Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *Journal of Cell Biology* 2018; 217: 3785-3795.
93. Friedenstein A, Deriglasova U, Kulagina N, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology* 1974; 2: 83-92.
94. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
95. Horwitz E, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7: 393-395.
96. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007; 131: 324-336.
97. Uccelli A, Moretta L and Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 726-736.

98. Saleh M. The impact of mesenchymal stem cells on differentiation of hematopoietic stem cells. *Advanced pharmaceutical bulletin* 2015; 5: 299.
99. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert opinion on biological therapy* 2003; 3: 705-713.
100. Bray GA. Medical consequences of obesity. *The Journal of clinical endocrinology & metabolism* 2004; 89: 2583-2589.
101. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, et al. Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World journal of stem cells* 2011; 3: 25.
102. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109: 1292-1298.
103. Gimble JM, Katz AJ and Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* 2007; 100: 1249-1260.
104. Sinha M, Sen CK, Singh K, et al. Direct conversion of injury-site myeloid cells to fibroblast-like cells of granulation tissue. *Nat Commun* 2018; 9: 1-19.
105. Diegelmann RF and Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front biosci* 2004; 9: 283-289.
106. Velnar T, Bailey T and Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research* 2009; 37: 1528-1542.
107. Schreiber AB, Kenney J, Kowalski WJ, et al. Interaction of endothelial cell growth factor with heparin: characterization by receptor and antibody recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1985; 82: 6138-6142.
108. Krizbai IA, Bauer H, Amberger A, et al. Growth factor-induced morphological, physiological and molecular characteristics in cerebral endothelial cells. *European Journal of Cell Biology* 2000; 79: 594-600.
109. Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, et al. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *The Journal of cell biology* 1985; 101: 2330-2334.
110. Kan M and Shi E-G. Fibronectin, not laminin, mediates heparin-dependent heparin-binding growth factor type I binding to substrata and stimulation of endothelial cell growth. *In vitro cellular & developmental biology* 1990; 26: 1151-1156.
111. Ribatti D, Vacca A, Roncali L, et al. Angiogenesis under normal and pathological conditions. *Haematologica* 1991; 76: 311-320.
112. Zhang Q-X, Magovern CJ, Mack CA, et al. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *Journal of Surgical Research* 1997; 67: 147-154.
113. Oike Y, Ito Y, Maekawa H, et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood* 2004; 103: 3760-3765.
114. Folkman J and Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
115. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent progress in hormone research* 2000; 55: 15-35; discussion 35.
116. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *The Journal of clinical investigation* 1994; 93: 662-670.
117. English D, Kovala AT, Welch Z, et al. Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *Journal of hematotherapy & stem cell research* 1999; 8: 627-634.
118. Risau W. Angiogenic growth factors. *Progress in growth factor research* 1990; 2: 71-79.
119. Robson MC, Steed DL and Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current problems in surgery* 2001; 38: 72-140.
120. Hunt TK, Hopf H and Hussain Z. Physiology of wound healing. *Advances in skin & wound care* 2000; 13: 6.

121. Phillips SJ. Physiology of wound healing and surgical wound care. *ASAIO journal* 2000; 46: S2-S5.
122. Laing A, Dillon J, Condon E, et al. Mobilization of endothelial precursor cells: systemic vascular response to musculoskeletal trauma. *J Orthop Res* 2007; 25: 44-50.
123. Augustin HG, Kozian DH and Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 1994; 16: 901-906.
124. Wilkinson PC. *Chemotaxis and inflammation*. Churchill Livingstone, 1982.
125. Medina-Leyte DJ, Dominguez-Perez M, Mercado I, et al. Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: A review. *Applied Sciences* 2020; 10: 938.
126. Bessa PC, Casal M and Reis R. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen M* 2008; 2: 1-13.
127. Itoh F, Asao H, Sugamura K, et al. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *The EMBO journal* 2001; 20: 4132-4142.
128. Horan GS, Wood S, Ona V, et al. Partial inhibition of integrin $\alpha\beta6$ prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *Am J Resp Crit Care* 2008; 177: 56-65.
129. Attisano L and Wrana JL. Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science* 2002; 296: 1646-1647.
130. Andrae J, Gallini R and Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development* 2008; 22: 1276-1312.
131. Cao R, Bråkenhielm E, Pawliuk R, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nature medicine* 2003; 9: 604-613.
132. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling* 2007; 19: 2003-2012.
133. Escudier B. Anti-VEGF therapy for renal cell carcinoma. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O* 2007; 5: 530-531.
134. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373: 699-702.
135. Sabino F and Keller U. Matrix metalloproteinases in impaired wound healing. *Metalloproteinases Med* 2015; 2: 1-8.
136. Sternlicht MD and Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Bi* 2001; 17: 463-516.
137. Overall CM and López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 657-672.
138. Martins VL, Caley M and O'Toole EA. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and tissue research* 2013; 351: 255-268.
139. Malesmud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006; 11: 1696-1701.
140. Khokha R, Murthy A and Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 649-665.
141. Raugi GJ, Olerud JE and Gown AM. Thrombospondin in early human wound tissue. *J Invest Dermatol* 1987; 89: 551-554.
142. Reed M, Puolakkainen P, Lane TF, et al. Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1993; 41: 1467-1477.
143. DiPietro LA, Nissen NN, Gamelli RL, et al. Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *The American journal of pathology* 1996; 148: 1851.
144. Roth JJ, Albo D, Rothman VL, et al. Thrombospondin-1 and its CSVTCG-specific receptor in wound healing and cancer. *Annals of plastic surgery* 1998; 40: 494-501.

145. Streit M, Velasco P, Riccardi L, et al. Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. *The EMBO journal* 2000; 19: 3272-3282.
146. Madhyastha H, Radha K, Nakajima Y, et al. uPA dependent and independent mechanisms of wound healing by C-phycocyanin. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 2691-2703.
147. Planus E, Barlovatz-Meimon G, Rogers RA, et al. Binding of urokinase to plasminogen activator inhibitor type-1 mediates cell adhesion and spreading. *Journal of cell science* 1997; 110: 1091-1098.
148. Providence KM, Kutz SM, Staiano-Coico L, et al. PAI-1 gene expression is regionally induced in wounded epithelial cell monolayers and required for injury repair. *Journal of cellular physiology* 2000; 182: 269-280.
149. Rømer J, Bugge TH, Pyke C, et al. Plasminogen and wound healing. *Nature medicine* 1996; 2: 725-725.
150. Simone TM and Higgins PJ. Inhibition of SERPINE1 function attenuates wound closure in response to tissue injury: a role for PAI-1 in re-epithelialization and granulation tissue formation. *Journal of Developmental Biology* 2015; 3: 11-24.
151. Providence KM and Higgins PJ. PAI-1 expression is required for epithelial cell migration in two distinct phases of in vitro wound repair. *Journal of cellular physiology* 2004; 200: 297-308.
152. Providence KM, Higgins SP, Mullen A, et al. SERPINE1 (PAI-1) is deposited into keratinocyte migration "trails" and required for optimal monolayer wound repair. *Arch Dermatol Res* 2008; 300: 303-310.
153. Michalczyk ER, Chen L, Fine D, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) as a regulator of wound angiogenesis. *Scientific reports* 2018; 8: 1-13.
154. Fedyk ER, Jones D, Critchley HO, et al. Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing. *The Journal of Immunology* 2001; 166: 5749-5754.
155. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al. Tissue renewal, regeneration, and repair. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease 8th ed Philadelphia: Saunders/Elsevier* 2010: 79-110.
156. Brodsky B and Ramshaw JA. The collagen triple-helix structure. *Matrix biology* 1997; 15: 545-554.
157. Reilly DM and Lozano J. Skin collagen through the lifestages: Importance for skin health and beauty. *Plastic and Aesthetic Research* 2021; 8: 2.
158. Ricard-Blum S. The collagen family. *Csh Perspect Biol* 2011; 3: a004978.
159. Gould LJ. Topical collagen-based biomaterials for chronic wounds: rationale and clinical application. *Adv Wound Care* 2016; 5: 19-31.
160. Wenzel D, Schmidt A, Reimann K, et al. Endostatin, the proteolytic fragment of collagen XVIII, induces vasorelaxation. *Circulation research* 2006; 98: 1203-1211.
161. Mouw JK, Ou G and Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature reviews Molecular cell biology* 2014; 15: 771-785.
162. Hynes RO. Stretching the boundaries of extracellular matrix research. *Nature reviews Molecular cell biology* 2014; 15: 761.
163. Frantz C, Stewart KM and Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* 2010; 123: 4195-4200.
164. El Masry MS, Chaffee S, Das Ghatak P, et al. Stabilized collagen matrix dressing improves wound macrophage function and epithelialization. *The FASEB Journal* 2019; 33: 2144-2155.
165. Das A, Abas M, Biswas N, et al. A modified collagen dressing induces transition of inflammatory to reparative phenotype of wound macrophages. *Scientific reports* 2019; 9: 1-10.
166. Das A, Datta S, Roche E, et al. Novel mechanisms of Collagenase Santyl Ointment (CSO) in wound macrophage polarization and resolution of wound inflammation. *Scientific reports* 2018; 8: 1-14.
167. Rosique RG, Rosique MJ and Farina Junior JA. Curbing inflammation in skin wound healing: a review. *International journal of inflammation* 2015; 2015.
168. Elgharably H, Roy S, Khanna S, et al. A modified collagen gel enhances healing outcome in a preclinical swine model of excisional wounds. *Wound Repair Regen* 2013; 21: 473-481.

169. Marchand M, Monnot C, Muller L, et al. Extracellular matrix scaffolding in angiogenesis and capillary homeostasis. In: *Seminars in cell & developmental biology* 2019, pp.147-156. Elsevier.
170. Kisling A, Lust RM and Katwa LC. What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease? *Life sciences* 2019; 228: 30-34.
171. Twardowski T, Fertala A, Orgel J, et al. Type I collagen and collagen mimetics as angiogenesis promoting superpolymers. *Current pharmaceutical design* 2007; 13: 3608-3621.
172. Barnes M. Update on collagens: What you need to know and consider. *Plastic Surgical Nursing* 2019; 39: 112-115.
173. San Antonio JD, Jacenko O, Fertala A, et al. Collagen structure-function mapping informs applications for regenerative medicine. *Bioengineering* 2020; 8: 3.
174. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Adv Mater* 2019; 31: 1801651.
175. Kanzler MH, Gorsulowsky DC and Swanson NA. Basic mechanisms in the healing cutaneous wound. *The Journal of dermatologic surgery and oncology* 1986; 12: 1156-1164.
176. Mathew-Steiner SS, Roy S and Sen CK. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering* 2021; 8: 63.
177. Schultz G, Chin G, Moldawer L, et al. *Ch23 Mechanisms of Vascular Disease*. University of Adelaide Press, 2011.
178. Sprangers S and Everts V. Molecular pathways of cell-mediated degradation of fibrillar collagen. *Matrix Biology* 2019; 75: 190-200.
179. Feng X, Tonnesen MG, Mousa SA, et al. Fibrin and collagen differentially but synergistically regulate sprout angiogenesis of human dermal microvascular endothelial cells in 3-dimensional matrix. *International journal of cell biology* 2013; 2013.
180. Kirkpatrick ND, Andreou S, Hoying JB, et al. Live imaging of collagen remodeling during angiogenesis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2007; 292: H3198-H3206.
181. Kareva I, Abou-Slaybi A, Dodd O, et al. Normal wound healing and tumor angiogenesis as a game of competitive inhibition. *Plos One* 2016; 11: e0166655.
182. Ricard-Blum S and Ballut L. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Front Biosci* 2011; 16: 674-697.
183. Guo Sa and DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research* 2010; 89: 219-229.
184. Govindaraju P, Todd L, Shetye S, et al. CD44-dependent inflammation, fibrogenesis, and collagenolysis regulates extracellular matrix remodeling and tensile strength during cutaneous wound healing. *Matrix Biology* 2019; 75: 314-330.
185. Koivisto L, Heino J, Häkkinen L, et al. Integrins in wound healing. *Adv Wound Care* 2014; 3: 762-783.
186. Zeltz C and Gullberg D. The integrin–collagen connection—a glue for tissue repair? *Journal of cell science* 2016; 129: 653-664.
187. Profyris C, Tziotzios C and Do Vale I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part I. The molecular basis of scar formation. *J Am Acad Dermatol* 2012; 66: 1-10.
188. Pinto AM, Cerqueira MA, Bañobre-López M, et al. Bacteriophages for chronic wound treatment: From traditional to novel delivery systems. *Viruses* 2020; 12: 235.
189. Howell-Jones R, Wilson M, Hill KE, et al. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 2005; 55: 143-149.
190. Johnson TR, Gómez BI, McIntyre MK, et al. The cutaneous microbiome and wounds: new molecular targets to promote wound healing. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 2699.
191. Martin P and Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Brit J Dermatol* 2015; 173: 370-378.
192. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 248-261.

193. Kolaczowska E and Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 159-175.
194. Usui ML, Mansbridge JN, Carter WG, et al. Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2008; 56: 687-696.
195. Demidova-Rice TN, Hamblin MR and Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Advances in skin & wound care* 2012; 25: 349.
196. Stojadinovic O, Pastar I, Vukelic S, et al. Deregulation of keratinocyte differentiation and activation: a hallmark of venous ulcers. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 2675-2690.
197. Cha J, Kwak T, Butmarc J, et al. Fibroblasts from non-healing human chronic wounds show decreased expression of β ig-h3, a TGF- β inducible protein. *Journal of dermatological science* 2008; 50: 15-23.
198. Patel S, Maheshwari A and Chandra A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. *J Wound Care* 2016; 25: 46-55.
199. Volk SW, Iqbal SA and Bayat A. Interactions of the extracellular matrix and progenitor cells in cutaneous wound healing. *Adv Wound Care* 2013; 2: 261-272.
200. Klingberg F, Hinz B and White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of pathology* 2013; 229: 298-309.
201. Wynn TA and Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine* 2012; 18: 1028-1040.
202. Pakshir P and Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biology* 2018; 68: 81-93.
203. Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, et al. Advances in skin regeneration using tissue engineering. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 789.
204. Ramasubbu DA, Smith V, Hayden F, et al. Systemic antibiotics for treating malignant wounds. *Cochrane Db Syst Rev* 2017.
205. Daeschlein G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *International Wound Journal* 2013; 10: 9-14.
206. de Souza KS, Cantaruti TA, Azevedo GM, et al. Improved cutaneous wound healing after intraperitoneal injection of alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Experimental dermatology* 2015; 24: 198-203.
207. Aydin H, Tatar C, Savas OA, et al. The effects of local and systemic administration of proline on wound healing in rats. *Journal of Investigative Surgery* 2019; 32: 523-529.
208. O'Meara S, Al-Kurdi D, Ologun Y, et al. Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers. *Cochrane Db Syst Rev* 2014.
209. Nour S, Baheiraei N, Imani R, et al. A review of accelerated wound healing approaches: biomaterial-assisted tissue remodeling. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2019; 30: 1-15.
210. Norman G, Dumville JC, Moore ZE, et al. Antibiotics and antiseptics for pressure ulcers. *Cochrane Db Syst Rev* 2016.
211. Sibbald RG, Elliott JA, Ayello EA, et al. Optimizing the moisture management tightrope with wound bed preparation 2015©. *Advances in skin & wound care* 2015; 28: 466-476.
212. Degreef HJ. How to heal a wound fast. *Dermatologic clinics* 1998; 16: 365-375.
213. Otero-Viñas M and Falanga V. Mesenchymal stem cells in chronic wounds: the spectrum from basic to advanced therapy. *Adv Wound Care* 2016; 5: 149-163.
214. Sivamani RK, Ma BR, Wehrli LN, et al. Phytochemicals and naturally derived substances for wound healing. *Adv Wound Care* 2012; 1: 213-217.
215. Pereira RF and Bartolo PJ. Traditional therapies for skin wound healing. *Adv Wound Care* 2016; 5: 208-229.

216. Wu Y, Wang J, Scott PG, et al. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2007; 15: S18-S26.
217. Wu Y, Zhao RC and Tredget EE. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem cells* 2010; 28: 905-915.
218. Jackson WM, Nesti LJ and Tuan RS. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem cells translational medicine* 2012; 1: 44-50.
219. Chen L, Tredget EE, Wu PY, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *Plos One* 2008; 3: e1886.
220. Carvalho AB, Quintanilha LF, Dias JV, et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem cells* 2008; 26: 1307-1314.
221. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-98.
222. Cabral J, Ryan AE, Griffin MD, et al. Extracellular vesicles as modulators of wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2018; 129: 394-406.
223. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Advances in skin & wound care* 2004; 17: 24-35.
224. Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, et al. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2014; 22: 569-578.
225. Yedgar S, Krinsky M, Cohen Y, et al. Treatment of inflammatory diseases by selective eicosanoid inhibition: a double-edged sword? *Trends in pharmacological sciences* 2007; 28: 459-464.
226. Hesseler MJ and Shyam N. Platelet-rich plasma and its utility in medical dermatology: a systematic review. *J Am Acad Dermatol* 2019; 81: 834-846.
227. Blanco-Fernandez B, Castaño O, Mateos-Timoneda MÁ, et al. Nanotechnology approaches in chronic wound healing. *Adv Wound Care* 2021; 10: 234-256.
228. Ezhilarasu H, Vishalli D, Dheen ST, et al. Nanoparticle-based therapeutic approach for diabetic wound healing. *Nanomaterials* 2020; 10: 1234.
229. Gainza G, Aguirre JJ, Pedraz JL, et al. rhEGF-loaded PLGA-Alginate microspheres enhance the healing of full-thickness excisional wounds in diabetised Wistar rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 50: 243-252.
230. Korrapati PS, Karthikeyan K, Satish A, et al. Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration. *Materials Science and Engineering: C* 2016; 67: 747-765.
231. Xu HL, Chen PP, ZhuGe DL, et al. Liposomes with silk fibroin hydrogel core to stabilize bfgf and promote the wound healing of mice with deep second-degree scald. *Advanced healthcare materials* 2017; 6: 1700344.
232. Xiang Q, Xiao J, Zhang H, et al. Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat. *Burns* 2011; 37: 886-895.
233. Chereddy KK, Her C-H, Comune M, et al. PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. *J Control Release* 2014; 194: 138-147.
234. Sanchez DA, Schairer D, Tuckman-Vernon C, et al. Amphotericin B releasing nanoparticle topical treatment of *Candida* spp. in the setting of a burn wound. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2014; 10: 269-277.
235. Dave V, Kushwaha K, Yadav RB, et al. Hybrid nanoparticles for the topical delivery of norfloxacin for the effective treatment of bacterial infection produced after burn. *Journal of Microencapsulation* 2017; 34: 351-365. DOI: 10.1080/02652048.2017.1337249.
236. Garcia-Orue I, Gainza G, Girbau C, et al. LL37 loaded nanostructured lipid carriers (NLC): A new strategy for the topical treatment of chronic wounds. *Eur J Pharm Biopharm* 2016; 108: 310-316.
237. Benson HA. Transfersomes for transdermal drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* 2006; 3: 727-737.

238. Choi JU, Lee SW, Pageni R, et al. Preparation and in vivo evaluation of cationic elastic liposomes comprising highly skin-permeable growth factors combined with hyaluronic acid for enhanced diabetic wound-healing therapy. *Acta Biomater* 2017; 57: 197-215.
239. Manconi M, Manca ML, Caddeo C, et al. Nanodesign of new self-assembling core-shell gellan-transfersomes loading baicalin and in vivo evaluation of repair response in skin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2018; 14: 569-579.
240. Bui VKH, Park D and Lee Y-C. Chitosan combined with ZnO, TiO₂ and Ag nanoparticles for antimicrobial wound healing applications: a mini review of the research trends. *Polymers* 2017; 9: 21.
241. Gainza G, Pastor M, Aguirre JJ, et al. A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid nanoparticles: In vitro bioactivity and in vivo effectiveness in healing-impaired db/db mice. *J Control Release* 2014; 185: 51-61.
242. Fumakia M and Ho EA. Nanoparticles encapsulated with LL37 and serpin A1 promotes wound healing and synergistically enhances antibacterial activity. *Molecular pharmaceutics* 2016; 13: 2318-2331.
243. Patel KK, Surekha DB, Tripathi M, et al. Antibiofilm potential of silver sulfadiazine-loaded nanoparticle formulations: a study on the effect of DNase-I on microbial biofilm and wound healing activity. *Molecular Pharmaceutics* 2019; 16: 3916-3925.
244. Eskiler GG, Cecener G, Dikmen G, et al. Talazoparib Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Preparation, Characterization and Evaluation of the Therapeutic Efficacy In vitro. *Current Drug Delivery* 2019; 16: 511-529.
245. Branski L, Pereira C, Herndon D, et al. Gene therapy in wound healing: present status and future directions. *Gene Ther* 2007; 14: 1-10.
246. Chouhan D, Dey N, Bhardwaj N, et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. *Biomaterials* 2019; 216: 119267.
247. Serra MB, Barroso WA, Silva NNd, et al. From inflammation to current and alternative therapies involved in wound healing. *International journal of inflammation* 2017; 2017.
248. He L and Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews genetics* 2004; 5: 522-531.
249. Banerjee J and Sen CK. microRNA and wound healing. *microRNA: Medical Evidence*. Springer, 2015, pp.291-305.
250. Icli B, Nabzdyk CS, Lujan-Hernandez J, et al. Regulation of impaired angiogenesis in diabetic dermal wound healing by microRNA-26a. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2016; 91: 151-159.
251. Martin JR, Nelson CE, Gupta MK, et al. Local delivery of PHD2 siRNA from ROS-degradable scaffolds to promote diabetic wound healing. *Advanced healthcare materials* 2016; 5: 2751-2757.
252. Li N, Luo H-C, Ren M, et al. Efficiency and safety of β -CD-(D3) 7 as siRNA carrier for decreasing matrix metalloproteinase-9 expression and improving wound healing in diabetic rats. *Acs Appl Mater Inter* 2017; 9: 17417-17426.
253. Rabbani PS, Zhou A, Borab ZM, et al. Novel lipoproteoplex delivers Keap1 siRNA based gene therapy to accelerate diabetic wound healing. *Biomaterials* 2017; 132: 1-15.
254. Mandapalli PK, Labala S, Jose A, et al. Layer-by-layer thin films for co-delivery of TGF- β siRNA and epidermal growth factor to improve excisional wound healing. *Aaps Pharmscitech* 2017; 18: 809-820.
255. Falanga V, Brem H, Ennis WJ, et al. Maintenance debridement in the treatment of difficult-to-heal chronic wounds. Recommendations of an expert panel. *Ostomy/wound management* 2008: 2-13; quiz 14.
256. Lurie F, Bittar S and Kasper G. Optimal compression therapy and wound care for venous ulcers. *Surgical Clinics* 2018; 98: 349-360.
257. Rudolph D. Standards of care for venous leg ulcers: compression therapy and moist wound healing. *Journal of Vascular Nursing* 2001; 19: 20-27.

258. Lalezari S, Lee CJ, Borovikova AA, et al. Deconstructing negative pressure wound therapy. *International wound journal* 2017; 14: 649-657.
259. Orgill DP and Bayer LR. Negative pressure wound therapy: past, present and future. *International wound journal* 2013; 10: 15-19.
260. Rüttermann M, Maier-Hasselmann A, Nink-Grebe B, et al. Local treatment of chronic wounds: in patients with peripheral vascular disease, chronic venous insufficiency, and diabetes. *Deutsches Ärzteblatt International* 2013; 110: 25.
261. Othman D. Negative pressure wound therapy literature review of efficacy, cost effectiveness, and impact on patients' quality of life in chronic wound management and its implementation in the United Kingdom. *Plastic surgery international* 2012; 2012.
262. Ubbink D, Westerbos S, Nelson E, et al. A systematic review of topical negative pressure therapy for acute and chronic wounds. *Journal of British Surgery* 2008; 95: 685-692.
263. Vikatmaa P, Juutilainen V, Kuukasjärvi P, et al. Negative pressure wound therapy: a systematic review on effectiveness and safety. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2008; 36: 438-448.
264. Blume PA, Walters J, Payne W, et al. Comparison of negative pressure wound therapy using vacuum-assisted closure with advanced moist wound therapy in the treatment of diabetic foot ulcers: a multicenter randomized controlled trial. *Diabetes care* 2008; 31: 631-636.
265. Vuerstaek JD, Vainas T, Wuite J, et al. State-of-the-art treatment of chronic leg ulcers: a randomized controlled trial comparing vacuum-assisted closure (VAC) with modern wound dressings. *Journal of vascular surgery* 2006; 44: 1029-1037.
266. Llanos S, Danilla S, Barraza C, et al. Effectiveness of negative pressure closure in the integration of split thickness skin grafts: a randomized, double-masked, controlled trial. *Annals of surgery* 2006; 244: 700.
267. Glass G, Murphy G, Esmaili A, et al. Systematic review of molecular mechanism of action of negative-pressure wound therapy. *Journal of British Surgery* 2014; 101: 1627-1636.
268. Sadat U, Chang G, Noorani A, et al. Efficacy of TNP on lower limb wounds: a meta-analysis. *J Wound Care* 2008; 17: 45-48.
269. Wynn M and Freeman S. The efficacy of negative pressure wound therapy for diabetic foot ulcers: A systematised review. *Journal of Tissue Viability* 2019; 28: 152-160.
270. Rajendran SB, Challen K, Wright KL, et al. Electrical stimulation to enhance wound healing. *Journal of Functional Biomaterials* 2021; 12: 40.
271. Koel G and Houghton PE. Electrostimulation: current status, strength of evidence guidelines, and meta-analysis. *Adv Wound Care* 2014; 3: 118-126.
272. Kloth LC. Electrical stimulation technologies for wound healing. *Adv Wound Care* 2014; 3: 81-90.
273. Ennis WJ, Lee C, Gellada K, et al. Advanced technologies to improve wound healing: Electrical stimulation, vibration therapy, and ultrasound—what is the evidence? *Plast Reconstr Surg* 2016; 138: 94S-104S.
274. Khouri C, Kotzki S, Roustit M, et al. Hierarchical evaluation of electrical stimulation protocols for chronic wound healing: An effect size meta-analysis. *Wound Repair Regen* 2017; 25: 883-891.
275. Kranke P, Bennett MH, Martyn-St James M, et al. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Db Syst Rev* 2015.
276. Thackham JA, McElwain DS and Long RJ. The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: a review. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 321-330.
277. Tecilazich F, Dinh T, Pradhan-Nabzdyk L, et al. Role of endothelial progenitor cells and inflammatory cytokines in healing of diabetic foot ulcers. *Plos One* 2013; 8: e83314.
278. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *Journal of applied physiology* 2009; 106: 988-995.
279. Han G and Ceilley R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in therapy* 2017; 34: 599-610.

280. Plafki C, Peters P, Almeling M, et al. Complications and side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Aviation Space and Environmental Medicine* 2000; 71: 119-124.
281. Schaden W, Thiele R, Kölbl C, et al. Shock wave therapy for acute and chronic soft tissue wounds: a feasibility study. *Journal of Surgical Research* 2007; 143: 1-12.
282. Mittermayr R, Antonic V, Hartinger J, et al. Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for wound healing: technology, mechanisms, and clinical efficacy. *Wound Repair Regen* 2012; 20: 456-465.
283. Kuffler DP. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regenerative medicine* 2016; 11: 107-122.
284. Yadollahpour A, Mostafa J, Samaneh R, et al. Ultrasound therapy for wound healing: A review of current techniques and mechanisms of action. *J Pure Appl Microbiol* 2014; 8: 4071-4085.
285. Driver VR, Yao M and Miller CJ. Noncontact low-frequency ultrasound therapy in the treatment of chronic wounds: a meta-analysis. *Wound Repair Regen* 2011; 19: 475-480.
286. Herberger K, Franzke N, Blome C, et al. Efficacy, tolerability and patient benefit of ultrasound-assisted wound treatment versus surgical debridement: a randomized clinical study. *Dermatology* 2011; 222: 244-249.
287. Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical Care* 2015; 19: 243. DOI: 10.1186/s13054-015-0961-2.
288. Wiechula R. The use of moist wound-healing dressings in the management of split-thickness skin graft donor sites: a systematic review. *International journal of nursing practice* 2003; 9: S9-S17.
289. Singh M, Nuutila K, Kruse C, et al. Challenging the conventional therapy: emerging skin graft techniques for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2015; 136: 524e-530e.
290. Kanapathy M, Hachach-Haram N, Bystrzonowski N, et al. Epidermal grafting for wound healing: a review on the harvesting systems, the ultrastructure of the graft and the mechanism of wound healing. *International Wound Journal* 2017; 14: 16-23.
291. Jones JE and Nelson EA. Skin grafting for venous leg ulcers. *Cochrane Db Syst Rev* 2007.
292. Halim AS, Khoo TL and Yussof SJM. Biologic and synthetic skin substitutes: an overview. *Indian journal of plastic surgery* 2010; 43: S23-S28.
293. Santema TB, Poyck PP and Ubbink DT. Skin grafting and tissue replacement for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Db Syst Rev* 2016.
294. Shevchenko RV, James SL and James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of the royal Society Interface* 2010; 7: 229-258.
295. Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG and Sánchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of cosmetic dermatology* 2018; 17: 20-26.
296. Barone AAL, Mastroianni M, Farkash EA, et al. Genetically modified porcine split-thickness skin grafts as an alternative to allograft for provision of temporary wound coverage: preliminary characterization. *Burns* 2015; 41: 565-574.
297. Yamamoto T, Iwase H, King TW, et al. Skin xenotransplantation: Historical review and clinical potential. *Burns* 2018; 44: 1738-1749.
298. Tarassoli SP, Jessop ZM, Al-Sabah A, et al. Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 2018; 71: 615-623.
299. De Cicco F, Russo P, Reverchon E, et al. Prilling and supercritical drying: A successful duo to produce core-shell polysaccharide aerogel beads for wound healing. *Carbohydr Polym* 2016; 147: 482-489.
300. Rahmani Del Bakhshayesh A, Annabi N, Khalilov R, et al. Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 2018; 46: 691-705.
301. Broussard KC and Powers JG. Wound dressings: selecting the most appropriate type. *American journal of clinical dermatology* 2013; 14: 449-459.
302. Yoo HJ and Kim HD. Characteristics of waterborne polyurethane/poly (N-vinylpyrrolidone) composite films for wound-healing dressings. *J Appl Polym Sci* 2008; 107: 331-338.

303. Ahsan SM, Thomas M, Reddy KK, et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2018; 110: 97-109.
304. Andonegi M, Las Heras K, Santos-Vizcaíno E, et al. Structure-properties relationship of chitosan/collagen films with potential for biomedical applications. *Carbohydr Polym* 2020; 237: 116159.
305. Devi N and Dutta J. Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application. *Int J Biol Macromol* 2017; 104: 1897-1904.
306. Shah A, Buabeid MA, Arafa E-SA, et al. The wound healing and antibacterial potential of triple-component nanocomposite (chitosan-silver-sericin) films loaded with moxifloxacin. *International Journal of Pharmaceutics* 2019; 564: 22-38.
307. Kumorek M, Minisy IM, Krunclová T, et al. pH-responsive and antibacterial properties of self-assembled multilayer films based on chitosan and tannic acid. *Materials Science and Engineering: C* 2020; 109: 110493.
308. Choi M, Hasan N, Cao J, et al. Chitosan-based nitric oxide-releasing dressing for anti-biofilm and in vivo healing activities in MRSA biofilm-infected wounds. *Int J Biol Macromol* 2020; 142: 680-692.
309. Basu P, Narendrakumar U, Arunachalam R, et al. Characterization and evaluation of carboxymethyl cellulose-based films for healing of full-thickness wounds in normal and diabetic rats. *ACS omega* 2018; 3: 12622-12632.
310. Srivastava CM, Purwar R, Gupta A, et al. Dextrose modified flexible tasar and muga fibroin films for wound healing applications. *Materials Science and Engineering: C* 2017; 75: 104-114.
311. Veeruraj A, Liu L, Zheng J, et al. Evaluation of astaxanthin incorporated collagen film developed from the outer skin waste of squid *Doryteuthis singhalensis* for wound healing and tissue regenerative applications. *Materials Science and Engineering: C* 2019; 95: 29-42.
312. Hubner P, Donati N, de Menezes Quines LK, et al. Gelatin-based films containing clinoptilolite-Ag for application as wound dressing. *Materials Science and Engineering: C* 2020; 107: 110215.
313. Jia X and Kiick KL. Hybrid multicomponent hydrogels for tissue engineering. *Macromol Biosci* 2009; 9: 140-156.
314. Yoshimoto H, Shin Y, Terai H, et al. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24: 2077-2082.
315. Tibbitt MW and Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering* 2009; 103: 655-663.
316. Taylor DA, Sampaio LC, Ferdous Z, et al. Decellularized matrices in regenerative medicine. *Acta Biomater* 2018; 74: 74-89.
317. Chandy T. Tissue repair with natural extracellular matrix (ECM) scaffolds. *Regenerated Organs*. Elsevier, 2021, pp.11-37.
318. Shi L, Ramsay S, Ermis R, et al. In vitro and in vivo studies on matrix metalloproteinases interacting with small intestine submucosa wound matrix. *International Wound Journal* 2012; 9: 44-53.
319. Shi L and Ronfard V. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review. *International journal of burns and trauma* 2013; 3: 173.
320. Turner NJ and Badylak SF. The use of biologic scaffolds in the treatment of chronic nonhealing wounds. *Adv Wound Care* 2015; 4: 490-500.
321. Moore MA, Samsell B, Wallis G, et al. Decellularization of human dermis using non-denaturing anionic detergent and endonuclease: a review. *Cell and tissue banking* 2015; 16: 249-259.
322. Wu J, Ye J, Zhu J, et al. Heparin-based coacervate of FGF2 improves dermal regeneration by asserting a synergistic role with cell proliferation and endogenous facilitated VEGF for cutaneous wound healing. *Biomacromolecules* 2016; 17: 2168-2177.
323. Qu Y, Cao C, Wu Q, et al. The dual delivery of KGF and b FGF by collagen membrane to promote skin wound healing. *J Tissue Eng Regen M* 2018; 12: 1508-1518.
324. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2015; 3: 162.

325. López-Valladares MJ, Teresa Rodriguez-Ares M, Tourino R, et al. Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol* 2010; 88: e211-e216.
326. Dickinson LE and Gerecht S. Engineered biopolymeric scaffolds for chronic wound healing. *Frontiers in physiology* 2016; 7: 341.
327. Kirsner R and Vivas A. Lower-extremity ulcers: diagnosis and management. *Brit J Dermatol* 2015; 173: 379-390.
328. Gerecht-Nir S, Cohen S, Ziskind A, et al. Three-dimensional porous alginate scaffolds provide a conducive environment for generation of well-vascularized embryoid bodies from human embryonic stem cells. *Biotechnology and bioengineering* 2004; 88: 313-320.
329. Scherer SS, Pietramaggiore G, Matthews J, et al. Poly-N-acetyl glucosamine nanofibers: a new bioactive material to enhance diabetic wound healing by cell migration and angiogenesis. *Annals of surgery* 2009; 250: 322-330.
330. Hankin CS, Knispel J, Lopes M, et al. Clinical and cost efficacy of advanced wound care matrices for venous ulcers. *Journal of Managed Care Pharmacy* 2012; 18: 375-384.
331. Maus EA. Successful treatment of two refractory venous stasis ulcers treated with a novel poly-N-acetyl glucosamine-derived membrane. *Case Reports* 2012; 2012: bcr0320126091.
332. Simman R, Mari W, Younes S, et al. Use of hyaluronic acid-based biological bilaminar matrix in wound bed preparation: A case series. *Eplasty* 2018; 18.
333. Nicoletti G, Tresoldi MM, Malovini A, et al. Versatile use of dermal substitutes: a retrospective survey of 127 consecutive cases. *Indian Journal of Plastic Surgery* 2018; 51: 046-053.
334. Whitaker IS, Prowse S and Potokar TS. A critical evaluation of the use of Biobrane as a biologic skin substitute: a versatile tool for the plastic and reconstructive surgeon. *Annals of plastic surgery* 2008; 60: 333-337.
335. Liu T, Qiu C, Ben C, et al. One-step approach for full-thickness skin defect reconstruction in rats using minced split-thickness skin grafts with Pelnac overlay. *Burns & Trauma* 2019; 7.
336. Schwarze H, Küntscher M, Uhlig C, et al. Suprathel, a new skin substitute, in the management of partial-thickness burn wounds: results of a clinical study. *Annals of plastic surgery* 2008; 60: 181-185.
337. Chattopadhyay S and Raines RT. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers* 2014; 101: 821-833.
338. Gomes A, Teixeira C, Ferraz R, et al. Wound-healing peptides for treatment of chronic diabetic foot ulcers and other infected skin injuries. *Molecules* 2017; 22: 1743.
339. Li J, Zhou C, Luo C, et al. N-acetyl cysteine-loaded graphene oxide-collagen hybrid membrane for scarless wound healing. *Theranostics* 2019; 9: 5839.
340. Roussakis E, Ortines RV, Pinsker BL, et al. Theranostic biocomposite scaffold membrane. *Biomaterials* 2019; 212: 17-27.
341. Lee H, Woo H-M and Kang B-J. Impact of collagen-alginate composition from microbead morphological properties to microencapsulated canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cell activities. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition* 2018; 29: 1042-1052.
342. Gil-Cifuentes L, Jiménez RA and Fontanilla MR. Evaluation of collagen type I scaffolds including gelatin-collagen microparticles and Aloe vera in a model of full-thickness skin wound. *Drug Delivery and Translational Research* 2019; 9: 25-36.
343. Natarajan J, Sanapalli BKR, Bano M, et al. Nanostructured lipid carriers of pioglitazone loaded collagen/chitosan composite scaffold for diabetic wound healing. *Adv Wound Care* 2019; 8: 499-513.
344. Chu J, Shi P, Yan W, et al. PEGylated graphene oxide-mediated quercetin-modified collagen hybrid scaffold for enhancement of MSCs differentiation potential and diabetic wound healing. *Nanoscale* 2018; 10: 9547-9560.
345. do Amaral R, Zayed N, Pascu E, et al. Functionalising collagen-based scaffolds with platelet-rich plasma for enhanced skin wound healing potential, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019). 2019.

346. Khanh LL, Truc NT, Dat NT, et al. Gelatin-stabilized composites of silver nanoparticles and curcumin: characterization, antibacterial and antioxidant study. *Science and Technology of Advanced Materials* 2019; 20: 276.
347. Touri M, Moztarzadeh F, Osman NAA, et al. 3D-printed biphasic calcium phosphate scaffolds coated with an oxygen generating system for enhancing engineered tissue survival. *Materials Science and Engineering: C* 2018; 84: 236-242.
348. Kennedy KM, Bhaw-Luximon A and Jhurry D. Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: Implications for scaffold design and performance. *Acta Biomater* 2017; 50: 41-55.
349. Mayet N, Choonara YE, Kumar P, et al. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. *J Pharm Sci-Us* 2014; 103: 2211-2230.
350. Son YJ, Kim WJ and Yoo HS. Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Archives of pharmacal research* 2014; 37: 69-78.
351. Zhang Q, Li Y, Lin ZYW, et al. Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications. *Drug Discovery Today* 2017; 22: 1351-1366.
352. Bhattarai RS, Bachu RD, Boddu SH, et al. Biomedical applications of electrospun nanofibers: Drug and nanoparticle delivery. *Pharmaceutics* 2018; 11: 5.
353. Garcia-Orue I, Gainza G, Garcia-Garcia P, et al. Composite nanofibrous membranes of PLGA/Aloe vera containing lipid nanoparticles for wound dressing applications. *International journal of pharmaceutics* 2019; 556: 320-329.
354. Ehterami A, Salehi M, Farzamfar S, et al. In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model. *Int J Biol Macromol* 2018; 117: 601-609.
355. Thanh NT, Hieu MH, Phuong NTM, et al. Optimization and characterization of electrospun polycaprolactone coated with gelatin-silver nanoparticles for wound healing application. *Materials Science and Engineering: C* 2018; 91: 318-329.
356. Permyakova ES, Polčák J, Slukin PV, et al. Antibacterial biocompatible PCL nanofibers modified by COOH-anhydride plasma polymers and gentamicin immobilization. *Materials & Design* 2018; 153: 60-70.
357. Lee S, Jin G and Jang J-H. Electrospun nanofibers as versatile interfaces for efficient gene delivery. *Journal of biological engineering* 2014; 8: 1-19.
358. Lorden ER, Levinson HM and Leong KW. Integration of drug, protein, and gene delivery systems with regenerative medicine. *Drug delivery and translational research* 2015; 5: 168-186.
359. Babitha S, Rachita L, Karthikeyan K, et al. Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *International journal of pharmaceutics* 2017; 523: 52-90.
360. Frizzell H, Ohlsen TJ and Woodrow KA. Protein-loaded emulsion electrospun fibers optimized for bioactivity retention and pH-controlled release for peroral delivery of biologic therapeutics. *International journal of pharmaceutics* 2017; 533: 99-110.
361. Zhou F, Wen M, Zhou P, et al. Electrospun membranes of PELCL/PCL-REDV loading with miRNA-126 for enhancement of vascular endothelial cell adhesion and proliferation. *Materials Science and Engineering: C* 2018; 85: 37-46.
362. Foraida ZI, Kamaldinov T, Nelson DA, et al. Elastin-PLGA hybrid electrospun nanofiber scaffolds for salivary epithelial cell self-organization and polarization. *Acta Biomater* 2017; 62: 116-127.
363. Lee S, Yun S, Park KI, et al. Sliding fibers: slidable, injectable, and gel-like electrospun nanofibers as versatile cell carriers. *Acs Nano* 2016; 10: 3282-3294.
364. Sebe I, Szabó P, Kállai-Szabó B, et al. Incorporating small molecules or biologics into nanofibers for optimized drug release: A review. *International journal of pharmaceutics* 2015; 494: 516-530.
365. Cheng G, Yin C, Tu H, et al. Controlled co-delivery of growth factors through layer-by-layer assembly of core-shell nanofibers for improving bone regeneration. *Acs Nano* 2019; 13: 6372-6382.
366. Buenger D, Topuz F and Groll J. Hydrogels in sensing applications. *Progress in Polymer Science* 2012; 37: 1678-1719.

367. Drury JL and Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003; 24: 4337-4351.
368. Niculescu A-G and Grumezescu AM. An Up-to-Date Review of Biomaterials Application in Wound Management. *Polymers* 2022; 14: 421.
369. Caló E and Khutoryanskiy VV. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European polymer journal* 2015; 65: 252-267.
370. Kamoun EA, Kenawy E-RS and Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of advanced research* 2017; 8: 217-233.
371. Chen C-S, Zeng F, Xiao X, et al. Three-dimensionally printed silk-sericin-based hydrogel scaffold: a promising visualized dressing material for real-time monitoring of wounds. *Acs Appl Mater Inter* 2018; 10: 33879-33890.
372. Shi C, Wang C, Liu H, et al. Selection of appropriate wound dressing for various wounds. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2020; 8: 182.
373. Khalil A. Interpenetrating polymeric hydrogels as favorable materials for hygienic applications. *Biointerface Res Appl Chem* 2020; 10: 5011-5020.
374. Brumberg V, Astrelina T, Malivanova T, et al. Modern Wound Dressings: Hydrogel Dressings. *Biomedicines* 2021; 9: 1235.
375. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci-U.S.* 2008; 97: 2892-2923.
376. He F, Jiao H, Tian Y, et al. Facile and large-scale synthesis of curcumin/PVA hydrogel: effectively kill bacteria and accelerate cutaneous wound healing in the rat. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition* 2018; 29: 325-343.
377. Khorasani MT, Joorabloo A, Moghaddam A, et al. Incorporation of ZnO nanoparticles into heparinised polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels for wound dressing application. *Int J Biol Macromol* 2018; 114: 1203-1215.
378. Liao J, Jia Y, Wang B, et al. Injectable hybrid poly (ϵ -caprolactone)-b-poly (ethylene glycol)-b-poly (ϵ -caprolactone) porous microspheres/alginate hydrogel cross-linked by calcium gluconate crystals deposited in the pores of microspheres improved skin wound healing. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2018; 4: 1029-1036.
379. Birajdar MS, Halake KS and Lee J. Blood-clotting mimetic behavior of biocompatible microgels. *Journal of industrial and engineering chemistry* 2018; 63: 117-123.
380. Zhu J, Li F, Wang X, et al. Hyaluronic acid and polyethylene glycol hybrid hydrogel encapsulating nanogel with hemostasis and sustainable antibacterial property for wound healing. *Acs Appl Mater Inter* 2018; 10: 13304-13316.
381. Zhou Q, Kang H, Bielec M, et al. Influence of different divalent ions cross-linking sodium alginate-polyacrylamide hydrogels on antibacterial properties and wound healing. *Carbohydr Polym* 2018; 197: 292-304.
382. Tarusha L, Paoletti S, Travan A, et al. Alginate membranes loaded with hyaluronic acid and silver nanoparticles to foster tissue healing and to control bacterial contamination of non-healing wounds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2018; 29: 1-14.
383. Denny CV and Record C. Wound Management Formulary-NHS Forth Valley.
384. Flett A, Russell F, Stringfellow S, et al. Modern wound management: review of common products. *Nursing And Residential Care* 2002; 4: 328-344.
385. Weller C and Team V. Interactive dressings and their role in moist wound management. *Advanced textiles for wound care*. Elsevier, 2019, pp.105-134.
386. Ousey K, Rogers AA and Rippon MG. Hydro-responsive wound dressings simplify TIME wound management framework. *British Journal of Community Nursing* 2016; 21: S39-S49.
387. Rashaan ZM, Krijnen P, van den Akker-van Marle M, et al. Clinical effectiveness, quality of life and cost-effectiveness of Flaminal® versus Flamazine® in the treatment of partial thickness burns: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2016; 17: 1-9.

388. Cooke M, CHADWICK P, HAYCOCKS S, et al. Enabling wound healing and preventing limb amputation: a cost-benefit case study of Hydro-Responsive Wound Dressings. *Wounds UK* 2017; 13.
389. Jones A and Vaughan D. Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review. *Journal of Orthopaedic nursing* 2005; 9: S1-S11.
390. Boateng J and Catanzano O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing—a review. *J Pharm Sci-Uk* 2015; 104: 3653-3680.
391. Boateng J. *Therapeutic dressings and wound healing applications*. John Wiley & Sons, 2020.
392. Hom DB and Manivel JC. Promoting Healing With Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB in a Previously Irradiated Problem Wound. *The Laryngoscope* 2003; 113: 1566-1571.
393. Beckert S, Haack S, Hierlemann H, et al. Stimulation of steroid-suppressed cutaneous healing by repeated topical application of IGF-I: different mechanisms of action based upon the mode of IGF-I delivery. *Journal of Surgical Research* 2007; 139: 217-221.
394. Qiu M, Chen D, Shen C, et al. Platelet-Rich plasma-loaded Poly (d, l-lactide)-Poly (ethylene glycol)-Poly (d, l-lactide) hydrogel dressing promotes full-thickness skin wound healing in a rodent model. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 1001.
395. Zhang D, Cai G, Mukherjee S, et al. Elastic, persistently moisture-retentive, and wearable biomimetic film inspired by fetal scarless repair for promoting skin wound healing. *ACS Appl Mater Inter* 2020; 12: 5542-5556.
396. Blacklow S, Li J, Freedman B, et al. Bioinspired mechanically active adhesive dressings to accelerate wound closure. *Science advances* 2019; 5: eaaw3963.
397. Lokhande G, Carrow JK, Thakur T, et al. Nanoengineered injectable hydrogels for wound healing application. *Acta Biomater* 2018; 70: 35-47.
398. Pacelli S, Acosta F, Chakravarti AR, et al. Nanodiamond-based injectable hydrogel for sustained growth factor release: preparation, characterization and in vitro analysis. *Acta Biomater* 2017; 58: 479-491.
399. Jee J-P, Pangei R, Jha SK, et al. Preparation and in vivo evaluation of a topical hydrogel system incorporating highly skin-permeable growth factors, quercetin, and oxygen carriers for enhanced diabetic wound-healing therapy. *International Journal of Nanomedicine* 2019; 14: 5449.
400. Kumar S, Majhi RK, Singh A, et al. Carbohydrate-coated gold-silver nanoparticles for efficient elimination of multidrug resistant bacteria and in vivo wound healing. *ACS Appl Mater Inter* 2019; 11: 42998-43017.
401. Page DJ, Clarkin CE, Mani R, et al. Injectable nanoclay gels for angiogenesis. *Acta Biomater* 2019; 100: 378-387.
402. Stoica AE, Chircov C and Grumezescu AM. Nanomaterials for wound dressings: An up-to-date overview. *Molecules* 2020; 25: 2699.
403. Tokatlian T, Cam C and Segura T. Porous hyaluronic acid hydrogels for localized nonviral DNA delivery in a diabetic wound healing model. *Advanced healthcare materials* 2015; 4: 1084-1091.
404. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21: 2529-2543.
405. Pereira RF and Bártolo PJ. 3D photo-fabrication for tissue engineering and drug delivery. *Engineering* 2015; 1: 090-112.
406. Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A, et al. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annual review of biomedical engineering* 2014; 16: 247.
407. Melchels FP, Domingos MA, Klein TJ, et al. Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in polymer science* 2012; 37: 1079-1104.
408. Melchels FP, Feijen J and Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials* 2010; 31: 6121-6130.
409. Huang J, Qin Q and Wang J. A review of stereolithography: Processes and systems. *Processes* 2020; 8: 1138.
410. Jungst T, Smolan W, Schacht K, et al. Strategies and molecular design criteria for 3D printable hydrogels. *Chem Rev* 2016; 116: 1496-1539.

411. Intini C, Elviri L, Cabral J, et al. 3D-printed chitosan-based scaffolds: An in vitro study of human skin cell growth and an in-vivo wound healing evaluation in experimental diabetes in rats. *Carbohydr Polym* 2018; 199: 593-602.
412. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, et al. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* 2009; 30: 2164-2174.
413. Murphy SV and Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology* 2014; 32: 773-785.
414. Marques C, Diogo G, Pina S, et al. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: A comprehensive review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2019; 30: 1-12.
415. Osidak EO, Kozhukhov VI, Osidak MS, et al. Collagen as bioink for bioprinting: A comprehensive review. *International Journal of Bioprinting* 2020; 6.
416. Smandri A, Nordin A, Hwei NM, et al. Natural 3D-printed bioinks for skin regeneration and wound healing: A systematic review. *Polymers* 2020; 12: 1782.
417. Pahlevanzadeh F, Mokhtari H, Bakhsheshi-Rad HR, et al. Recent trends in three-dimensional bioinks based on alginate for biomedical applications. *Materials* 2020; 13: 3980.
418. Gopinathan J and Noh I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomaterials research* 2018; 22: 1-15.
419. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, et al. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology advances* 2016; 34: 422-434.
420. Koch L, Deiwick A, Schlie S, et al. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnology and bioengineering* 2012; 109: 1855-1863.
421. Zhang AP, Qu X, Soman P, et al. Rapid fabrication of complex 3D extracellular microenvironments by dynamic optical projection stereolithography. *Adv Mater* 2012; 24: 4266-4270.
422. He P, Zhao J, Zhang J, et al. Bioprinting of skin constructs for wound healing. *Burns & trauma* 2018; 6.
423. Zhu W, Ma X, Gou M, et al. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Current opinion in biotechnology* 2016; 40: 103-112.
424. Nichol JW and Khademhosseini A. Modular tissue engineering: engineering biological tissues from the bottom up. *Soft Matter* 2009; 5: 1312-1319.
425. Huang Y, Zhang XF, Gao G, et al. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. *Biotechnology journal* 2017; 12: 1600734.
426. Lee Y-B, Polio S, Lee W, et al. Bio-printing of collagen and VEGF-releasing fibrin gel scaffolds for neural stem cell culture. *Exp Neurol* 2010; 223: 645-652.
427. Michael S, Sorg H, Peck C-T, et al. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *Plos One* 2013; 8: e57741.
428. Boehnke K, Mirancea N, Pavesio A, et al. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *European journal of cell biology* 2007; 86: 731-746.
429. Linge C. Establishment and maintenance of normal human keratinocyte cultures. *Human Cell Culture Protocols*. Springer, 2005, pp.1-11.
430. Schoop VM, Fusenig NE and Mirancea N. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 343-353.
431. Lee W, Debasitis JC, Lee VK, et al. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. *Biomaterials* 2009; 30: 1587-1595.
432. Lee V, Singh G, Trasatti JP, et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2014; 20: 473-484.
433. Zhang LG, Leong K and Fisher JP. *3D bioprinting and nanotechnology in tissue engineering and regenerative medicine*. academic press, 2022.

434. Binder KW, Zhao W, Aboushwareb T, et al. In situ bioprinting of the skin for burns. *Journal of the American College of Surgeons* 2010; 211: S76.
435. Skardal A, Mack D, Kapetanovic E, et al. Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem cells translational medicine* 2012; 1: 792-802.
436. Malda J, Visser J, Melchels FP, et al. 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater* 2013; 25: 5011-5028.
437. DeSimone E, Schacht K, Jungst T, et al. Biofabrication of 3D constructs: Fabrication technologies and spider silk proteins as bioinks. *Pure and applied chemistry* 2015; 87: 737-749.
438. Das S, Pati F, Choi Y-J, et al. Bioprintable, cell-laden silk fibroin–gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs. *Acta Biomater* 2015; 11: 233-246.
439. Gruene M, Pflaum M, Hess C, et al. Laser printing of three-dimensional multicellular arrays for studies of cell–cell and cell–environment interactions. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2011; 17: 973-982.
440. Gruene M, Deiwick A, Koch L, et al. Laser printing of stem cells for biofabrication of scaffold-free autologous grafts. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2011; 17: 79-87.
441. Xu F, Sridharan B, Wang S, et al. Embryonic stem cell bioprinting for uniform and controlled size embryoid body formation. *Biomicrofluidics* 2011; 5: 022207.
442. Tricomi BJ, Dias AD and Corr DT. Stem cell bioprinting for applications in regenerative medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2016; 1383: 115-124.
443. Tasoglu S and Demirci U. Bioprinting for stem cell research. *Trends Biotechnol* 2013; 31: 10-19.
444. Chen M, Przyborowski M and Berthiaume F. Stem cells for skin tissue engineering and wound healing. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering* 2009; 37.
445. Han Y, Tao R, Sun T, et al. Advances and opportunities for stem cell research in skin tissue engineering. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16: 1873-1877.
446. Wu I, Nahas Z, Kimmerling KA, et al. An injectable adipose matrix for soft tissue reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2012; 129: 1247.
447. Chazotte B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harbor Protocols* 2011; 2011: pdb. prot5648.
448. Thornton PR. *Scanning electron microscopy: applications to materials and device science*. Chapman & Hall, 1968.
449. Goldstein JI, Newbury DE, Michael JR, et al. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer, 2017.
450. Alberts B and Jaenicke L. *Molekularbiologie der Zelle*. [mit Cell biology interactive]. Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
451. Prein C, Warmbold N, Farkas Z, et al. Structural and mechanical properties of the proliferative zone of the developing murine growth plate cartilage assessed by atomic force microscopy. *Matrix Biology* 2016; 50: 1-15.
452. Butt H-J and Jaschke M. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology* 1995; 6: 1.
453. Chandran PL, Dimitriadis EK, Mertz EL, et al. Microscale mapping of extracellular matrix elasticity of mouse joint cartilage: an approach to extracting bulk elasticity of soft matter with surface roughness. *Soft Matter* 2018; 14: 2879-2892.
454. Rico F, Roca-Cusachs P, Gavara N, et al. Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Physical Review E* 2005; 72: 021914.
455. Reuten R, Zendejrou S, Nicolau M, et al. Basement membrane stiffness determines metastases formation. *Nature materials* 2021; 20: 892-903.
456. Bhadada SV, Goyal BR and Patel MM. Angiogenic targets for potential disorders. *Fundamental & clinical pharmacology* 2011; 25: 29-47.

457. Ramanathan G, Singaravelu S, Muthukumar T, et al. Design and characterization of 3D hybrid collagen matrixes as a dermal substitute in skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* 2017; 72: 359-370.
458. Balaure PC, Holban AM, Grumezescu AM, et al. In vitro and in vivo studies of novel fabricated bioactive dressings based on collagen and zinc oxide 3D scaffolds. *International journal of pharmaceutics* 2019; 557: 199-207.
459. Kadler KE, Baldock C, Bella J, et al. Collagens at a glance. *Journal of cell science* 2007; 120: 1955-1958.
460. Hochstein A and Bhatia A. Collagen: its role in wound healing. *Wound Manage* 2014; 4: 104-109.
461. Gomes S, Leonor IB, Mano JF, et al. Natural and genetically engineered proteins for tissue engineering. *Progress in polymer science* 2012; 37: 1-17.
462. Matsuda K, Falkenberg KJ, Woods AA, et al. Adipose-derived stem cells promote angiogenesis and tissue formation for in vivo tissue engineering. *Tissue Engineering Part A* 2013; 19: 1327-1335.
463. Zomer HD, Varela GKdS, Delben PB, et al. In vitro comparative study of human mesenchymal stromal cells from dermis and adipose tissue for application in skin wound healing. *J Tissue Eng Regen M* 2019; 13: 729-741.
464. Rocha LA, Gomes ED, Afonso JL, et al. In vitro evaluation of ASCs and HUVECs co-cultures in 3D biodegradable hydrogels on neurite outgrowth and vascular organization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020; 8: 489.
465. Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, et al. Collagen fibril formation. *Biochem J* 1996; 316: 1-11.
466. DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, et al. Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 2014: e51312.
467. Sierra-Parraga JM, Merino A, Eijken M, et al. Reparative effect of mesenchymal stromal cells on endothelial cells after hypoxic and inflammatory injury. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11: 1-11.
468. Ramanathan G, Seleenmary Sobhanadhas LS, Sekar Jeyakumar GF, et al. Fabrication of biohybrid cellulose acetate-collagen bilayer matrices as nanofibrous spongy dressing material for wound-healing application. *Biomacromolecules* 2020; 21: 2512-2524.

6. Publikationsliste

Nessbach P, Schwarz S, Becke TD, et al. Angiogenic Potential of Co-Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Adipose Stromal Cells in Customizable 3D Engineered Collagen Sheets. *Journal of Functional Biomaterials* 2022; 13: 107.

Hopfner U, Aitzetmueller MM, **Neßbach P**, et al. Fibrin Glue Enhances Adipose-Derived Stromal Cell Cytokine Secretion and Survival Conferring Accelerated Diabetic Wound Healing. *Stem Cells International* 2018; 2018.

Aitzetmueller MM, Centeno Cerdas C, **Nessbach P**, et al. Polydioxanone Threads for Facial Rejuvenation: Analysis of Quality Variation in the Market. *Plast Reconstr Surg* 2019; 144: 1002e-1009e. 2019/11/26. DOI: 10.1097/PRS.00000000000006289.

Neßbach P and Aitzetmüller MM. Translational Challenges: Lymph Node Tissue Engineering. *Regenerative Medicine and Plastic Surgery*. Springer, 2019, pp.293-301.

Pérez DC, Aitzetmüller MM, **Neßbach P**, et al. Drug Delivery Advances for the Regeneration of Aged Skin. *Regenerative Medicine and Plastic Surgery*. Springer, 2019, pp.157-164.

7. Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Machens bedanken, für die Betreuung meiner Dissertation, aber auch für die Schaffung meiner Promotionsstelle und somit auch für die Möglichkeit zu dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich ebenfalls für unsere lehrreichen Gespräche und die Unterstützung über den gesamten Zeitraum.

Einen großen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Zollfrank aussprechen, für die Bereitwilligkeit und die Offenheit der Betreuung meiner Arbeit, aber auch für die aufregenden Einblicke in den eigenen Forschungsbereich.

Ich danke meinen Kollegen und Kolleginnen aus der experimentellen plastischen Chirurgie für die tolle Zeit und die schönen Momente. Bei Ursula Hopfner und Manuela Kirsch bedanke ich mich für die Unterstützung im Labor, für die Einarbeitung in die Methoden, aber auch für Rat und Tat während herausfordernder Zeiten. Bei Carolina Centeno, Sarah al Algeel, Chris Wu Fan und Lisa Benda möchte ich mich für den wissenschaftlichen Input und die unvergesslichen Momente auch abseits der Arbeit bedanken. Mateja Vodiškar danke ich für die Korrektur meiner Arbeit und die stetige Organisation im Hintergrund der Forschungsgruppe. Matthias Aitzetmüller möchte ich für die permanente Motivation und das gemeinsame Durchstehen schwieriger Momente danken.

Ein weiterer großer Dank gebührt der Forschungsgruppe CANTER der Hochschule München. Ein besonderer Dank gebührt Dr. Stefanie Sudhop und Dr. Hauke Clausen-Schaumann für die Unterstützung bei meiner Forschung und der Publikation unserer gemeinsamen Arbeit. Ich möchte Sascha Schwarz und Tanja Becke für die tolle wissenschaftliche Zusammenarbeit danken.

Bei Dr. Alan Widgerow und Dr. Mary Ziegler möchte ich mich für die tolle Zeit und die Möglichkeit bedanken, mit ihnen zusammen während meines Forschungsaufenthaltes zu arbeiten, zu diskutieren, von ihnen zu lernen und mit ihnen zu lachen.

Ich möchte all meinen Freunden danken, ganz besonders Peter Klein, Thomas Willwerding und Kai Rickert für die Begleitung auf meiner Reise, für die stetige Unterstützung und Ihre Freundschaft über all die Zeit.

Danksagung

Rolf und Gisela Schacht, Thorben Schacht-Veit und Lotte Veit, sowie Jessica Hess möchte ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre motivierende Art, sowie ihre allgegenwärtige Unterstützung danken.

Ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie. Meinen Eltern Karin und Friedel Neßbach und meinem Bruder Johannes Neßbach möchte ich dafür danken, dass sie mich in allen Lebenslagen und mir zu jeder Zeit den Rücken gestärkt haben und alles in ihrer Macht Stehende getan haben, um mich auf meinem Weg zu unterstützen. Ohne sie wäre meine Reise sicherlich deutlich früher zu Ende gegangen.

Meiner Frau Dr. Kristin Neßbach kann ich letztlich nicht genug danken. Sie hat mich in den schwierigen Zeiten motiviert, mir bei den großen Fragestellungen beiseite gestanden und mich auch in den schönen Momenten begleitet sowie die Freude mit mir geteilt. Das Besondere was ich ihr zu verdanken habe, ist jedoch, dass sie mich auch nach dem Abschluss meiner wissenschaftlichen Versuche stets motiviert hat auch die eigentliche Arbeit aufs Papier zu bringen. Dafür hat sie mir fortwährend den Rücken freigehalten und selbst auf Vieles verzichten müssen, um mir die notwendige Zeit auch an Wochenenden zu geben. Ohne sie hätte ich es nicht gemeistert. Vielen Dank!