



Fakultät für Medizin

Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie, Klinikum rechts der
Isar

Einfluss der Wundflüssigkeit unter Okklusivverbänden auf die Wundheilung von
Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen

Dr.med.univ. Michael Cerny

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hans-Günther Machens
2. Priv.-Doz. Dr. Kai Megerle

Die Dissertation wurde am 05.12.2017 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 01.05.2018 angenommen.

Inhaltsangabe

1	Zusammenfassung	4
2	Abstract	6
3	Abkürzungsverzeichnis	8
4	Einleitung	9
4.1	Physiologie der Wundheilung	9
4.1.1	Hämostase	10
4.1.2	Exsudative Phase oder Entzündungsphase	10
4.1.3	Proliferative Phase	11
4.1.4	Remodeling-Phase	13
4.1.5	Einfluss von mesenchymalen Stammzellen auf die Wundheilung	15
4.2	Fingerkuppenverletzungen	16
4.2.1	Anatomie der Fingerkuppe	17
4.2.2	Definition und Einteilung der Fingerkuppendifekte	19
4.2.3	Chirurgische Therapieoptionen bei Fingerkuppenverletzungen	22
4.2.4	Okklusivverband bei Fingerkuppenverletzungen	25
4.3	Narben	27
4.3.1	Narbenlose kutane Wundheilung beim Embryo	27
4.3.2	Pathologische Narbenbildung	29
4.4	Feuchte Wundbehandlung	30
4.5	Hypothese und Ziele der Studie	32
5	Material und Methoden	33
5.1	Studiendesign und Zulassung	33
5.2	Erstversorgung von Fingerkuppenverletzungen	33
5.3	Behandlung von Spalthautentnahmestellen	35
5.4	Wundflüssigkeitsgewinnung	36
5.5	Kryopräservierung der Proben	37
5.6	Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus humanem Fettgewebe	37
5.7	Zellkultur	38
5.8	Zellmetabolismus-Assay (Alamarblue)	38
5.9	Impedanz-Proliferationsassay (xCELLigence)	39
5.10	Impedanz-Migrationsassay (xCELLigence)	40
5.11	Statistische Auswertung	40

6	Resultate	41
6.1	Wundflüssigkeits- und Blutserumproben	41
6.2	Einfluss von Wundsekreten und Blutsera auf die Migration von MSC	41
6.3	Einfluss von Wundsekreten und Blutsera auf die Migration von HS27-Fibroblasten	43
6.4	Einfluss von Wundsekreten und Blutsera auf die Proliferation von MSC (kontinuierliche Impedanz-Proliferationsmessung (<i>xCELLigence</i>))	45
6.5	Einfluss von Wundsekreten und Blutsera auf die Proliferation von HS27-FB (kontinuierliche Impedanz-Proliferationsmessung (<i>xCELLigence</i>))	46
6.6	Einfluss von Wundsekreten und Blutsera auf die Proliferation von HS27-FB und MSC (Endpunkt-Proliferationsmessung (<i>Alamarblue</i>))	47
6.6.1	HS27-Fibroblasten	47
6.6.2	MSC	48
6.7	Zusammenfassung der Effekte der Wundflüssigkeiten auf die Migration und Proliferation von FB und MSC	49
7	Diskussion	51
7.1	Diskussion von Material und Methoden	51
7.2	Einfluss der okklusiven Wundflüssigkeit auf die Migration und Proliferation mesenchymaler Stammzellen	53
7.3	Einfluss der okklusiven Wundflüssigkeit auf die Migration und Proliferation von Fibroblasten	55
7.4	Potentieller Einfluss der okklusiven Wundflüssigkeit auf die Narbenmodulation	57
7.5	Einfluss der Wundflüssigkeit unter Okklusivverbänden auf die Angiogenese	61
7.6	Einfluss der Wundflüssigkeit unter Okklusivverbänden auf die Nervenregeneration	62
7.7	Ausblick	63
8	Schlussfolgerung	64
9	Literaturverzeichnis	65
10	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	81
10.1	Abbildungen	81
10.2	Tabellen	83
11	Danksagung	84

1 Zusammenfassung

Einleitung

Konservativ durch Okklusivverbände (OV) zur Abheilung gebrachte Fingerkuppenverletzungen charakterisieren sich in der Regel durch funktionell und ästhetisch überzeugende Ergebnisse. Die guten Resultate werden auf das feuchte Wundmilieu zurückgeführt, das regenerativ auf den Wundheilungsprozess wirkt. Da mesenchymale Stammzellen (MSC) und Fibroblasten (FB) wichtige Modulatoren der Wundheilung darstellen, sollte in der vorliegenden Analyse der Effekt der Wundflüssigkeit unter OV auf die Migration und Proliferation dieser Zellen untersucht werden.

Material und Methoden

Am fünften Tag nach Anlage des OV wurden Wundflüssigkeitsproben von vier Fingerkuppenverletzungen (Allen Grad II-III) und vier Spalthautentnahmestellen gewonnen. Als Kontrolle wurde von jedem Patienten Blutserum gewonnen. MSC und FB (HS27) wurden mit 5% Wundflüssigkeit oder Blutserum inkubiert. Die Proliferation und Migration der MSC und FB (HS27) wurden kontinuierlich mittels Impedanzmessung über 60 bzw. 15 Stunden aufgezeichnet. Zusätzlich wurde die Proliferation mit dem *Alamarblue*-Assay nach 72 Stunden gemessen.

Resultate

Zu Beginn der Inkubation (4–6 Stunden) war die MSC-Migration in den Ansätzen mit Wundflüssigkeit von Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Nach neun Stunden kehrte sich dieser Effekt um. Die HS27-FB-Migration war bei einer Inkubation zwischen fünf und zehn Stunden signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Die MSC-Proliferation in den Ansätzen beider Wundflüssigkeiten zusammen zeigte eine signifikante Steigerung nach fünf und zehn Stunden und eine signifikante Reduktion nach 45 Stunden. In den Ansätzen mit Wundflüssigkeit von Fingerkuppenverletzungen alleine war die HS27-FB-Proliferation nach 15 und 20 Stunden signifikant geringer. In den Ansätzen beider Wundflüssigkeiten zusammen zeigte sich eine signifikante Reduktion der HS27-FB-Proliferation nach 40 Stunden. Diese Daten wurden durch den *Alamarblue*-Assay bestätigt.

Schlussfolgerung: Durch die Anwendung fortgeschrittener Methoden der Zellüberwachungstechnologie war es möglich einen zeitabhängigen Effekt der Wundflüssigkeit unter OV auf die Migration und Proliferation von MSC und FB nachzuweisen. Die frühe Aktivierung der MSC-Migration und -Proliferation in Kombination mit einer verzögerten FB-Aktivierung könnte ein Hinweis auf eine abgestimmte Interaktion der beiden Zelltypen unter dem Einfluss der okklusiven Wundflüssigkeit sein. Diese Zellmodulation könnte für den verbesserten Wundheilungsprozess und die höhere Narbenqualität von mit OV behandelten Fingerkuppenverletzungen mitverantwortlich sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden unter Cerny, M. K. "Occlusive dressings induced secretomes influence the migration and proliferation of mesenchymal stem cells and fibroblasts differently" zur Veröffentlichung eingereicht.

2 Abstract

Introduction

Non-surgically with occlusive dressings (OV) treated fingertip injuries result in functionally excellent outcomes with nearly no visible scar formation. The clinically superior outcome is supposed to result from the creation of a moist wound environment, which acts pro-regeneratively. As mesenchymal stem cells (MSC) and fibroblasts (FB) act as important modulators in wound healing, the present work analyzes the effect of wound fluid under OV on the proliferation and migration of these cells.

Material and Methods

Five days after the application of the OV wound fluid samples of four fingertip injuries (Allen stage II-III) and four split-skin-donor sites, as well as blood serum samples from each patient as controls were collected. MSC and FB (HS27) were incubated in 5% of these wound fluid and blood serum samples. The proliferation and migration of MSC HS27-FB were continuously monitored by impedance analysis for 60 respectively 15 hours. Additionally the proliferation was measured after 72 hours with the Alamarblue-Assay.

Results

At the beginning of incubation (4-6 hours) the MSC-migration in wound fluid samples from fingertip injuries and split skin donor sites was significantly increased compared to the controls. After 9 hours, this effect was reversed. The migration of HS27-FB was significantly increased between 5 and 10 hours compared to the controls. The proliferation of MSCs of both wound fluids combined showed a significant increase at 5 and 10 hours and a significant decrease after 45 hours. HS27-FB proliferation was significantly decreased in the fingertip fluids alone at 15 and 20 hours. Both wound fluids combined showed a significant reduction after 40 hours. This was confirmed by Alamarblue assay.

Conclusion

Using advanced cell surveillance technology, we demonstrate a time-dependent effect of wound fluid under occlusive dressings on migration and proliferation of MSCs and fibroblasts. The early activation of MSC migration and proliferation in combination with an activation of fibroblasts points at a well-orchestrated interplay between stromal cells and occlusive wound fluid, which could be responsible for the improved wound healing process and scar quality seen in occlusively-treated wounds.

3 Abkürzungsverzeichnis

Ø	Arithmetischer Mittelwert
±	Plus, minus
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
FB	Fibroblasten
FCS	<i>fetal calf serum</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
HIF-1 (α)	<i>hypoxia-inducible factor 1 (α)</i>
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
IL	Interleukin
IP-10	<i>interferon-inducible protein 10</i>
MEM-alpha	<i>minimal essential medium alpha</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MSC	mesenchymale Stammzellen
OV	Okklusivverband
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor α</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

4 Einleitung

Die chirurgische Behandlung von nicht infizierten Wunden führt in der Regel zu einer schnellen Wundheilung und zu ästhetisch ansprechenden Narben. Die Schnittführung kann geplant und das Nahtmaterial an das verletzte Gewebe und die Defektzone angepasst werden. Bei manchen Wunden ist aber eine chirurgische Therapie nicht nur wenig zielführend, sondern geht auch mit einem erhöhten Risiko für Narbenbildung, Schmerzen und für eine reduzierte Regeneration der Sensibilität und Funktion einher (Mennen and Wiese 1993). Fingerkuppenverletzungen, die konservativ mit einem Okklusivverband (OV) behandelt werden, zeigen klinisch herausragende Ergebnisse, die in vielen Bereichen einer operativen Versorgung überlegen sind. Dies betrifft vor allem die Regeneration der Kuppenform, die Regeneration der Sensibilität, die praktisch narbenlose Abheilung der Defektzone sowie den Erhalt der Funktion (Hoigne, Hug et al. 2014). Vermutlich beruht der Großteil der beschriebenen positiven Effekte auf dem feuchten Wundmilieu unter dem OV (Alvarez, Mertz et al. 1983). Zur Therapie von Wunden mit OV wurden bereits eine Vielzahl von Studien publiziert (Mennen and Wiese 1993) (Vogt, Andree et al. 1995). Fingerkuppendifekte regenerieren quasi vollständig, was bei erwachsenen Menschen in dieser Form einzigartig ist (Rinkevich, Lindau et al. 2011). Nach wie vor ist jedoch nicht klar, warum Fingerkuppen ein so außergewöhnliches Regenerationspotential aufweisen und welche Rolle OV dabei spielen. Um sich dieser Fragestellung zu nähern, ist das Verständnis grundlegender physiologischer Abläufe der Wund- und Narbenheilung unverzichtbar.

4.1 Physiologie der Wundheilung

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Durch ihren Aufbau kann sie chemischen, mechanischen und biologischen Reizen widerstehen (Evans, Oreffo et al. 2013). Die beiden äußeren Schichten der Haut, die Epidermis und Dermis, sind durch eine dünne Schicht voneinander getrennt, die als Basalmembran bezeichnet wird (Evans, Oreffo et al. 2013). Im Falle einer Verletzung werden die äußeren Schichten der Haut durchbrochen, wodurch ihre Funktionen und die der darunter liegenden Gewebe gestört werden (Katz, Alvarez et al. 1991). Zur Wiederherstellung der Homöostase und der normalen physiologischen Gewebefunktion ist eine schnelle

und gezielte Defektregeneration entscheidend (Eming, Krieg et al. 2007). Die Regeneration dient vor allem der Vermeidung von Infekten und der Begrenzung von Flüssigkeitsverlusten (Singer and Clark 1999).

Bereits bei der initialen Verletzung wird die Wundheilung durch eine Kaskade von Reaktionen in Gang gesetzt, die man in drei bis vier Phasen einteilen kann (Singer and Clark 1999) (siehe **Abbildung 1**).

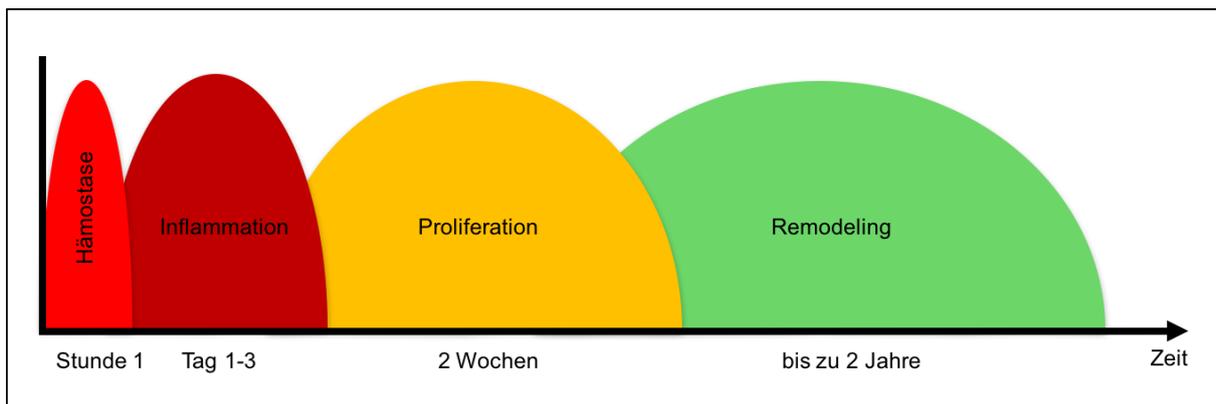


Abbildung 1. Phasen der Wundheilung nach (Greaves, Ashcroft et al. 2013) und (Clark 1985)

4.1.1 Hämostase

Direkt nach der Verletzung des Hautmantels und Durchtrennung von subkutanen Blutgefäßen kommt es zur Aggregation von Blutplättchen mit initialer Koagulation und Ausschüttung chemotaktischer Faktoren (Clark 1985). Dieses sich innerhalb der ersten Stunde nach der Verletzung bildende Fibrinkoagulum (Greaves, Ashcroft et al. 2013) dient der schnellen Blutstillung und einem ersten provisorischen Wundverschluss, um das Eindringen möglicher Pathogene zu verhindern (Evans, Oreffo et al. 2013) (siehe **Abbildung 1**). Verantwortlich für die Hämostase ist die plasmatische Gerinnung, deren Endprodukt das quervernetzte Fibrin ist, sowie Endothelzellen und Thrombozyten (Versteeg, Heemskerk et al. 2013).

4.1.2 Exsudative Phase oder Entzündungsphase

Die exsudative Phase oder Entzündungsphase folgt direkt auf die Hämostase und dauert ca. zwei bis drei Tage (Clark 1985). Das initial im Rahmen der Hämostase

gebildete Fibringefüge dient als Matrix für chemotaktisch rekrutierte Zellen, die zu Beginn v.a. aus neutrophilen Granulozyten bestehen (Gurtner, Werner et al. 2008). Die Rekrutierung erfolgt primär durch die Plättchendegranulation, die Aktivierung von Komplement und durch parakrine Effekte des verletzten, absterbenden Gewebes (Grose and Werner 2004). Blutplättchen sezernieren Wachstumsfaktoren, wie den *platelet-derived growth factor* (PDGF), der wiederum Makrophagen und Fibroblasten (FB) aktiviert (Singer and Clark 1999). Die neutrophilen Granulozyten eliminieren anschließend Bakterien, Fremdmaterial und nekrotisches Gewebe und werden von Makrophagen phagozytiert (Singer and Clark 1999). Makrophagen entstehen durch Differenzierung aus Monozyten, die durch Zytokine wie *transforming growth factor* (TGF) β , *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) oder Bruchstücke von Matrixproteinen chemotaktisch angelockt ins Wundgebiet einwandern (Brown 1995). Aktivierte Makrophagen sezernieren Wachstumsfaktoren, wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und PDGF, die die Bildung des Granulationsgewebes initiieren (Brown 1995). Neben PDGF und VEGF werden weitere Wachstumsfaktoren durch Thrombozyten und Makrophagen sezerniert; dazu zählen TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β a, *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) und *keratinocyte growth factor* (KGF) (Singer and Clark 1999) (siehe **Tabelle 1**).

4.1.3 Proliferative Phase

Die proliferative Phase beginnt ab dem dritten Tag nach der Verletzung und dauert ca. zwei Wochen. Die Hauptaufgabe in dieser Zeit ist die Bildung eines Granulationsgewebes, das proliferierenden Zellen als Leitstruktur dient und den Wundschluss beschleunigt (Clark 1985). Zu Beginn migrieren Keratinozyten über die offen liegende Dermis in die Wunde, während Makrophagen und FB die Angiogenese induzieren (Gurtner, Werner et al. 2008). In dieser Phase sind Makrophagen u.a. für die Sekretion von Wachstumsfaktoren zuständig, die die Angiogenese anregen und die Matrixbildung vorantreiben. In das neu gebildete, die Wunde auskleidende Granulationsgewebe wandern weitere FB, Makrophagen und Blutgefäße ein (Hunt and Hopf 1997). Die Migration von FB wird durch bFGF, PDGF und TGF- β gesteuert und über Integrin-Rezeptoren vermittelt (Greiling and Clark 1997). Die provisorische Fibrinmatrix wird schließlich durch Granulationsgewebe ersetzt, das initial aus FB, Makrophagen und neu gebildeten Gefäßen in einer lockeren Matrix aus Hyaluronsäure

(Glukosaminoglykane), Fibronectin und Kollagen Typ III besteht (Greiling and Clark 1997) (Pierce, Mustoe et al. 1991). Dabei scheint TGF- β die Formation und den Erhalt des Granulationsgewebes wesentlich zu steuern, indem es FB zur Produktion von Kollagen Typ I animiert, die Synthese von Zelladhäsionsproteine induziert sowie die Wirkung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) abschwächt (Schilling 1976) (Goldman 2004). Die höchsten Konzentrationen von TGF- β finden sich zwischen sieben und 14 Tagen nach der initialen Verletzung (Goldman 2004). *Interferon-inducible protein 10 (IP-10)* fungiert in diesem Kontext vermutlich als Gegenspieler von TGF- β (Henry and Garner 2003). IP-10 führt zur Hemmung der durch *epidermal growth factor (EGF)* induzierten FB-Motilität und zur Reduktion der FB-Rekrutierung (Henry and Garner 2003). Zusätzlich wirkt der zu Beginn der Wundheilung von Thrombozyten sezernierte *platelet factor 4 (PF-4)* hemmend auf die FB-Proliferation (Henry and Garner 2003).

Am Ende der proliferativen Phase wandern FB, stimuliert durch Makrophagen, vom Wundrand her in die Wunde ein und differenzieren zu Myofibroblasten (Opalenik and Davidson 2005). In diesen Prozess ist ebenfalls der Wachstumsfaktor TGF- β involviert, der die Wundkontraktion fördert, indem er die Differenzierung von FB zu Myofibroblasten induziert (Yang, Lin et al. 1997). Der Wundverschluss wird durch die Aktivität von Myofibroblasten erleichtert, die durch eine aktive Kontraktion die Wundränder näher aneinander heranführen (Werner, Krieg et al. 2007). TGF- β fördert die Differenzierung von FB zu Myofibroblasten was die Kontraktilität steigert und den Wundschluss erleichtert (Grinnell 2003). Keratinozyten können nun vom Wundrand her einwandern und die Barrierefunktion der Haut durch Reepithelialisierung des Restdefektes wiederherstellen (Werner and Grose 2003).

Tabelle 1. Wachstumsfaktoren in der Wundheilung (Auswahl) nach (Singer and Clark 1999). aFGF – *acidic fibroblast growth factor*, bFGF – *basic fibroblast growth factor*, KGF – *keratinocyte growth factor*, EGF – *epidermal growth factor*, FB – Fibroblasten, TGF- α – *transforming growth factor α* , TGF- β 1– β 3 – *transforming growth factor β 1– β 3*, TNF- α – *tumor necrosis factor α* , VEGF – *vascular endothelial growth factor*, PDGF – *platelet-derived growth factor*, IGF-1 – *insulin-like growth factor 1*

Familie	Wachstumsfaktoren	Sekretion durch	Effekt
<i>Fibroblast growth factor</i>	aFGF, bFGF, KGF	Endothelzellen, Makrophagen, FB	Angiogenese (aFGF, bFGF), Epithelialisierung, Kollagensynthese und Wundkontraktion (bFGF), Epidermale Migration und Proliferation (KGF)
<i>Epidermal growth factor</i>	EGF, TGF- α	Thrombozyten (EGF), Epidermale Stammzellen und Makrophagen (TGF- α)	Stimulation der Proliferation und Migration von FB und Endothelzellen, Angiogenese (EGF) Proliferation und Migration mehrerer Zelllinien (TGF- α)
<i>Transforming growth factor β</i>	TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3	Makrophagen, Thrombozyten	Chemotaxis von FB und Makrophagen, FB-Proliferation und Kollagensynthese, <i>Remodeling</i> (TGF- β 1, TGF- β 2) Narbenmodulierende Effekte, antagonisiert TGF- β 1 und TGF- β 2 (TGF- β 3)
Sonstige	TNF- α	Neutrophile Granulozyten	Expression multipler Wachstumsfaktoren
	VEGF	Makrophagen, Epidermale Stammzellen	Erhöhung der vaskulären Permeabilität, Angiogenese
	PDGF	Makrophagen, Thrombozyten, Epidermale Stammzellen	Makrophagenaktivierung und -chemotaxis, Proliferation und Chemotaxis von FB
	IGF-1	Epidermale Stammzellen, FB	Bildung von Granulationsgewebe, Reepithelialisierung

4.1.4 Remodeling-Phase

Nach 14 Tagen beginnt die *Remodeling*-Phase, die mehr als ein Jahr andauern kann (Gurtner, Werner et al. 2008). In dieser Phase wird das initiale Granulationsgewebe, das hauptsächlich aus Fibronectin, Fibrin, Proteoglykanen, Glukosaminoglykanen sowie Kollagen Typ III besteht, in finales Narbengewebe umgebaut (Kurkinen, Vaheri

et al. 1980). Die Struktur und Beschaffenheit dieser initialen Matrix ist zunächst noch ungeordnet. Im Laufe der Zeit wird das Granulationsgewebe durch ein geordnetes Netzwerk ersetzt, das vor allem aus Kollagen Typ I besteht (Ehrlich and Krummel 1996). Dabei sezernieren FB, Endothelzellen und Makrophagen Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die unter dem Einfluss von PDGF, TGF- β , EGF und Interleukin 1 (IL-1) die temporäre Matrix in eine stabile und organisierte, finale Matrix umwandeln (Henry and Garner 2003) (Ehrlich and Krummel 1996). Das in den frühen Phasen der Wundheilung dominierende Kollagen Typ III wird durch Kollagen Typ I ersetzt, das in unverletzter Haut 80–90% des Gesamtkollagens ausmacht (Ehrlich and Krummel 1996) (siehe **Abbildung 2**). Das initiale Kollagen der Wundregeneration ist deutlich dünner und seine Fasern sind im Gegensatz zu unverletzten Hautarealen parallel angeordnet. Kollagenfasern der Haut sind normalerweise wie ein Korbgeflecht vernetzt. Ein solches Muster wird auch nach Regeneration der Verletzung an dieser Stelle nicht mehr erreicht (Witte and Barbul 1997).

Durch die Kollagensynthese der FB und durch die Quervernetzungen der Fasern wird die mechanische Widerstandsfähigkeit des Wundgewebes gestärkt. Seine Reißfestigkeit beträgt 70–80% im Vergleich zur unverletzten Haut (Teller and White 2009). Das Endprodukt wird als Narbengewebe bezeichnet, das im Vergleich zu unverletzter Haut in seiner Mikrostruktur signifikant verändert ist (Ferguson, Whitby et al. 1996) (Gurtner, Werner et al. 2008) (Forrest 1983).

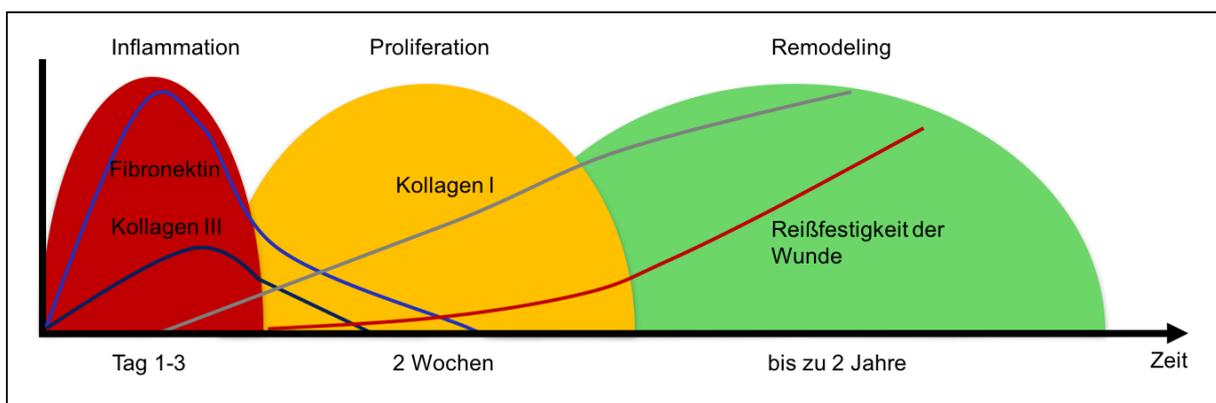


Abbildung 2. Umwandlung der Matrix im Zuge der Wundheilung nach (Witte and Barbul 1997)

4.1.5 Einfluss von mesenchymalen Stammzellen auf die Wundheilung

Mesenchymale Stammzellen (MSC) können sich eigenständig regenerieren und zusätzlich in verschiedene Zelltypen, wie Adipozyten oder Chondrozyten, differenzieren (Ding, Shyu et al. 2011). MSC werden aus Fettgewebe, Knochenmark und der Nabelschnur gewonnen, wobei die Gewinnung aus Fettgewebe aufgrund der geringen Invasivität des Eingriffs und der hohen Zellausbeute präferiert wird (Hassan, Greiser et al. 2014).

MSC sind wichtige Modulatoren der Wundheilung und für die Regulation der Granulationsphase und die Steuerung des *Remodelings* verantwortlich (Maxson, Lopez et al. 2012). In der Entzündungsphase erhöhen MSC die Konzentration anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-4 und IL-10, und hemmen die Aktivität entzündungsfördernder Wachstumsfaktoren, wie Interferon- γ und *tumor necrosis factor* α (TNF- α) (Aggarwal and Pittenger 2005). Damit begrenzen MSC die inflammatorische Phase zeitlich. Eine verlängerte inflammatorische Phase trifft man in chronischen Wunden an, die sich durch eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Wundgebiet auszeichnen (Diegelmann and Evans 2004). MSC wirken primär in ihrer unmittelbaren Zellumgebung (parakrin) durch die Sekretion anaboler Wachstumsfaktoren wie TGF- β , KGF, VEGF, bFGF und EGF (Gnecchi, Zhang et al. 2008). Speziell hohe Konzentrationen von VEGF und *hepatocyte growth factor* (HGF) und eine vermehrte Synthese von TGF- β 3 bei gleichzeitiger Suppression von TGF- β 1 scheinen die Narbenbildung zu reduzieren (Shah, Foreman et al. 1995). Damit modulieren MSC die Granulationsphase, induzieren die Angiogenese und fördern die Zellmigration und -proliferation (Gnecchi, Zhang et al. 2008). In der Proliferationsphase ist die Kollagensynthese von FB und später deren Differenzierung zu kontraktilen Myofibroblasten in hohem Ausmaß von MSC abhängig (Maxson, Lopez et al. 2012). Smith et al. zeigten, dass sich der Anteil an von dermalen FB sezerniertem Kollagen Typ I durch parakrine Effekte von MSC erhöht, was einen schnelleren Wundverschluss ermöglicht (Smith, Willis et al. 2010). Auch ein durch MSC konditioniertes Medium löst nahezu dieselben Effekte aus und führt *in vitro* zur Zellproliferation von Keratinozyten, Endothelzellen und FB (Smith, Willis et al. 2010). Generell sind FB und MSC unverzichtbare Modulatoren der Wund- und Narbenheilung mit spezifischen Wirkungen in jeder Phase des Wundheilungsprozesses (Maxson, Lopez et al. 2012) (siehe **Abbildung 3**).

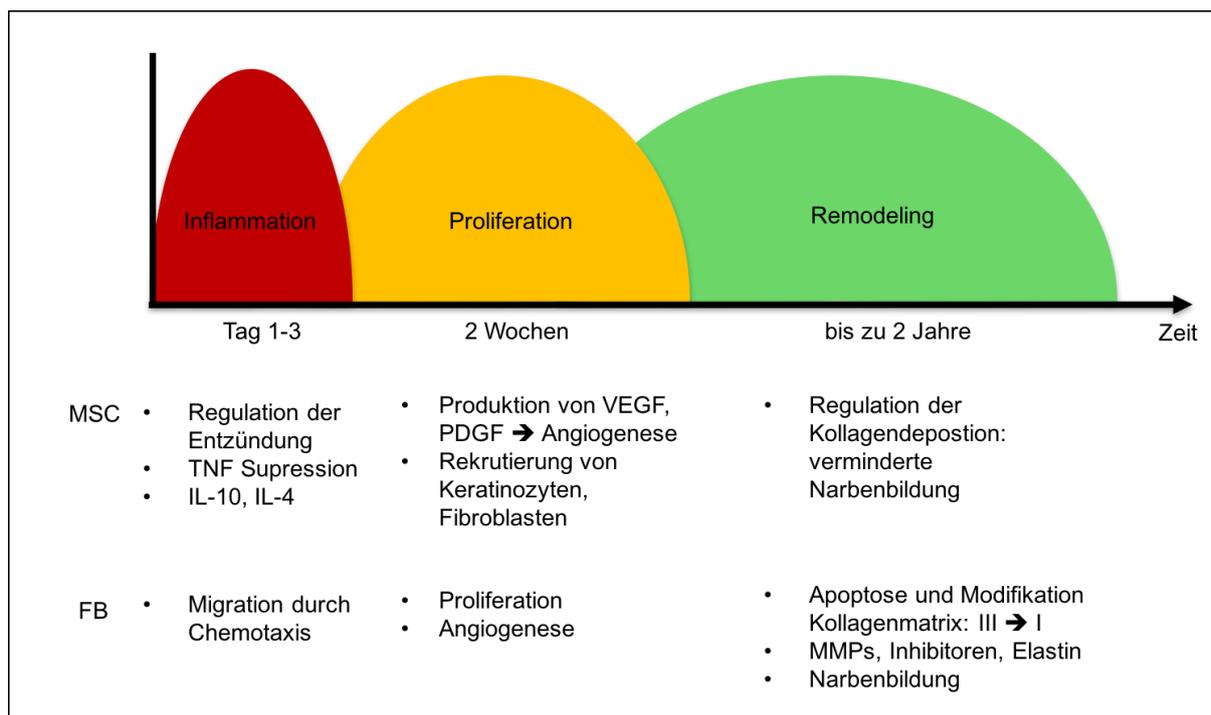


Abbildung 3. Wirkungen von MSC und FB in den Phasen der Wundheilung nach (Maxson, Lopez et al. 2012). FB – Fibroblasten, IL-10/4 – Interleukin 10/4, MMPs – Matrix-Metalloproteinasen, MSC – mesenchymale Stammzellen, PDGF – *platelet-derived growth factor*, TNF – Tumor-Nekrose-Faktor, VEGF – *vascular endothelial growth factor*

4.2 Fingerkuppenverletzungen

Verletzungen der Hand sind weit verbreitet und machen 25% aller berufsbedingten Verletzungen aus (Chau, Gauchard et al. 2004). Betroffen sind häufig die Fingerkuppen. Aufgrund der ausgeprägten Sensibilität der Fingerbeeren und der wichtigen Greif- und Tastfunktion der Hand schränken Fingerkuppenverletzungen den Alltag der Betroffenen stark ein (Ha, Chang et al. 2015). Eine möglichst vollständige Wiederherstellung der Fingerintegrität ist daher das vorrangige Ziel bei der Versorgung dieser Verletzungen.

Fingerkuppenverletzungen können sowohl chirurgisch als auch konservativ versorgt werden (Martin and Gonzalez del Pino 1998), wobei die Versorgung mittels OV in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat (Damert and Altmann 2012).

4.2.1 Anatomie der Fingerkuppe

Die in verschiedenen Publikationen festgelegten anatomischen Grenzen der Fingerkuppen variieren. Allgemein werden jedoch drei Hauptbestandteile unterschieden (de Alwis 2006) (siehe **Abbildung 4**):

- die Pulpa oder Fingerbeere
- der Nagel
- die Endphalanx des Fingers

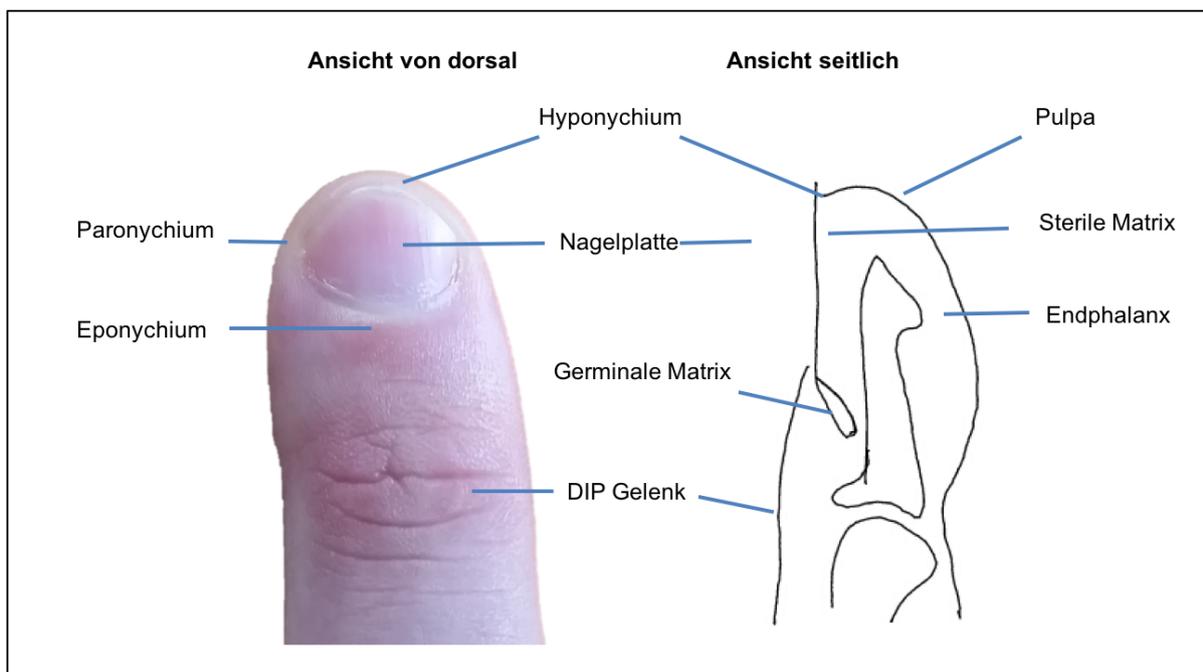


Abbildung 4. Anatomie der Fingerkuppe nach (de Alwis 2006) und (Peterson, Peterson et al. 2014). DIP-Gelenk – distales Interphalangealgelenk

Die Pulpa besteht hauptsächlich aus dichtem Bindegewebe mit Fett, das von einer dicken Epidermis bedeckt wird und durch Kollagenfasern am Periost der Endphalanx des Fingers befestigt ist (Hauck, Camp et al. 2004). Am Oberflächenrelief der epidermalen Pulpa zeigen sich papilläre Furchen, die für den individuellen Fingerabdruck verantwortlich sind (Peterson, Peterson et al. 2014). Die Sensibilität der Fingerbeere wird durch Äste der beiden Digitalnerven vermittelt, die sich palmar der jeweiligen Digitalarterie ulnar und radial an jedem Finger und dem Daumen befinden (Peterson, Peterson et al. 2014). Zusätzlich verfügt diese Region über eine hohe Dichte an sensorischen Rezeptoren, die Reize, wie Vibration, Kälte, Wärme sowie taktile Propriozeption und 2-Punkte-Diskrimination, vermitteln (Zook 1990) (Peterson,

Peterson et al. 2014). Die bis zu 56% des Volumens der gesamten Fingerkuppe umfassende Pulpa ist für den Erhalt der Funktion und des Feingefühls der Finger wesentlich (Murai, Lau et al. 1997).

Der Nagel dient zum Schutz der dorsalen Fingerkuppe und unterstützt die Greiffunktion des Fingers (Tos, Titolo et al. 2012). Der Nagel wird in unterschiedliche Anteile gegliedert (siehe **Abbildung 4**). Der als Nagelbett bezeichnete, proximale Anteil des Nagels setzt sich aus der germinalen Matrix und der sterilen Matrix zusammen (Peterson, Peterson et al. 2014). Die germinale Matrix produziert den Nagel indem keratinisierte Plattenepithelzellen nach oben-distal geschoben werden (Fleckman and Allan 2001) (Peterson, Peterson et al. 2014). Die sterile Matrix liegt distal der germinalen Matrix und wird nicht vom Eponychium, dem proximalen Hautüberschuss zur Nagelplatte, überdeckt (Peterson, Peterson et al. 2014) (siehe **Abbildung 4**). Die laterale Hautfalte und Begrenzung des Nagels wird als Paronychium und die distale Falte als Hyponychium bezeichnet. Das normale Nagelwachstum beträgt durchschnittlich 0,1 mm pro Tag (Fleckman and Allan 2001).

Die Endphalanx bildet die dritte anatomische Hauptstruktur der Fingerkuppe. Der Nagel liegt relativ nah am Knochen; dorsal fehlen die Subkutis und Dermis, was speziell bei Verletzungen der Nagelmatrix mit nachfolgender Infektion das Risiko einer Osteomyelitis erhöht (de Alwis 2006) (Peterson, Peterson et al. 2014).

Die Fingerkuppe wird hauptsächlich durch die beiden palmaren Digitalarterien versorgt, die sich im Bereich des Endgelenkes in feine Äste verzweigen (Peterson, Peterson et al. 2014). Jeweils ein Ast versorgt in der Regel die Fingerbeere, das Nagelbett sowie die Matrix (Peterson, Peterson et al. 2014) (siehe **Abbildung 5**).

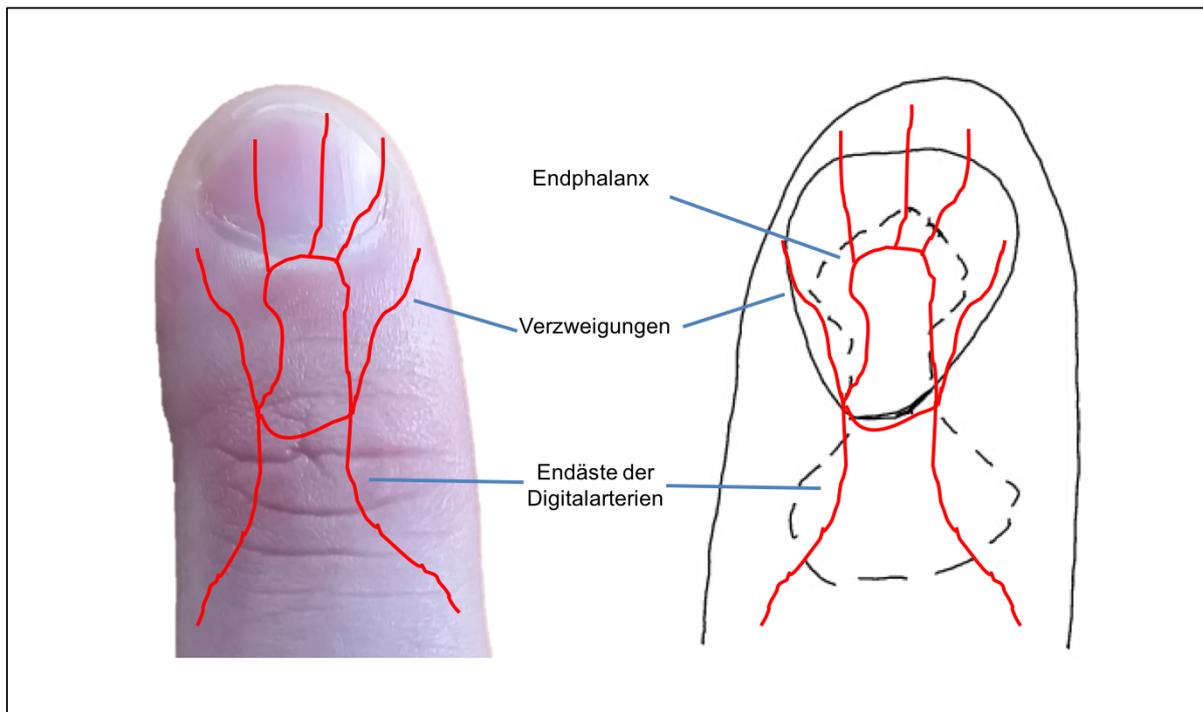


Abbildung 5. Arterielle Durchblutung der Fingerkuppe, Ansicht von dorsal nach (Peterson, Peterson et al. 2014)

4.2.2 Definition und Einteilung der Fingerkuppendifekte

Als Verletzung der Fingerkuppe werden allgemein alle Verletzungen distal der Sehnenansätze von Beuge- und Strecksehnen an der Endphalanx des Fingers ohne Beteiligung des distalen Interphalangealgelenkes (DIP) bezeichnet (Fassler 1996).

Die Einteilung von Fingerkuppenverletzungen erfolgt entweder nach der Amputationshöhe (Allen 1980), dem Substanzverlust der Pulpa (Fassler 1996) oder nach der Verletzungshöhe der arteriovenösen Versorgung der Fingerkuppe (Tamai 1982) (siehe **Abbildung 6-8**). Zusätzlich definiert die PNB-Klassifikation das Ausmaß der Verletzung nach der Schwere und Beteiligung der Pulpa (P), des Nagels (N) und des Knochens (B) anhand eines Zahlencodes (Evans and Bernardis 2000), der allerdings im klinischen Alltag nicht zwingend hilfreich ist bzw. als zu komplex erscheinen kann (Pinsolle, Salmi et al. 2007).

Allen unterteilt die Verletzung in Abhängigkeit von der Amputationshöhe in vier Schweregrade (Allen 1980) und geht in der Regel von einer queren Verletzung aus (siehe **Abbildung 6**):

- Allen Grad I: alleinige Verletzung der Pulpa des Fingers.
- Allen Grad II: Verletzung der Pulpa mit Beteiligung des Nagelbettes ohne Beteiligung der Endphalanx oder der germinalen Matrix.
- Allen Grad III: Verletzung der Fingerkuppe mit Beteiligung der Endphalanx und deutlicher Verletzung des Nagelbettes.
- Allen Grad IV: Verletzung proximal des Eponychiums mit ggf. Beteiligung von Sehnenansätzen der Beuge- und / oder Strecksehne (Allen 1980)

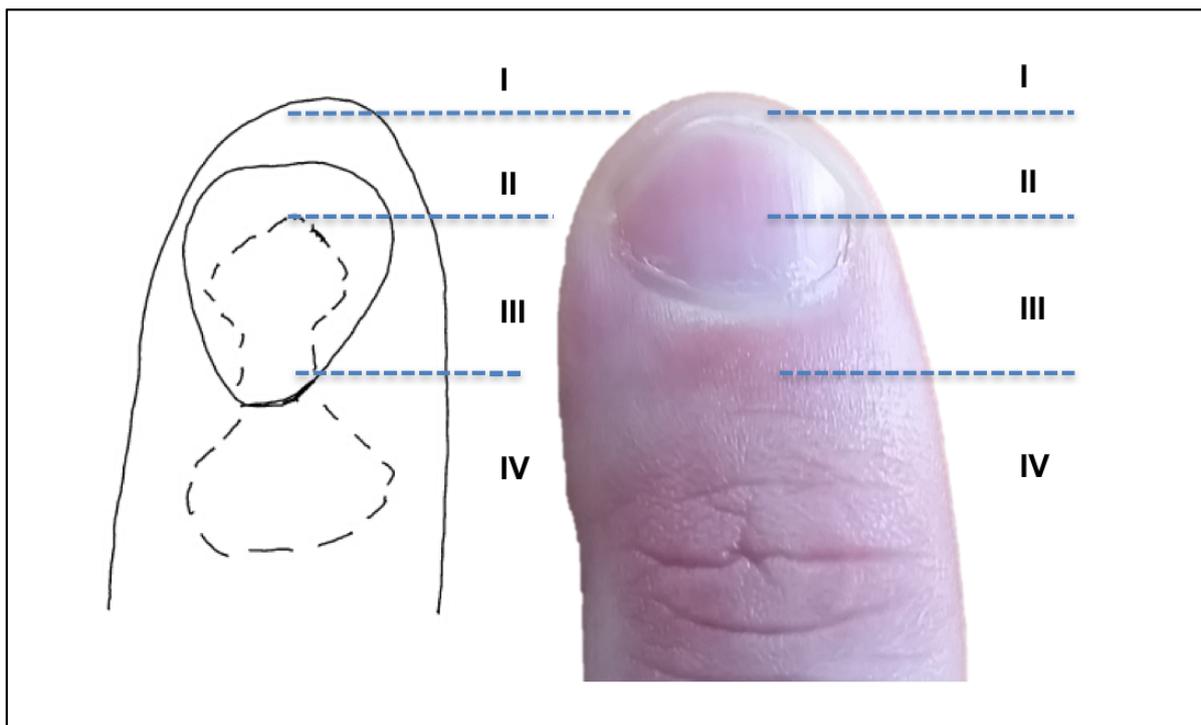


Abbildung 6. Klassifikation der Fingerkuppenverletzungen nach Allen (Allen 1980)

Fassler unterteilt Verletzungen anhand der Lage und der Strukturbeteiligung des Substanzdefektes der Fingerkuppe (Fassler 1996) (siehe **Abbildung 7**):

- Fassler Typ A: palmare, schräge Verletzung der Pulpa ohne Nagel- oder Knochenbeteiligung.
- Fassler Typ B: palmare, schräge Verletzung der Pulpa mit Nagel- und Knochenbeteiligung.
- Fassler Typ C: quere Fingerkuppenamputation mit Nagel- und ggf. Knochenbeteiligung.

- Fassler Typ D: dorsale, schräge Verletzung mit Beteiligung des Nagels, ggf. der germinalen Nagelmatrix und des Knochens (Fassler 1996).

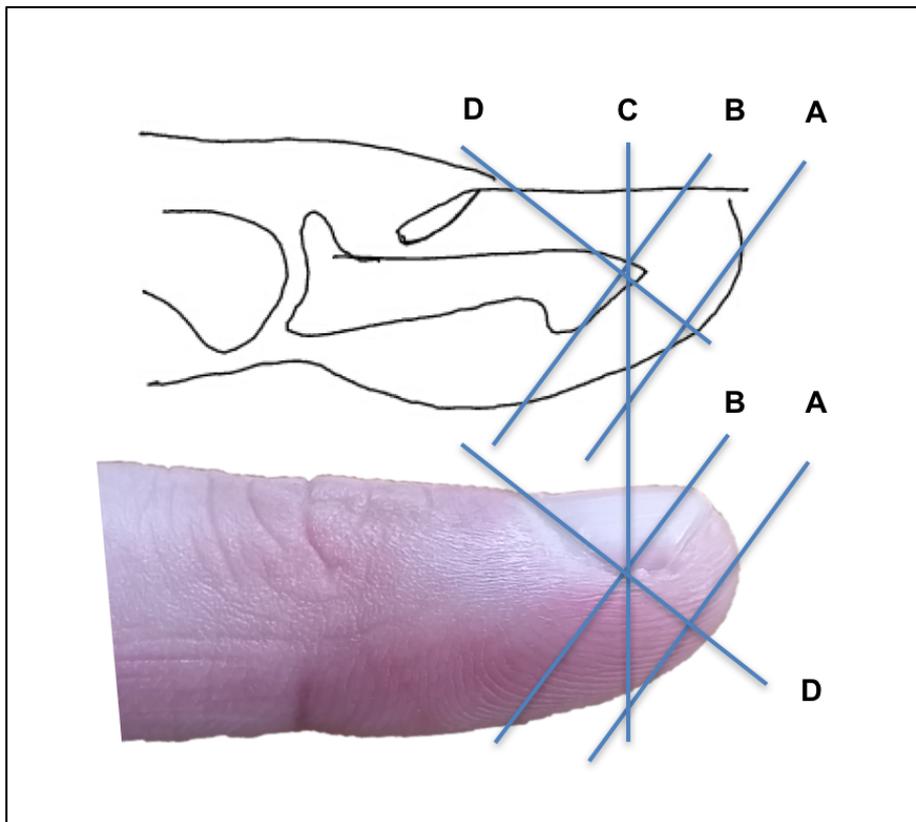


Abbildung 7. Klassifikation der Fingerkuppenverletzungen nach Fassler (Fassler 1996)

Tamai teilt die Verletzungen in Abhängigkeit von der betroffenen arteriovenösen Durchblutung ein (Tamai 1982) (siehe **Abbildung 8**):

- Tamai Zone I: Amputation bis an die Nagelbasis heranreichend. Im Falle einer möglichen Replantation wird empfohlen entweder eine der beiden Digitalarterien oder die Arterie, die aus den beiden Digitalarterien gespeist wird, zu anastomosieren (Tamai 1982) (Peterson, Peterson et al. 2014).
- Tamai Zone II: Verletzung innerhalb der Nagelmatrix und des Endgelenkes (DIP-Gelenk – distales Interphalangealgelenk). In dieser Verletzungshöhe sollten beide Digitalarterien separat mit großer Sicherheit vorhanden sein. Daher sollte eine getrennte Anastomosierung der verletzten Gefäße möglich sein (Tamai 1982) (Peterson, Peterson et al. 2014).

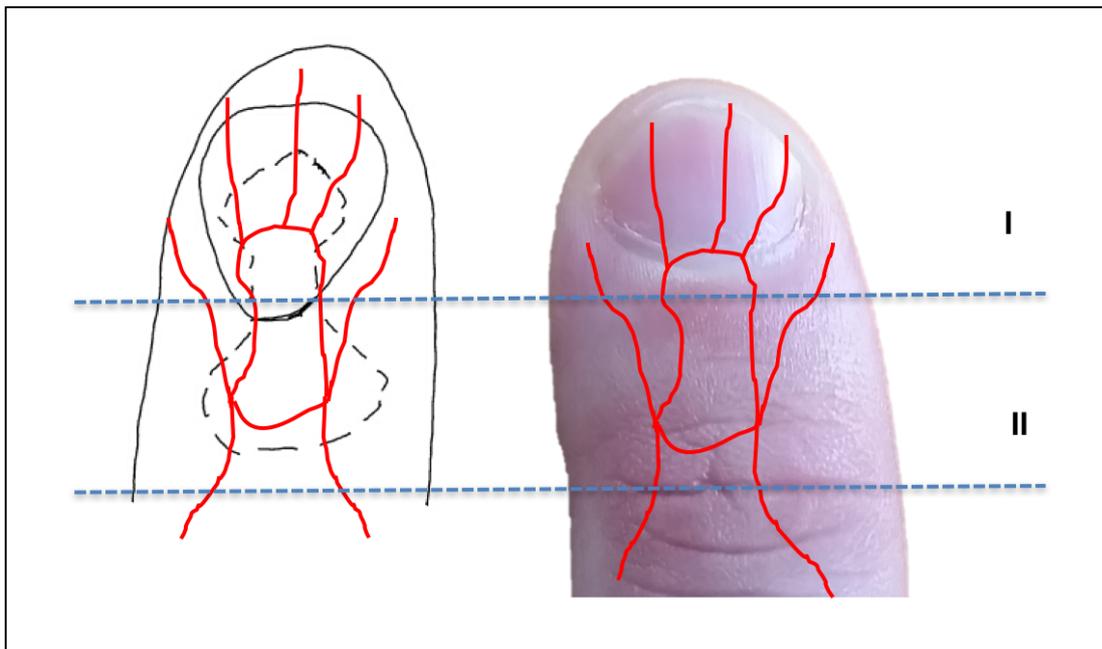


Abbildung 8. Klassifikation der Fingerkuppenverletzungen nach Tamai (Tamai 1982). In Rot – schematische Darstellung der arteriellen Durchblutung.

Ishikawas Klassifikation von Fingerkuppenverletzungen ähnelt der Klassifikation nach Tamai. Das Ausmaß der Verletzung hängt hier ebenfalls von der Höhe der arteriovenösen Versorgung ab. Die Verletzungen werden jedoch in vier anstelle von zwei Zonen unterteilt (Ishikawa, Ogawa et al. 1990).

4.2.3 Chirurgische Therapieoptionen bei Fingerkuppenverletzungen

Abhängig von der Defektgröße, der Beteiligung von Knochen der Endphalanx sowie der Klassifizierung der Verletzung gibt es verschiedene Möglichkeiten der chirurgischen Rekonstruktion von Fingerkuppenverletzungen (Lemmon, Janis et al. 2008) (Peterson, Peterson et al. 2014). Generell sind folgende chirurgische Therapiemethoden möglich:

- Das *composite grafting* kann speziell bei Kindern und Jugendlichen angewandt werden und beschreibt das Annähen der abgetrennten Kuppe ohne mikrochirurgische Anastomosierung (Eberlin, Busa et al. 2015).
- Die Vollhaut- oder Spalthauttransplantation zur Defektdeckung eignet sich nur bei geringer Defektgröße und -tiefe ohne freiliegende Knochen oder Sehnen

(Peterson, Peterson et al. 2014). Bei der Planung sollte bedacht werden, dass Hauttransplantate zur Deckung von palmaren Defekten abhängig von der Lokalisation der Entnahme oft keinen gleichwertigen Hautersatz darstellen (Eryilmaz, Tellioglu et al. 2013). Die palmare, als Leistenhaut bezeichnete Haut der Hand zeichnet sich durch eine stärkere Epidermis und Dermis aus (Eryilmaz, Tellioglu et al. 2013). Sie ist damit mechanisch stabiler, als beispielsweise die Haut, die die Handrücken und dorsalen Finger bedeckt, und wird stärker mit Nervenfasern versorgt (Eryilmaz, Tellioglu et al. 2013) (Cheema and Ahmad 2012). Die palmare Haut ist zusätzlich durch die Grayson'schen und Cleland'schen Hautbänder fixiert und somit im Vergleich zur dorsalen Haut kaum verschiebbar (Zwanenburg, Werker et al. 2014).

- Die plastische Rekonstruktion mittels einer lokalen Lappenplastik wird in der Literatur ausführlich beschrieben (Opalenik and Davidson 2005) (de Alwis 2006). Der zur Defektdeckung verwendete VY-Verschiebelappen nach Atasoy stammt aus dem palmaren Fingerbereich und eignet sich gut für Verletzungen bis Klasse II nach Allen (Atasoy, Ioakimidis et al. 1970) (Meyer-Marcotty, Kall et al. 2007) (siehe **Abbildung 9**). Der bilaterale VY-Dehnungslappen nach Kutler, entweder von radial oder von ulnar ins Defektgebiet geschwenkt, kann ebenfalls Defekte bis Allen Klasse II versorgen (Kutler 1947). Die Moberg-Lappenplastik, die bevorzugt bei Endgliedverletzungen des Daumens zur Anwendung kommt, verwendet ebenfalls einen palmaren Lappen zur Defektdeckung (Moberg 1964) (siehe **Abbildung 10**).

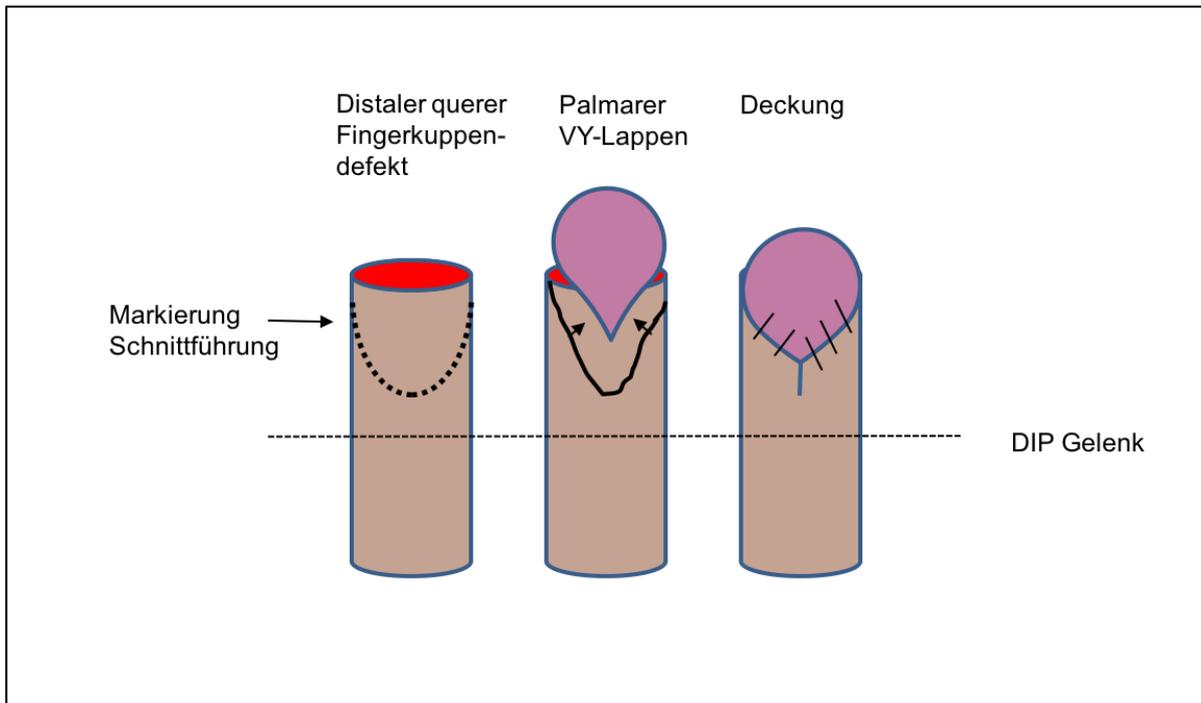


Abbildung 9. VY-Dehnungslappenplastik nach Atasoy zur Deckung von distalen Fingerkuppenverletzungen nach (Meyer-Marcotty, Kall et al. 2007).

DIP Gelenk – distales Interphalangealgelenk

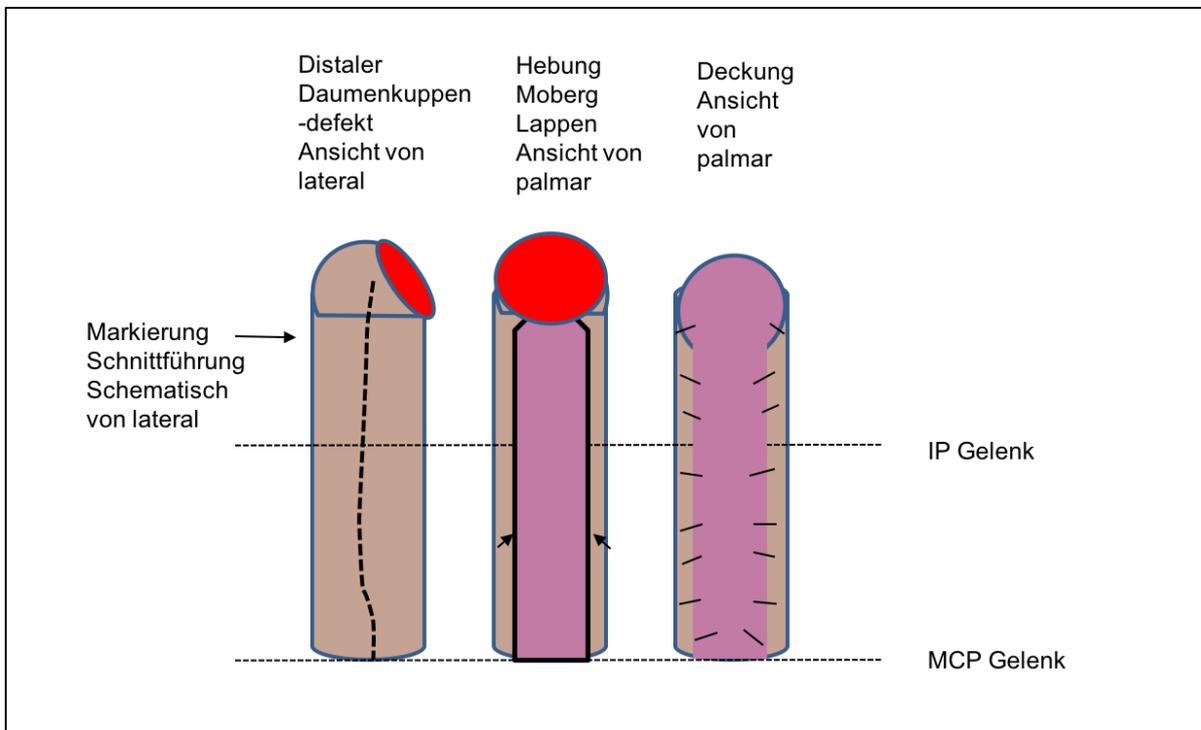


Abbildung 10. Palmare Dehnungslappenplastik nach Moberg zur Deckung von distalen Daumenkuppendifekten nach (Macht and Watson 1980).

IP-Gelenk – Interphalangealgelenk, MCP-Gelenk – Metakarpophalangealgelenk.

- Größere Defekte können die Anwendung einer loko-regionalen bzw. Fernlappenplastik notwendig machen (Meyer-Marcotty, Kall et al. 2007). Der *Crossfinger*-Lappen wird seit den 1950er Jahren erfolgreich zur Defektdeckung palmarer und dorsaler Defekte (als *Reversed-Crossfinger*-Lappen) verwendet (Curtis 1957) (Gurdin and Pangman 1950). Dabei wird ein adipofasziokutaner Lappen des benachbarten Fingers in die Defektzone geschwenkt und der Hebedefekt in der Regel mit einem Vollhauttransplantat gedeckt (Megerle, Palm-Broking et al. 2008). Auch dorsale Metakarpale-Arterienlappen (DMCA), die proximal-gestielt, distal-gestielt, aber auch erweitert distal-gestielt sein können, werden häufig verwendet (Gregory, Heitmann et al. 2007).
- Eine Replantation der Fingerkuppe ist mit einfacher oder zweifacher arterieller oder gemeinsamer arterieller und venöser Anastomosierung möglich (Hattori, Doi et al. 2007) (Zhang, Wen et al. 2008). Aufgrund der kleinen Gefäßdurchmesser an distalen Fingerendgliedern gilt die Replantation der Fingerkuppe als herausfordernd. Oft sind keine brauchbaren Venen für eine mikrochirurgische Naht verfügbar (Foucher and Norris 1992) (Hattori, Doi et al. 2003).

Zusammengefasst existieren zahlreiche Operationsmethoden zur Behandlung von Fingerkuppendifekten, die allerdings mit eingeschränkter Sensibilität, schmerzhaften oder einschränkenden Narben sowie einem Längenverlust des Fingers einhergehen können (Muhldorfer-Fodor, Hohendorff et al. 2013).

4.2.4 Okklusivverband bei Fingerkuppenverletzungen

Der OV wurde erstmalig 1965 als Alternative zur trockenen Wundbehandlung beschrieben (Hinman and Maibach 1963). Der Einsatz von OV bei Fingerkuppenverletzungen begann in den 1980er Jahren, als Soderberg et al. adhäsive Zink-Tape-Verbände (34 Patienten) mit chirurgischen Therapieoptionen (36 Patienten) verglichen (Soderberg, Nystrom et al. 1983). Konservativ behandelte Patienten zeichneten sich durch eine bessere 2-Punkte-Diskrimination, eine verbesserte Kuppenform sowie eine deutlich reduzierte Hypersensibilität der Pulpa bei einer geringeren Behandlungszeit im Vergleich zur chirurgisch behandelten Gruppe aus (Soderberg, Nystrom et al. 1983). Mennen und Wiese berichteten über eine

exzellente Abheilung von Fingerkuppendifekten bei 200 Patienten innerhalb von 20-30 Tagen nach Anlage von OV (Mennen and Wiese 1993). Die nach Abschluss der Behandlung erzielte 2-Punkte Diskrimination war mit durchschnittlich 2,5 mm als normwertig zu bewerten (Mennen and Wiese 1993) (Seah, Wu et al. 2013). Quell et al. beobachteten den Heilungsverlauf und auftretende Komplikationen bei Fingerendgliedverletzungen, wobei 52 Finger mittels OV und 31 Finger mittels Knochenkürzung und Stumpfbildung oder Débridement und Primärverschluss behandelt wurden (Quell, Neubauer et al. 1998). Bei 22% aller chirurgisch behandelten Fingerendgliedverletzungen kam es im postoperativen Verlauf zu Komplikationen. Dazu zählten dauerhafte Bewegungseinschränkungen, Wundheilungsstörungen, chronische Osteitis oder Narbenneurome (Quell, Neubauer et al. 1998). Mit OV behandelte Patienten zeigten dagegen bis auf geringe Hypergranulationen, die mit einem Silbernitratätzstift abgetragen werden konnten, keine Komplikationen (Quell, Neubauer et al. 1998). Die guten Ergebnisse wurden dem regenerativen Effekt des durch die OV geschaffenen, feuchten Wundmilieus zugeschrieben (Mennen and Wiese 1993) (Hinman and Maibach 1963). Vogt et al. untersuchten 1997 Wundflüssigkeiten von Fingerkuppenverletzungen auf das Vorhandensein von Zytokinen und konnten im Vergleich zu normalen Serumkonzentration erhöhte Werte für EGF, IL-1 und TGF- β 2 nachweisen (Vogt, Wagner et al. 1997). Diese Wachstumsfaktoren sind, wie oben beschrieben, für anabole und regenerative Wundheilungsprozesse essentiell und könnten für die bessere Abheilung von Fingerkuppen unter OV mitverantwortlich sein (Vogt, Wagner et al. 1997).

Zusätzlich zu der guten Regeneration von Sensibilität und Funktion zeigen konservativ behandelte Fingerkuppenverletzungen praktisch keine Narbenbildung und die für den individuellen Fingerabdruck typischen Hautleisten regenerieren nahezu vollständig (Hoigne, Hug et al. 2014). Die Regeneration umfasst bis zu 90% des initial verlorenen Weichteilgewebes und die 2-Punkte-Diskrimination ist nach Abschluss der Behandlung nahezu identisch mit der unverletzten Gegenseite (Hoigne, Hug et al. 2014). Eine solch ausgeprägte Regenerationsfähigkeit ist bei bestimmten Fischen, Mäusen und Amphibien bekannt (Rinkevich, Lindau et al. 2011), beim Menschen aber untypisch.

Zusammengefasst verläuft die Wundheilung an konservativ, mit OV behandelten Fingerkuppen außergewöhnlich gut und führt zu einer praktisch narbenlosen

Regeneration der Hautfurchen sowie zu einer Wiederherstellung von Sensibilität und Funktion der betroffenen Finger (Mennen and Wiese 1993) (Hoigne, Hug et al. 2014).

4.3 Narben

Narben sind das Endprodukt der kutanen Wundheilung nach Abschluss der *Remodeling*-Phase. Narbengewebe zeichnet sich durch eine verminderte Reißfestigkeit, eine veränderte Geometrie und Struktur sowie dem Fehlen von Hautanhangsgebilden wie Schweißdrüsen und Haarfollikeln aus (Ferguson, Whitby et al. 1996) (Gurtner, Werner et al. 2008) (Cass, Bullard et al. 1997). Bei Fingerkuppenverletzungen fehlen diese typischen Narben, vielmehr gehen sie mit einer fast vollständigen Regeneration des Substanzdefektes einher (Hoigne, Hug et al. 2014). Zum Verständnis der der Narbenbildung zugrundeliegenden Prozesse ist die Analyse der „Extremformen der Wundheilungen“ – narbenlose Wundheilungen beim Embryo und pathologische, überschießende Narbenbildung in Form der hypertrophen Narbe oder des Keloids – hilfreich.

4.3.1 Narbenlose kutane Wundheilung beim Embryo

Zahlreiche Studien belegen, dass sich die kutane Wundheilung beim Embryo von der adulten Wundheilung (siehe Kapitel 3.1) unterscheidet. Bei der embryonalen Wundheilung werden andere Gene exprimiert, die Entzündungsphase verläuft differenzierter und es gibt deutliche Unterschiede bei der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Lo, Zimmermann et al. 2012). Obwohl nicht abschließend geklärt werden konnte, warum manche Wunden in diesem Stadium ohne Narben abheilen, dürfte das Gestationsalter, die Größe der Wunde, eine spezielle extrazelluläre Matrix und/oder spezielle FB maßgeblich daran beteiligt sein (Lo, Zimmermann et al. 2012). Wunden beim menschlichen Embryo heilen erst ab der 24. Gestationswoche unter Narbenbildung ab, in früheren Stadien regeneriert das Gewebe ohne Narbenbildung (Lorenz, Longaker et al. 1992). Große Wunden verschließen sich jedoch nur in sehr frühen Stadien ohne Bildung von Narbengewebe (Cass, Bullard et al. 1997). Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, dass Wunden am Diaphragma bzw. im gastrointestinalen Trakt (GIT) beim Embryo unabhängig vom Gestationsalter ebenfalls Narben bilden (Longaker, Whitby et al. 1991) (Mast, Albanese et al. 1998).

Die kutane extrazelluläre Matrix beim frühen Embryo beinhaltet anders als die adulte extrazelluläre Matrix ein Glykoprotein (HASA – Hyaluronsäure stimulierendes Aktivitätsprotein), das vermutlich für eine starke Steigerung der Hyaluronsäure-Bildung bei der kutanen embryonalen Wundheilung verantwortlich ist (Estes, Adzick et al. 1993) (Longaker, Whitby et al. 1990). Kennedy et al. fanden unterschiedliche Aktivitäten der Hyaluronsäure-Synthase in adulten und fetalen dermalen FB. Sie schlussfolgerten daraus eine reduzierte Zellantwort von FB auf inflammatorische Zytokine (Kennedy, Diegelmann et al. 2000). Strukturelle Unterschiede der frühen kutanen embryonalen Wundheilung im Vergleich zur adulten Wundheilung werden zusätzlich an der netzartigen Anordnung von Kollagenfasern, wie man sie auch in unverletzten Hautarealen findet, sowie an dem größeren Verhältnis von Typ III zu Typ I Kollagen deutlich (Whitby and Ferguson 1991) (Longaker, Whitby et al. 1990). Darüber hinaus kommt es bei der adulten kutanen Wundheilung zu einer vermehrten Vernetzung von Kollagenfasern, die die Narbenbildung fördert und die Elastizität der Matrix reduziert (Lovvorn, Cheung et al. 1999).

Die schnelle Heilung embryonaler kutaner Wunden könnte mit der hohen Dichte an Zelloberflächenrezeptoren in fetalen FB und der daraus resultierenden gesteigerten FB-Migration zusammenhängen (Colwell, Longaker et al. 2003). Longaker et al. beschrieben in diesem Zusammenhang eine in der Wundheilung frühe Expression von Matrixproteinen (Fibronectin, Tenascin), die für die Zellmotilität und für die Zellinteraktion von Bedeutung sind (Longaker, Whitby et al. 1990).

Zusätzlich zu den beschriebenen Besonderheiten der fetalen kutanen Wundheilung konnten erhöhte Konzentrationen von Wachstumsfaktoren wie VEGF und TGF- β 3 sowie erniedrigte Serumkonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6, IL-8) nachgewiesen werden (Satish and Kathju 2010) (Hsu, Peled et al. 2001). Ferguson et al. belegten, dass in embryonalen kutanen Wunden vermehrt TGF- β 3 und geringere Mengen an TGF- β 1 und TGF- β 2 sezerniert werden, was wiederum die Narbenbildung hemmen könnte (Ferguson and O'Kane 2004). Die VEGF- und TGF- β 3-Synthese könnte durch eine Stimulation des *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) angeregt werden, da fetale Haut im Vergleich zu adulter Haut einen geringeren Sauerstoffpartialdruck aufweist (Scheid, Wenger et al. 2002).

4.3.2 Pathologische Narbenbildung

Hypertrophe Narben und Keloide werden als pathologische Narbenbildungen klassifiziert. Beide zeichnen sich durch deutliche Erhebung sowie Symptome wie Juckreiz und/oder ziehende bzw. brennende Schmerzen aus (Berman, Maderal et al. 2017). Hypertrophe Narben treten in der Regel innerhalb von vier bis acht Wochen nach einer Verletzung oder Verbrennung einer tieferen Zone der Dermis auf und beschränken sich auf das Areal der Verletzung (Slomp and Kirschner 2006). Dies unterscheidet sie von Keloiden, die über die eigentliche Defektzone reichen und sich erst Jahre später, nach einer Bagatellverletzung, manifestieren (Berman, Maderal et al. 2017).

Prinzipiell können Störungen in jeder Phase der Wundheilung zu pathologischen Narben führen (Berman, Maderal et al. 2017). Analysen belegen, dass hypertrophe Narben aus einem Ungleichgewicht im Reparaturprozess zwischen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix zugunsten einer überschießenden Matrix resultieren (Ghahary, Shen et al. 1996). Andere Studien brachten eine stark gesteigerte FB-Aktivität mit der Entstehung von hypertrophen Narben in Verbindung (Brown and Bayat 2009). Als weitere Ursache für die Entstehung pathologischer Narben kommt eine prolongierte, chronische Entzündungsreaktion mit einer Dysregulation der Zytokine IL-6, IL-8 und IL-10 in Frage (Berman, Maderal et al. 2017). IL-6 und IL-8 sind proinflammatorische Zytokine, während IL-10 als narbenprotektiv gilt und in hypertrophen Narben in verminderter Konzentration nachgewiesen wurde (van den Broek, van der Veer et al. 2015). Zusätzlich besteht ein Ungleichgewicht bei den Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie, mit gesteigerter Expression von TGF- β 1 und TGF- β 2 sowie reduzierter TGF- β 3-Synthese (Shah, Foreman et al. 1994).

Keloide und hypertrophe Narben zeigen deutliche strukturelle Unterschiede (Ehrlich, Desmouliere et al. 1994). Während die Kollagenfasern in Keloiden in dicken Fasern gebündelt vorkommen, liegen sie in hypertrophen Narben einzeln im Gewebe verstreut (Ehrlich, Desmouliere et al. 1994). Im Vergleich zu gesunder Haut zeichnen sich beide pathologische Narbentypen durch eine um ein Vielfaches gesteigerte Kollagenproduktion aus (Friedman, Boyd et al. 1993). Zusätzlich findet sich ein gesteigertes Verhältnis von Typ I zu Typ III Kollagen (Naitoh, Hosokawa et al. 2001) (Friedman, Boyd et al. 1993).

4.4 Feuchte Wundbehandlung

Allgemein dienen Wundbehandlungen dazu, die Wunde sauber zu halten und sie vor Keimbesiedelungen und Infektionen zu schützen (Chaby, Senet et al. 2007) (Birdsell, Hein et al. 1979). Zusätzlich sollte die Behandlung einen möglichst schmerzfreien Verbandswechsel und eine gute Kosteneffektivität sicherstellen (Chaby, Senet et al. 2007) (Birdsell, Hein et al. 1979). Zur Behandlung von Wunden existieren multiple Verbandsregimes. Prinzipiell unterschieden werden Verbände mit einem regelmäßigen Wechsel von Wundflüssigkeit aufsaugenden Kompressen (trockene Wundbehandlung) und Spezialauflagen mit okklusiven bzw. semi-okklusiven Eigenschaften (Kilinc, Senoz et al. 2001) (Uraloglu, Livaoglu et al. 2014).

1962 publizierte Winter erstmals eine erhöhte epidermale Proliferationsrate bei einer Wundbehandlung mit OV im Tiermodell (Winter 1962). Er vermutete, dass die die Dermis bedeckende Wundflüssigkeit für die beobachtete gesteigerte Migration der sich neu bildenden Epidermis verantwortlich ist (Winter and Scales 1963). Seit dieser Entdeckung wurde die feuchte Wundheilung mittels (semi)-okklusiver Verbände in vielen Studien am Tier und am Menschen untersucht (Hinman and Maibach 1963) (Madden, Nolan et al. 1989) (Alvarez, Mertz et al. 1983) (siehe **Tabelle 2**). Vogt beschrieb eine generelle Verbesserung der Wundheilung durch Okklusion sowie eine deutliche Verringerung der Zahl der auftretenden Wundnekrosen (Vogt, Andree et al. 1995). Auch Beam beobachtete eine geringere Anzahl an Infektionen sowie eine raschere Abheilung der Wunden (Beam 2007). Im feuchten Wundmilieu wurde eine Stimulation der FB, eine Induktion der Angiogenese sowie eine erhöhte Zytokin-Expression nachgewiesen (Madden, Nolan et al. 1989) (Katz, Alvarez et al. 1991).

Okklusive Therapien besitzen einen narben-modulierenden Effekt, der wahrscheinlich auf eine kürzere Entzündungs- und Proliferationsphase zurückzuführen ist (Dyson, Young et al. 1988). Versuche am Tiermodell belegen, dass semi-OV im Vergleich zu trockenen Verbandregimes zu einer Abnahme der Kollagensynthese und damit zu einer Reduktion von Granulationsgewebe führen (Ksander, Pratt et al. 1990). Okklusiv behandelte Wunden bilden geringere Mengen an fibrösem Bindegewebe mit Infiltration von Granulozyten und Monozyten, wodurch inflammatorische und proliferative Reize abgeschwächt werden (Ksander, Pratt et al. 1990). Dies könnte zu einer deutlich verbesserten Narbenqualität und Funktionalität der abgeheilten Wundbereiche

beitragen (Atiyeh, Amm et al. 2003) (O'Shaughnessy, De La Garza et al. 2009). O'Shaughnessy et al. fanden bei Verwendung von OV im Tiermodell eine deutliche Abnahme der hypertrophen Narbenbildung durch die Wiederherstellung der Homöostase (O'Shaughnessy, De La Garza et al. 2009). Sie schlussfolgerten, dass in mit OV versorgten Wunden der epidermale Flüssigkeitsverlust verhindert, inflammatorische Reize gemildert und damit ein entzündungshemmender und narbenprotektiver Effekt erzielt wird (O'Shaughnessy, De La Garza et al. 2009).

Trotz umfangreicher klinischer Erfahrungen mit OV sind die zellbiologischen Abläufe nach wie vor nicht ausreichend erforscht (O'Shaughnessy, De La Garza et al. 2009).

Tabelle 2. Zusammenfassung der Effekte einer feuchten Wundbehandlung (Auswahl)

Wirkungen der feuchten Wundbehandlung	Publiziert von
Gesteigerte epidermale Proliferation	(Winter 1962)
Reduktion von Komplikationen insbesondere Wundnekrosen	(Vogt, Andree et al. 1995) (Beam 2007)
Stimulation von Fibroblasten, Induktion von Angiogenese und gesteigerte Zytokin-Expression	(Katz, Alvarez et al. 1991) (Madden, Nolan et al. 1989)
Anti-inflammatorische Wirkung mit Verkürzung der Entzündungs- und Proliferationsphase	(Dyson, Young et al. 1988) (Ksander, Pratt et al. 1990)
Reduktion der Kollagensynthese und verringerte Bildung von Granulationsgewebe	(Ksander, Pratt et al. 1990)
Verbesserung der Narbenqualität	(Atiyeh, Amm et al. 2003)
Geringere Ausbildung von hypertrophen Narben und Reduktion von pro-inflammatorischen Zellen wie Makrophagen	(O'Shaughnessy, De La Garza et al. 2009)

4.5 Hypothese und Ziele der Studie

Die Effekte von OV auf die Wund- und Narbenheilung wurden bereits häufig thematisiert. Jedoch konnte bisher nicht geklärt werden, warum es gerade bei Fingerkuppenverletzungen zu einer nahezu vollständigen Heilung des initialen Substanzdefektes kommt (Hoigne, Hug et al. 2014) (Vogt, Andree et al. 1995). Vogt et al. fanden erhöhte Konzentrationen von EGF, bFGF, IL-1 und TGF- β 2 in okklusiv verbundenen Wunden (Vogt, Wagner et al. 1997). Auch Grayson et al. zeigten eine erhöhte Expression von IL-1, bFGF, EGF und TNF- α in Wundflüssigkeiten von okklusiv verbundenen Spalthautentnahmestellen (Grayson, Hansbrough et al. 1993). Diese Zytokine wirken in der Entzündungs- und Proliferationsphase der Wundheilung und beeinflussen das Verhalten von FB und damit die Bildung von Granulationsgewebe entscheidend mit (Grayson, Hansbrough et al. 1993). Weitere Studien konnten einen direkten Einfluss der Wundflüssigkeit auf das Verhalten von FB und MSC nachweisen (Pricolo, Caldwell et al. 1990) (Kindzierski 2012)

Aufgrund dieser Befunde scheint es wahrscheinlich, dass die Wundflüssigkeit unter den OV von Fingerkuppenverletzungen wesentlich an den herausragenden Ergebnissen bei der Wund- und Narbenheilung dieser Verletzungen beteiligt ist (Mennen and Wiese 1993).

Ziel dieser Studie ist es daher, den Einfluss der Wundflüssigkeit unter Folienverbänden auf die Migration und Proliferation von MSC und FB zu untersuchen. Zusätzlich soll das Blutserum der Patienten auf dieselben Parameter als Kontrolle evaluiert werden.

5 Material und Methoden

5.1 Studiendesign und Zulassung

Die Studie wurde nach Prüfung durch die zuständige Ethikkommission der Technischen Universität München mit der Projektnummer 527/15 zugelassen. Im Rahmen der Studie wurden insgesamt 22 Fingerkuppenverletzungen bis Allen Grad II-III (siehe **Abbildung 6**) sowie fünf Spalthautentnahmestellen am linken oder rechten ventro-medialen bis ventro-lateralen Oberschenkel der Patienten mit OV (Fa. Smith & Nephew IV3000, Deutschland) behandelt. Am fünften Tag nach Anlage des Verbandes wurde die Wundflüssigkeit beim Verbandswechsel gewonnen (siehe unten). Zusätzlich erfolgte an diesem Tag eine Blutserumabnahme als Kontrolle.

5.2 Erstversorgung von Fingerkuppenverletzungen

Patienten mit Fingerkuppenverletzungen bis Allen Grad II-III, die sich über die chirurgische Notaufnahme des Klinikums rechts der Isar, direkt über die Poliklinik der Plastischen Chirurgie und Handchirurgie am Klinikum rechts der Isar oder über die chirurgische Notaufnahme der Klinik für Handchirurgie, Plastische Chirurgie und Ästhetische Chirurgie am Campus Innenstadt des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität vorstellten, wurden in die Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren ein Diabetes mellitus oder ein Alter von weniger als 18 Jahre. Vor dem Studieneintritt wurden alle Patienten mündlich und schriftlich aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Probensammlung, zur Blutabnahme inklusive einer laborchemischen Analyse des Materials und zur Publikation der Daten in anonymisierter Form.

Im Rahmen der Erstversorgung wurde die Wunde desinfiziert. Falls erforderlich wurde abgestorbenes Gewebe in Lokalanästhesie débridiert. Bei Verletzungen der Allen Klasse III wurde in den meisten Fällen eine Röntgenaufnahme zum Ausschluss einer Beteiligung des DIP-(distales Interphalangeal)-Gelenkes durchgeführt. Bei frei liegendem Knochen der Endphalanx wurde dieser sparsam auf Wundniveau zurückgekürzt, entsprechend der Empfehlung von Hoigne et al. (Hoigne, Hug et al. 2014). Anschließend wurde der OV unter Belassung eines Reservoirs angelegt (siehe **Abbildung 11-12**) (Muhldorfer-Fodor, Hohendorff et al. 2013). Zum Schutz des

Verbandes vor mechanischen Reizen wurde zuletzt ein Schutzverband für die ersten Tage angelegt (siehe **Abbildung 13**).

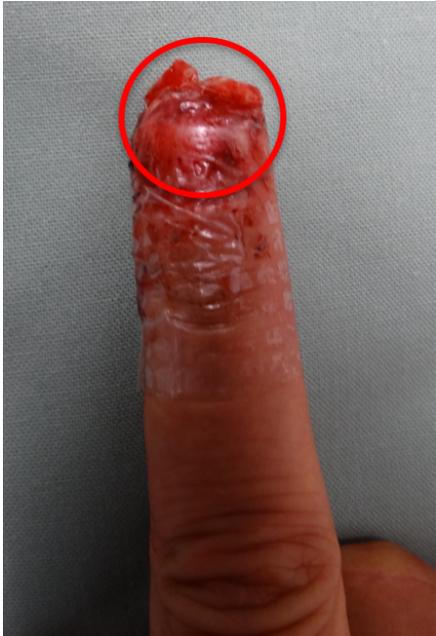


Abbildung 11. Anlage des Okklusivverbandes bei Fingerkuppenverletzungen unter Belassung eines Reservoirs für die Wundflüssigkeit (in Rot)



Abbildung 12. Versorgung einer akuten Fingerkuppenverletzung am kleinen Finger links mit einem Okklusivverband. Links: frische Verletzung, rechts: Ansicht von ulnar mit angelegtem Okklusivverband



Abbildung 13. Schutzverband über dem angelegten Okklusivverband bei frischen Fingerkuppenverletzungen

Die Patienten erhielten nach der Versorgung der Verletzung bei Bedarf eine orale Schmerzmedikation und wurden am Folgetag zur Kontrolle in die aufnehmende Poliklinik einbestellt. Bei der Verbandskontrolle konnten undichte Verbände bei Bedarf nochmals abgeklebt werden, ohne den eigentlichen Verband abzunehmen.

5.3 Behandlung von Spalthautentnahmestellen

Als Kontrolle wurden Wundflüssigkeitsproben von Spalthautentnahmestellen verwendet. Auch hier wurden nur Patienten eingeschlossen, die nicht an Diabetes mellitus erkrankt und über 18 Jahre alt waren. Die Proben wurden an Entnahmestellen des ventro-medialen oder ventro-lateralen Oberschenkels links oder rechts gewonnen. Die Spalthautentnahmestellen wurden unter Einhaltung des Standards der Klinik intraoperativ mit OV versorgt (siehe **Abbildung 14**).



Abbildung 14. Anlage des Okklusivverbandes auf Spalthautentnahmestellen. In Rot – Fläche unter der Folie, wo sich Wundsekret sammelt.

5.4 Wundflüssigkeitsgewinnung

Am fünften Tag nach Anlage des OV wurde die Wundflüssigkeit unter der Folie gewonnen. Bereits Kisch et al. konnten nachweisen, dass es durch die Flüssigkeitsabnahme bei okklusiv verbundenen Fingerkuppenverletzungen zu keiner Beeinträchtigung der Wundheilung kommt (Kisch, Klemens et al. 2015). Zur Gewinnung der Wundflüssigkeit von okklusiv verbundenen Fingerkuppen sowie an Spalthautentnahmestellen wurde die Folie mit einer dünnen Kanüle von außen durchstoßen, ohne dabei die Wunde oder die Haut zu verletzen (Sterican® Größe 18, G 26x1, Durchmesser 0,45 x 25 mm, Fa. B. Braun, Deutschland). Die Flüssigkeit wurde mittels einer der Kanüle aufgesetzten 5–10 ml Spritze (Injekt®, Fa. B. Braun, Deutschland) abgenommen.

5.5 Kryopräservation der Proben

Die gewonnenen Flüssigkeitsproben wurden bis zur weiteren laborchemischen Analyse mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS – *phosphate buffered saline*) (Fa. GE Healthcare Life Sciences, Deutschland) verdünnt und anschließend für fünf Minuten bei 350 G zentrifugiert (Zentrifuge S415R, Fa. Eppendorf, Deutschland) um Zellfragmente zu entfernen. Die Kryokonservierung erfolgte anschließend bei -20°C im Kühlschrank (Fa. Thermo Scientific, Deutschland).

5.6 Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus humanem Fettgewebe

MSC lassen sich gut aus humanem Fettgewebe isolieren (Schneider, Unger et al. 2017). Für die vorliegende Studie wurde Fett von Patienten gewonnen, die ästhetische Eingriffe, Abdominoplastiken oder Liposuktionen in der Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie am Klinikum rechts der Isar durchführen ließen. Die Patienten wurden schriftlich und mündlich aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis für die Verwendung des Fettes.

Zur Isolation der MSC wurde das Fettgewebe aus Abdominoplastiken in PBS gespült und in kleine Stücke geschnitten. Das Liposuktionsmaterial konnte direkt verwendet werden. Die Gewebefragmente wurden in Kollagenase-A Lösung (Fa. Roche) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Medium - *minimal essential medium* alpha (MEM-alpha) (Fa. Biochrom, Deutschland) - mit 10% FCS (*fetal calf serum*) abgestoppt und die Kollagenase durch Zentrifugation bei 450 G entfernt. Nach Resuspendierung des Pellets mit 5 ml PBS wurden gröbere Bestandteile durch Filtration mit einem Zellsieb (Porengröße 100 µm) abgetrennt. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten wurden die Zellen in Kulturmedium MEM-alpha mit 10% FCS resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Beim Mediumwechsel am folgenden Tag wurden die letzten Zellfragmente entfernt (Schneider, Unger et al. 2017) (Kindzierski 2012).

5.7 Zellkultur

Zur Analyse der FB-Aktivität wurden humane HS27-FB (*American Type Culture Collection* – ATCC, Fa. LGC Standards, Deutschland) in *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) (Fa. Biochrom, Deutschland) mit 10% FCS kultiviert. Die aus Fettgewebe isolierten MSC (siehe oben) wurden in MEM-alpha mit 10% FCS kultiviert.

5.8 Zellmetabolismus-Assay (*Alamarblue*)

Zur Bestimmung der Zellproliferation an einem definierten Endpunkt wurde der *Alamarblue*-Assay eingesetzt, der die metabolische Aktivität von Zellen erfasst und somit eine indirekte Messung der Zellproliferation erlaubt (Voytik-Harbin, Brightman et al. 1998) (Rampersad 2012).

Zur Vorbereitung wurden HS27-FB (4000 Zellen pro Vertiefung) und MSC (8000 Zellen pro Vertiefung) in Kulturmedium in Mikrotiterplatten ausgesät. Durch die unterschiedlichen Ausgangszellzahlen wurden die unterschiedlichen Proliferationsraten der beiden Zelltypen berücksichtigt. Nach 24 Stunden, in der die Zellen an den Platten anhaften konnten, wurde das Nährmedium gegen frisches Nährmedium, das die Probe (Blutserum oder Wundflüssigkeit) in einer Konzentration von 10% enthielt, ausgetauscht. Der *Alamarblue*-Assay (Fa. Sigma-Aldrich, Deutschland) wurde nach Inkubation der Zellen für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt (siehe **Abbildung 15**). Dazu wurde die *Alamarblue*-Flüssigkeit mit dem Farbstoff Resazurin zu den Mikrotiterplatten hinzugegeben und diese für weitere 30 Minuten inkubiert (Rampersad 2012). Anschließend erfolgte die Messung des emittierenden Fluoreszenzfarbstoffes bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 600 nm. Der Indikator des Assays, Resazurin, wird durch die metabolische Zellaktivität reduziert und verändert dabei seine Farbe von nicht-fluoreszierendem Blau in fluoreszierendes Rosa (Page, Page et al. 1993). Die emittierte Strahlung kann gemessen und als Maß für die Zellproliferation verwendet werden (Rampersad 2012).

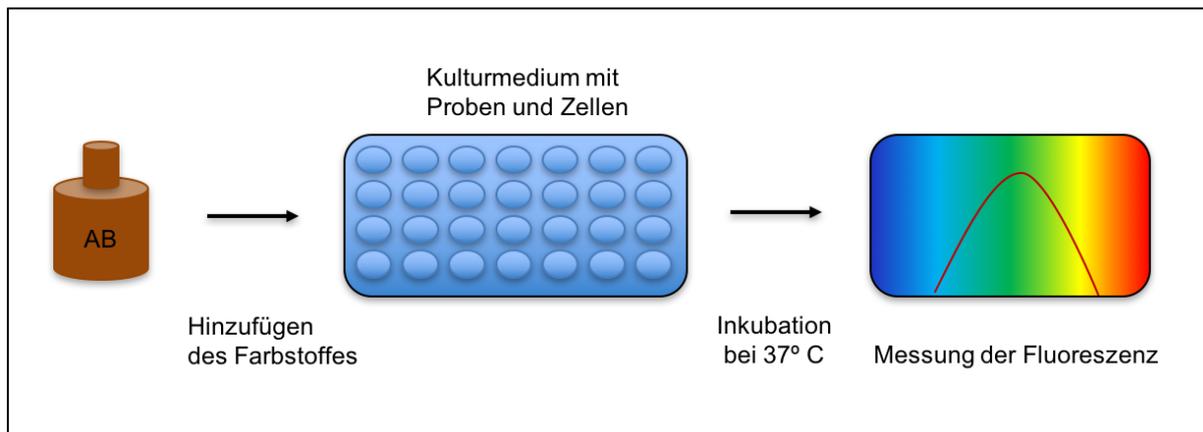


Abbildung 15. Schematische Darstellung des *Alamarblue*-Assays. AB – Alamarblue Flüssigkeit.

5.9 Impedanz-Proliferationsassay (*xCELLigence*)

Zur Messung der kontinuierlichen Zellproliferation von HS27-FB und MSC wurde der *xCELLigence-DP-Analyser* (Fa. OLS® Omni Life Sciences, Deutschland) eingesetzt. Die *xCELLigence*-Technologie erlaubt eine kontinuierliche nicht-invasive Analyse der Zellaktivität und Proliferation, basierend auf der Messung elektrischer Impedanz (Ke, Wang et al. 2011). Dazu wurden HS27-FB (4000 Zellen pro Vertiefung) und MSC (4000 Zellen pro Vertiefung) in Mikrotiterplatten (E-Plates) in Kulturmedium ausgesät und für 40 Stunden inkubiert. Diese speziellen, mit Goldelektroden bestückte Platten (E-Plates) sind mit einem Computer verbunden, der die Impedanz kontinuierlich misst (Longaker, Whitby et al. 1990).

Die Probe (Blutserum oder Wundflüssigkeit) wurde in einer Verdünnung von 1:10 in Kulturmedium angesetzt, und anschließend Medien im Verhältnis 1:1 in die Mikrotiterplatte gegeben. Damit lag die finale Probenkonzentration bei 5%. Mit der kontinuierlichen Messung der Impedanz, ausgegeben als Zellindex, wurde 30 Minuten nach Einsaat der Zellen begonnen und bis zu 100 Stunden alle 15 Minuten weitergeführt. Der Zellindex gibt Aufschluss über die quantitative Veränderung der Zellzahl pro Zeiteinheit.

5.10 Impedanz-Migrationsassay (*xCELLigence*)

Die Zellmigration von HS27-FB und MSC wurde mit dem *xCELLigence*-DP Analyser (OLS® Omni Life Sciences) unter Verwendung von CIM-Platten analysiert (Dowling, Herranz Ors et al. 2014). Die CIM-Platten besitzen auf der Unterseite eine poröse Membran, die mit Goldelektroden beschichtet ist. Dadurch trennen die CIM-Platten die Mikrotiterplatten, die das Nährmedium mit Proben und Zellen enthalten, in ein unteres und ein oberes Kompartiment. Die Zellmigration kann bei Durchtritt der Zellen durch die poröse Membran über die Messung der Impedanz ausgewertet werden.

Für die Versuche wurden HS27-FB oder MSC (jeweils 4000 Zellen pro Vertiefung) in Kulturmedien eingesät in die obere Kammer der CIM-Platte gegeben. Nach 30 Minuten wurde 5% Wundflüssigkeit oder Blutserum in Standardmedium in die untere Kammer eingesetzt. Die Messung der Impedanz erfolgte an der Unterseite der Membran. Damit konnte eine Zellmigration, ausgelöst durch chemotaktische Faktoren in der Wundflüssigkeit oder im Blutserum, von der oberen Kammer zur unteren Kammer durch die poröse Membran detektiert werden. Die Zellmigration wurde als Zellindex alle 15 Minuten über 25 Stunden gemessen.

5.11 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels T-Test und gepaartem T-Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

6 Resultate

6.1 Wundflüssigkeits- und Blutserumproben

Bei vier von 22 Fingerkuppenverletzungen (Minimum 60 μ l, Median 91 μ l, Maximum 120 μ l) und vier von fünf Spalthautentnahmestellen (Minimum 3800 μ l, Median 2700 μ l, Maximum 11200 μ l) konnte ausreichend Wundflüssigkeit für die laborchemischen Analysen gewonnen werden. Die restlichen Proben enthielten keine oder nur geringe Wundsekretmengen, was bei einem Großteil der Fälle auf eine äußere Beschädigung des Folienverbandes oder einen anderweitig undicht gewordenen Verband zurückzuführen war. Zusätzlich wurde Blutserum von allen Patienten als Kontrolle abgenommen (Minimum 800 μ l, Median 2000 μ l, Maximum 2500 μ l).

6.2 Einfluss von Wundsekreten und Blutsera auf die Migration von MSC

Bei der Messung der MSC-Migration mittels des Impedanz-Migrationsassays *xCELLigence-Systems* konnten signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden. Die Gruppen wurden jeweils als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt und miteinander verglichen. Dabei wurden wie nachfolgend beschrieben einerseits Mittelwerte der Fingerkuppensekrete bzw. Spalthautsekrete mit Mittelwerte der Serakontrollen verglichen, aber auch die Mittelwerte aller Wundflüssigkeiten kombiniert mit den Mittelwerten aller Blutsera verglichen.

Unter dem Einfluss von Wundsekreten aus Fingerkuppenverletzungen waren nach vier- ($p=0,046$), fünf- ($p=0,032$) und sechsständiger Inkubation ($p=0,048$) signifikant mehr Zellen migriert als nach Inkubation mit dem Blutserum derselben Patienten (siehe **Abbildung 16**).

Dieser Effekt kehrte sich nach neunständiger Inkubation um. Ab einer elfständigen Inkubation ($p=0,047$) war die Migration unter dem Einfluss der Wundflüssigkeit von okklusiv behandelten Fingerkuppenverletzungen signifikant geringer als unter dem Einfluss der Blutsera. Dieser Unterschied blieb bis zum Ende der Analyse bei 15 Stunden ($p=0,014$) signifikant. Ergänzend sind hier die p -Werte der restlichen Vergleiche aufgeführt: 12 Stunden ($p=0,032$), 13 Stunden ($p=0,023$), 14 Stunden ($p=0,016$) (siehe **Abbildung 16**).

Die Migrationsexperimente zum Einfluss der Wundflüssigkeit bei okklusiv behandelten Spalthautentnahmestellen auf die Migration von MSC ergab ein ähnliches Bild. In den ersten Stunden wurde ein starker Trend im Sinne einer gesteigerten MSC-Migration im Vergleich zur Inkubation mit den Patientensera beobachtet, der jedoch nicht signifikant war (4 Stunden – $p=0,074$), 5 Stunden – $p=0,086$, 6 Stunden – $p=0,176$). Auch bei diesen Versuchen kam es nach neun Stunden zu einer Umkehrung des Effekts. Ab einer neunstündigen Inkubation ($p=0,049$) bis zum Analysenende (15 Stunden – $p=0,014$) war der Effekt der Patientensera auf die MSC-Migration signifikant stärker als der der Wundsekrete. Ergänzend sind hier die restlichen signifikanten Unterschiede aufgeführt: 10 Stunden ($p=0,016$), 11 Stunden ($p=0,011$), 12 Stunden ($p=0,024$), 13 Stunden ($p=0,019$) 14 Stunden ($p=0,016$) (**siehe Abbildung 16**).

Der Vergleich der MSC-Migration unter dem Einfluss der Wundflüssigkeiten und Blutsera beider Gruppen (Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen) zeigte eine signifikante erhöhte Migration nach drei Stunden ($p=0,023$), vier Stunden ($p=0,006$), fünf Stunden ($p=0,005$) und sechs Stunden ($p=0,017$) für die Wundflüssigkeitsgruppe. Die größte Unterschied der MSC-Migration war nach einer vierstündigen ($p=0,06$) Inkubation zu beobachten (**siehe Abbildung 16**). Eine Umkehrung des beobachteten Effektes wurde ab einer neunstündigen ($p=0,034$) Inkubation sichtbar und blieb kontinuierlich bis zum Ende der Analyse nach 15 Stunden ($p=0,0002$) bestehen. In diesem Zeitraum war der Effekt der Blutsera auf die MSC-Migration signifikant größer. Ergänzend sind hier die restlichen signifikanten p-Werte angeführt: nach 10 Stunden ($p=0,005$), nach 11 Stunden ($p=0,002$), nach 12 Stunden ($p=0,001$), nach 13 Stunden ($p=0,0007$), nach 14 Stunden ($p=0,0004$) (**siehe Abbildung 16**).

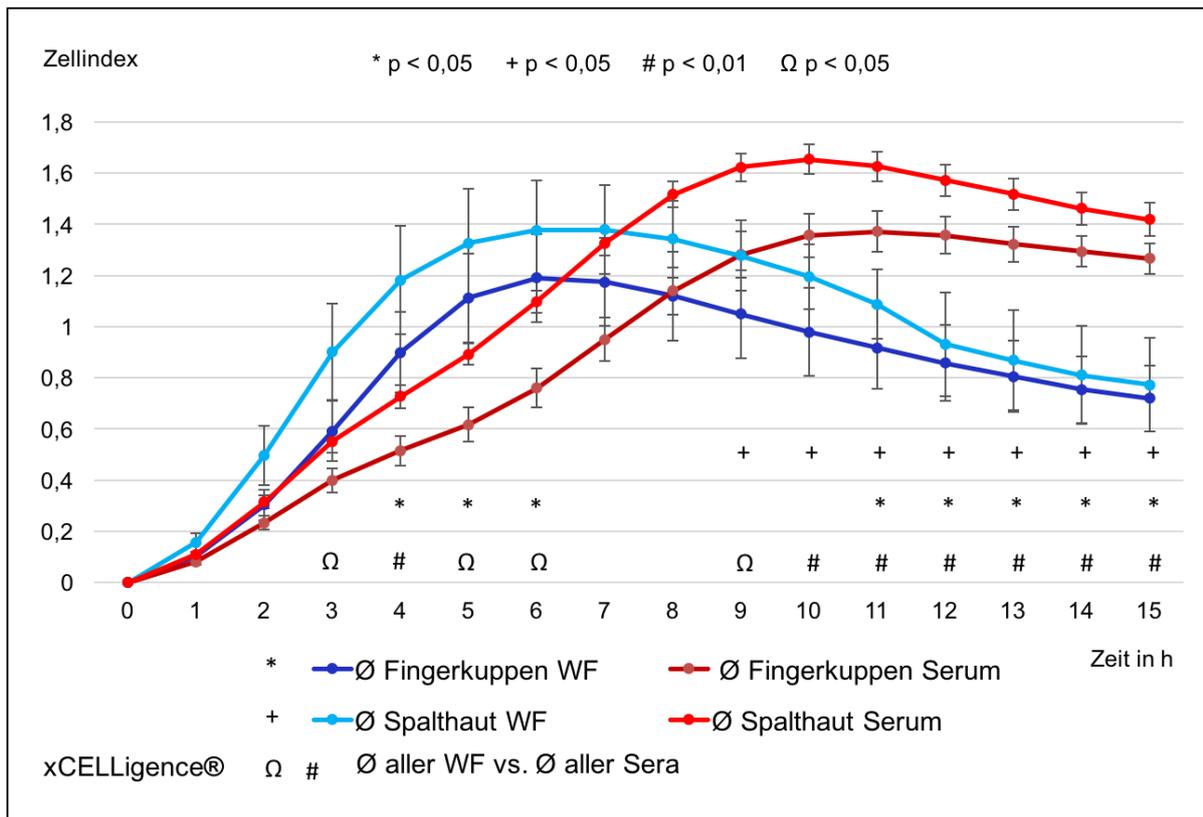


Abbildung 16. Zeitverlauf der Zellmigration mesenchymaler Stammzellen (MSC) unter dem Einfluss von Wundflüssigkeiten (WF) und Blutsera.

Alle Gruppen angegeben in $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

* p < 0,05 \bar{x} Fingerkuppen-WF vs. \bar{x} Fingerkuppen-Sera.

+ p < 0,05 \bar{x} Spalthaut-WF vs. \bar{x} Spalthaut-Sera.

p < 0,01, Ω p < 0,05 \bar{x} WF vs. \bar{x} Sera

6.3 Einfluss von Wundsekreten und Blutsera auf die Migration von HS27-Fibroblasten

Unter dem Einfluss der Wundflüssigkeit okklusiv behandelter Fingerkuppenverletzungen migrierten nach einer fünf- (p=0,041), sechs- (p=0,043) und siebenstündigen (p=0,049) Inkubation signifikant mehr Zellen als unter dem der korrespondierenden Blutsera (siehe **Abbildung 17**). Die Migration erreichte unter dem Einfluss von Wundserum nach zehn Stunden ihr Maximum. Danach kam es zu einer Abnahme der HS27-FB-Migration, so dass keine signifikanten Unterschiede mehr zu dem Effekt unter den korrespondierenden Blutsera bestanden (siehe **Abbildung 17**).

HS27-FB unter dem Einfluss von Wundflüssigkeit okklusiv behandelter Spalthautentnahmestellen zeigten eine ähnliche Migrationskurve. Der Unterschied zu dem Effekt der korrespondierenden Blutsera war jedoch statistisch nicht signifikant. Die p-Werte der verschiedenen Zeitpunkte sind: nach 5 Stunden ($p=0,633$), nach 6 Stunden ($p=0,581$), nach 7 Stunden ($p=0,532$) (siehe **Abbildung 17**). Auch hier lag des Maximum der Migration bei einer zehnstündigen Inkubation mit Wundsekret (siehe **Abbildung 17**).

Der Vergleich der HS27-FB-Migration unter dem Einfluss der Wundflüssigkeiten und Blutsera beider Gruppen (Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen) zeigte signifikante Unterschiede für die Inkubationszeiten zwischen fünf und zehn Stunden ($p=0,004$) (siehe **Abbildung 17**).

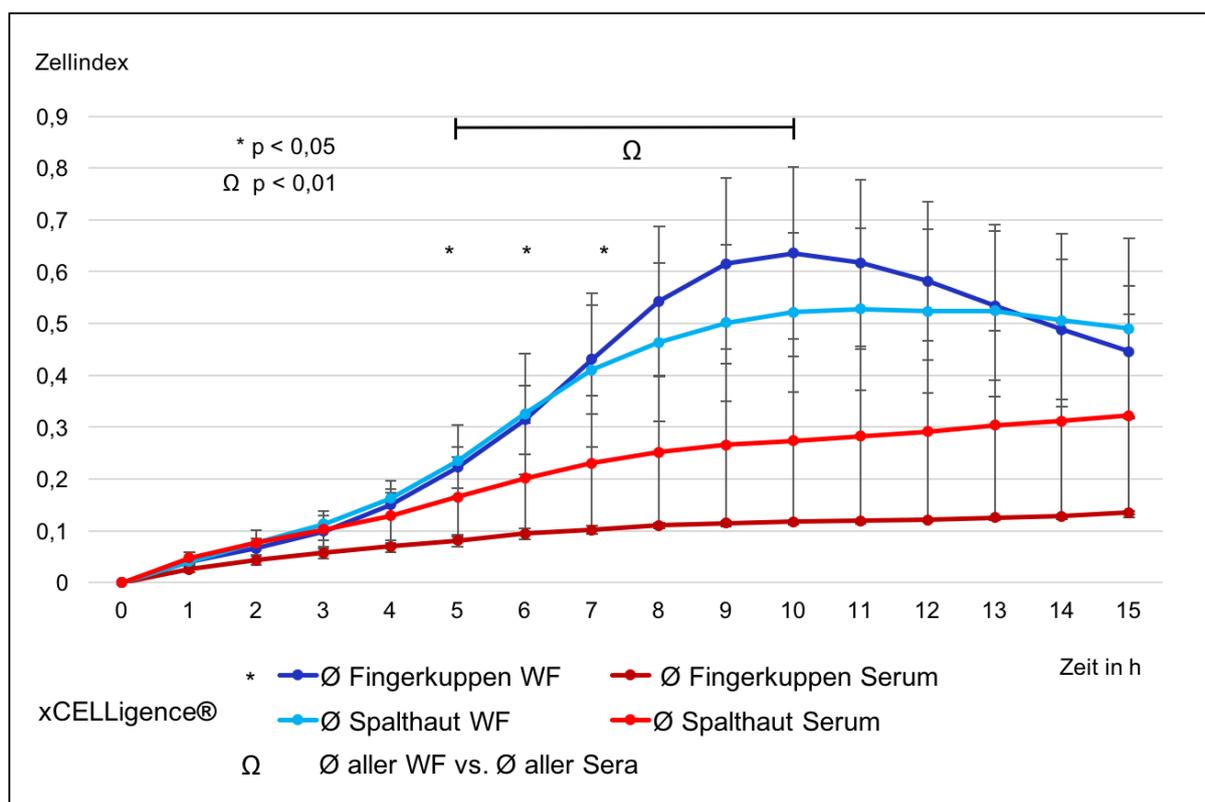


Abbildung 17. Zeitverlauf der HS27-FB-Migration unter dem Einfluss von okklusiven Wundflüssigkeiten (WF) und korrespondierenden Blutsera.

Alle Gruppen angegeben in $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

* $p < 0,05$ \bar{x} Fingerkuppen-WF vs. \bar{x} Fingerkuppen-Sera. Ω $p < 0,01$ \bar{x} WF vs. \bar{x} Sera

6.4 Einfluss von Wundsekreten und Blutsera auf die Proliferation von MSC (kontinuierliche Impedanz-Proliferationsmessung (xCELLigence))

Die Inkubation von MSC mit Wundflüssigkeit okklusiv behandelter Fingerkuppenverletzungen führte nach fünf Stunden ($p=0,061$) und zehn Stunden ($p=0,091$) zu einer nicht signifikanten Steigerung der Proliferation im Vergleich zu einer Inkubation mit Blutserum (siehe **Abbildung 18**).

Auch bei Verwendung der Wundflüssigkeit okklusiv behandelter Spalthautentnahmestellen und der korrespondierenden Blutsera waren keine signifikanten Unterschiede bei der Steigerung der MSC-Proliferation nach fünf Stunden ($p=0,511$) und zehn Stunden ($p=0,511$) erkennbar (siehe **Abbildung 18**).

Betrachtet man beide Gruppen (Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen) gemeinsam, war die Steigerung der MSC-Proliferation nach einer fünfstündigen ($p=0,034$) und zehnstündigen ($p=0,041$) Inkubation mit den Wundsera signifikant größer als nach der Inkubation mit den Blutsera. Dieser Unterschied nahm danach wieder ab. Nach 45 Stunden ($p=0,046$), nach 50 Stunden ($p=0,044$), nach 55 Stunden ($p=0,041$) und nach 60 Stunden ($p=0,04$) war die MSC-Proliferation unter dem Einfluss der Wundflüssigkeiten signifikant geringer als unter dem Einfluss der Blutsera (siehe **Abbildung 18**).

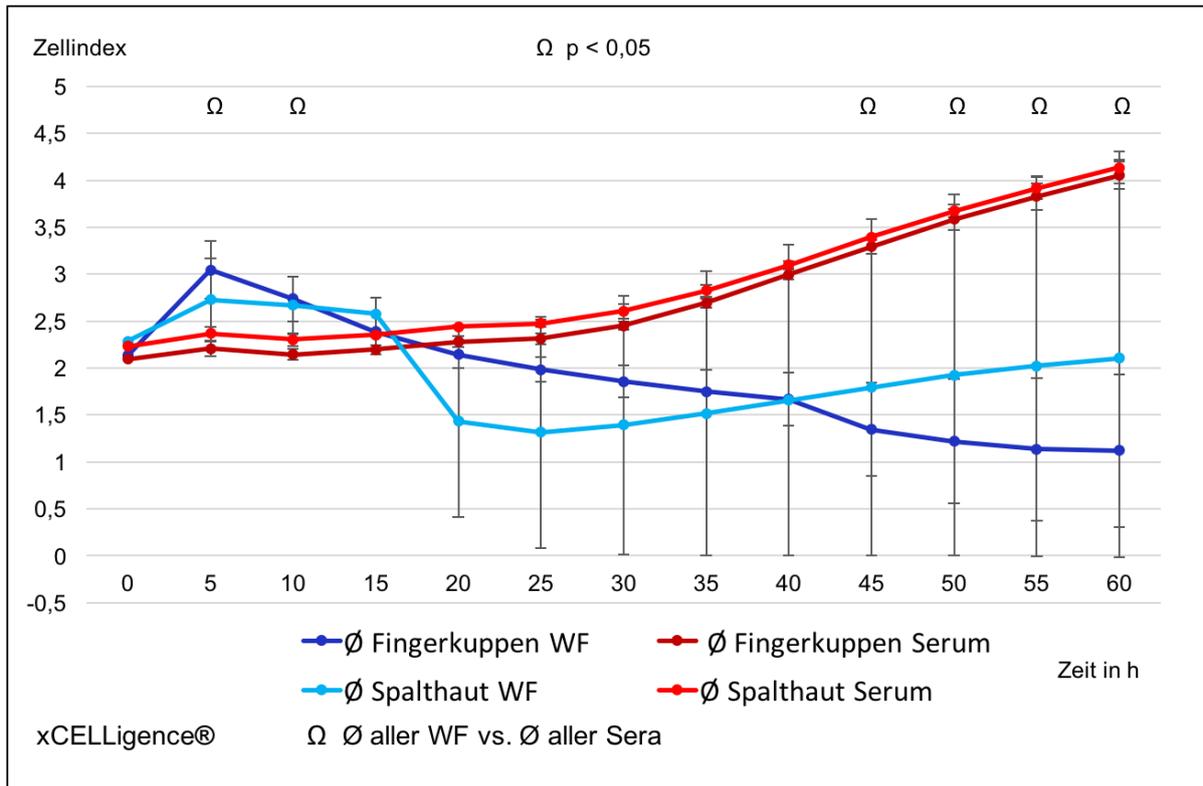


Abbildung 18. Zeitverlauf der MSC-Proliferation unter dem Einfluss von okklusiven Wundflüssigkeiten (WF) und korrespondierenden Blutsera. Alle Gruppen angegeben in $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

6.5 Einfluss von Wundsekreten und Blutsera auf die Proliferation von HS27-FB (kontinuierliche Impedanz-Proliferationsmessung (xCELLigence))

Der Einfluss der Wundsekrete auf die HS27-FB-Proliferation war bei geringer Inkubationsdauer zunächst mit dem der korrespondierenden Blutsera vergleichbar. Eine signifikant geringere HS27-FB-Proliferation bei der Inkubation mit Wundflüssigkeit von okklusiv behandelten Fingerkuppen war nach 15 Stunden ($p=0,012$) und 20 Stunden ($p=0,03$) nachweisbar (siehe **Abbildung 19**).

Bei der Analyse beider Gruppen (Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen) zeigten die Wundsera im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant geringere HS27-FB-Proliferation nach 15 Stunden ($p=0,022$), nach 20 Stunden ($p=0,02$), nach 25 Stunden ($p=0,04$) und dann wieder ab 40 Stunden ($p=0,044$), fortlaufend bis zum Ende der Analyse nach 60 Stunden ($p=0,013$). Ergänzend sind hier die restlichen p-Werte aller signifikanten Zeitpunkte der unten angeführten Grafik

angeführt: nach 45 Stunden ($p=0,032$), nach 50 Stunden ($p=0,023$) und nach 55 Stunden ($p=0,017$) (siehe **Abbildung 19**).

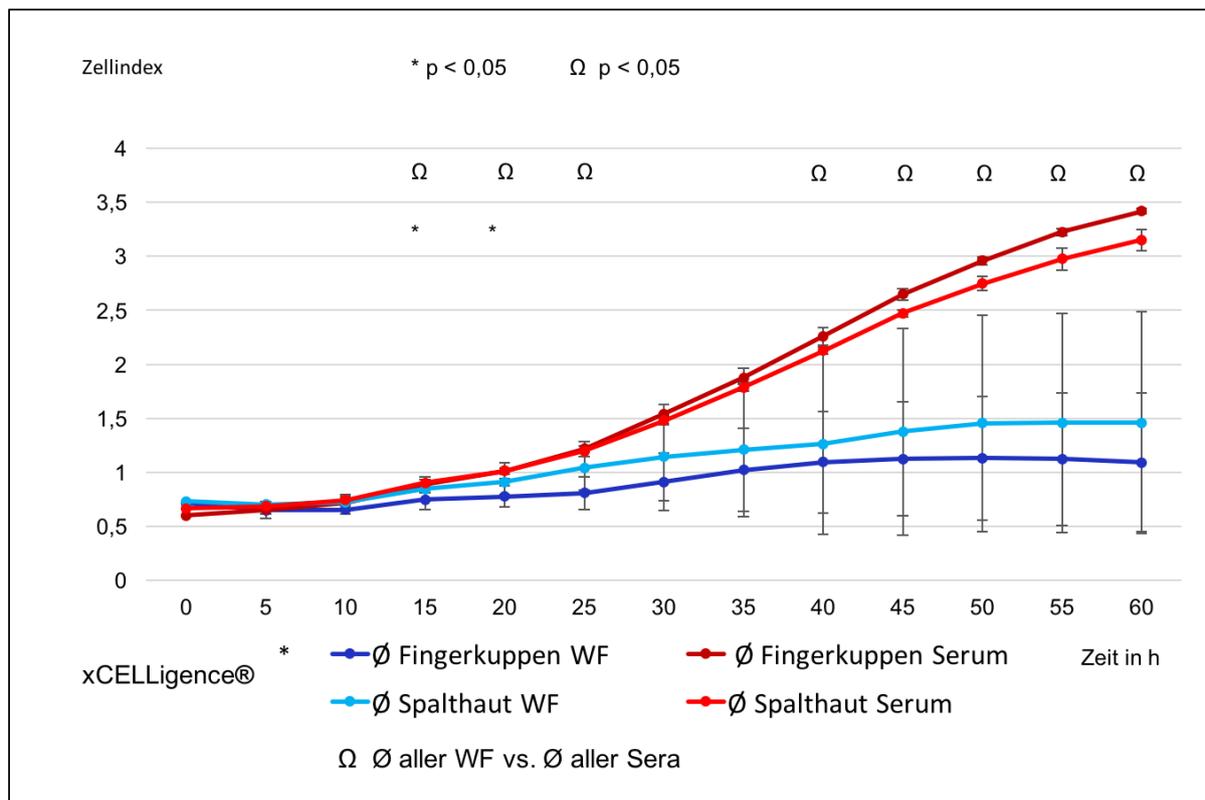


Abbildung 19. Zeitverlauf der HS27-FB-Proliferation unter dem Einfluss von okklusiv behandelten Wundflüssigkeiten (WF) und korrespondierenden Blutsera.

Alle Gruppen angegeben in $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

* $p < 0,05$ Ø Fingerkuppen-WF vs. Ø Fingerkuppen-Sera.

Ω $p < 0,05$ Ø WF vs. Ø Sera

6.6 Einfluss von Wundsekreten und Blutsera auf die Proliferation von HS27-FB und MSC (Endpunkt-Proliferationsmessung (Alamarblue))

6.6.1 HS27-Fibroblasten

Die Endpunkt-Messung nach 72 Stunden ergab eine signifikant geringere HS27-FB-Proliferation unter dem Einfluss von Wundflüssigkeiten der okklusiv behandelten Fingerkuppenverletzungen im Vergleich zu den korrespondierenden Serumkontrollen ($p=0,006$). Der Unterschied des Einflusses von Wundflüssigkeit der Spalthautentnahmestellen und der korrespondierenden Blutsera auf die der HS27-FB-Proliferation war statistisch nicht signifikant ($p=0,158$) (siehe **Abbildung 20**).

Die Analyse beider Gruppen (Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen) ergab eine deutliche signifikante Reduktion der HS27-FB-Proliferation bei der Inkubation mit den Wundsekreten im Vergleich zur Inkubation mit den Serumkontrollen ($p=0,003$) (siehe **Abbildung 20**).

6.6.2 MSC

Im Gegensatz dazu war die MSC-Proliferation nur unter dem Einfluss der Wundflüssigkeit okklusiv verbundener Spalthautentnahmestellen signifikant geringer im Vergleich zur Serumkontrolle ($p=0,0448$). Eine Inkubation mit der Wundflüssigkeit von Fingerkuppenverletzungen konnte die MSC-Proliferation dagegen im Vergleich zur Serumkontrolle nicht statistisch signifikant reduzieren ($p=0,116$) (siehe **Abbildung 20**).

Der Vergleich der MSC-Proliferation beider Gruppen (Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen) ergab eine deutliche signifikante Reduktion bei der Inkubation mit den Wundsekreten im Vergleich zur Inkubation mit den Serumkontrollen ($p=0,008$) (siehe **Abbildung 20**).

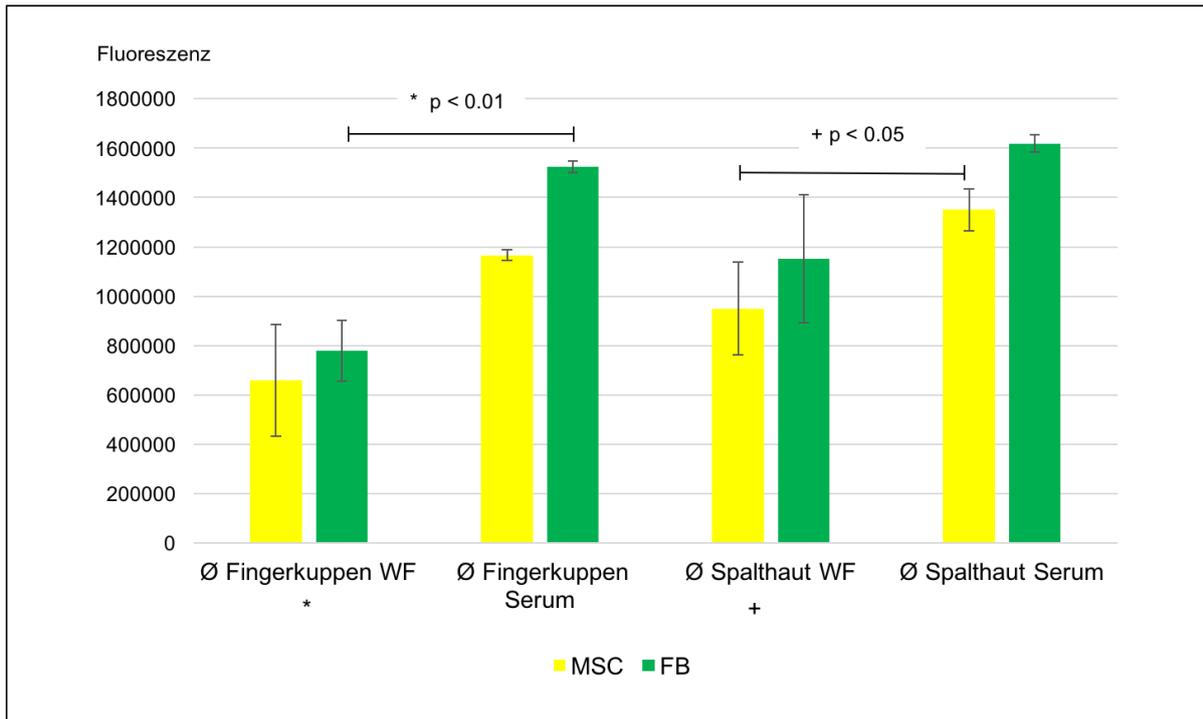


Abbildung 20. MSC- und HS27-FB-Proliferation nach einer 72-stündigen Inkubation mit okklusiv behandelten Wundflüssigkeiten (WF) und korrespondierenden Blutsera. Alle Gruppen angegeben in $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

* $p < 0,05$ Ø Fingerkuppen-Wundflüssigkeiten (WF) vs. Ø Fingerkuppen-Sera.

Ω $p < 0,05$ Ø aller Wundflüssigkeiten vs. Ø aller Sera.

6.7 Zusammenfassung der Effekte der Wundflüssigkeiten auf die Migration und Proliferation von FB und MSC

Der direkte Vergleich des Effektes der Wundflüssigkeit von Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen auf die Migration und Proliferation von MSC und FB zeigte keine signifikanten Unterschiede. Unterschiede im Sinne von nicht signifikanten Trends zeigten sich in einer stärkeren frühen Migration der MSC und HS27-FB unter dem Einfluss der Fingerkuppensekrete (siehe **Abbildung 16** und **Abbildung 17**) im Vergleich zu den Sekreten der Spalthautgruppe. Die kontinuierliche Analyse der HS27-FB-Kulturen ergab in der Fingerkuppengruppe eine stärkere Proliferationsreduktion als in der Spalthautgruppe, die sich in der Endpunktmessung mit dem *Alamarblue*-Assay bestätigte (siehe **Abbildung 19** und **Abbildung 20**). Interessanterweise zeigte dagegen die Endpunktmessung der MSC-Kulturen nach drei Tagen eine stärkere Reduktion der Zellproliferation in der Spalthautgruppe als in der Fingerkuppengruppe

(siehe **Abbildung 20**). Signifikante Unterschiede bestanden zwischen den Effekten der Wundsekrete und der Blutsera.

7 Diskussion

Ein feuchtes Wundmilieu verbessert und beschleunigt den Heilungsverlauf von Wunden und verringert das Risiko von Komplikationen wie Infektionen deutlich (Vogt, Andree et al. 1995) (Beam 2007) (siehe Kapitel 3.5). Der beschleunigte Heilungsverlauf wird in der Literatur durch eine gesteigerte FB-Stimulation und durch eine Induktion der Angiogenese erklärt, die zusammen mit einer vermehrten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren anabol und regenerativ wirken soll (Katz, Alvarez et al. 1991) (Madden, Nolan et al. 1989). Diese Hypothesen können aber nicht das herausragendes Regenerationspotential von Fingerkuppenverletzungen erklären. Bei Fingerkuppenverletzungen regeneriert bis zu 90% des verlorenen Weichteilgewebes und die Sensibilität des Areal wird praktisch vollständig zurückerlangt (Hoigne, Hug et al. 2014). Die vorliegende Studie untersucht erstmals im Detail das Verhalten von FB und MSC im zeitlichen Verlauf unter dem Einfluss von okklusiver Wundflüssigkeit. Die Ergebnisse liefern erste Ansätze zur Erklärung des regenerativen Potentials von Fingerkuppenverletzungen. Diese Erkenntnisse können als Grundlage für die Weiterentwicklung von pro-regenerativen Wundauflagen zur Wund- und Narbenmodulation dienen.

7.1 Diskussion von Material und Methoden

Die Analyse von Wundflüssigkeit unter OV wurde in der Literatur bereits vereinzelt beschrieben (Katz, Alvarez et al. 1991) (Madden, Nolan et al. 1989). Dabei wurde angenommen, dass viele der positiven Effekte, die bei Folienverbänden für eine verbesserte Wund- und Narbenheilung verantwortlich sind, durch die Wundflüssigkeit induziert werden (Pricolo, Caldwell et al. 1990) (Katz, Alvarez et al. 1991). OV führen insbesondere bei Fingerkuppenverletzungen zu herausragenden Ergebnissen in Bezug auf die Regeneration der Weichteile. Diese Patienten eignen sich daher speziell für eine Probensammlung. Kisch et al. zeigten, dass die Abnahme des Wundsekrets aus OV von Fingerkuppenverletzungen den regenerativen Heilungsverlauf nicht negativ beeinflusst und dass sich das Wundsekret gut für weitere Analysen eignet (Kisch, Klemens et al. 2015).

Als direkte Vergleichsgruppe wurden in der hier präsentierten Studie Wundsekrete von Patienten mit Spalthautentnahmestellen ausgewählt, da diese postoperativ häufig mit

Folienverbänden behandelt werden und die Wundflächen für die Wundsekretgewinnung ausreichend groß sind. In der vorliegenden Studie konnte bei fast allen Patienten mit Spalthautentnahmestellen Wundsekret gewonnen werden (4 von 5 Patienten), während eine deutliche höhere Anzahl an Patienten mit Fingerkuppenverletzungen behandelt werden musste, um ausreichend Probenmaterial zu gewinnen (4 von 22 Patienten). Die Aussagekraft unserer Studie könnte durch die geringe Probenanzahl limitiert sein. Hier ist anzumerken, dass die durchschnittlich geringe Menge an gewonnenem Sekret pro Probe und der häufige Probenverlust, die Probensammlung problematisch gestalten und unsere Ergebnisse trotz der Probenanzahl deutlich signifikant sind.

Wir haben uns für Blutserumkontrollen derselben Patienten als direkte Kontrolle entschieden um physiologisch möglichst reale Bedingungen der Wundheilung zu schaffen. Bei einer Verletzung fließt Blutserum in die Wunde und bringt damit wesentliche Faktoren der Wundheilung zu ihrem Wirkort.

MSC und FB sind die dominierenden Zellen bei der Wundheilung. Sie sind speziell in der Granulationsphase und beim *Remodeling* für die Bildung der Matrix und des Granulationsgewebes verantwortlich und gestalten anschließend die Narbenbildung (Maxson, Lopez et al. 2012). Da MSC primär parakrin über die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren den Heilungsverlauf und die Narbenmodulation beeinflussen, war es das Ziel dieser Studie, den Einfluss der okklusiven Wundflüssigkeit auf MSC und FB zu untersuchen. Dabei sollte das chemotaktische und proliferative Potential der Wundflüssigkeit analysiert werden.

Proliferations- und Migrationsmessungen werden in der Literatur häufig als Endpunktmessungen zu einem definierten Zeitpunkt durchgeführt, wodurch abweichende Zeitverläufe oder Fluktuationen nicht detektiert werden. In dieser Studie wurden daher Endpunktmessungen mit dem *Alamarblue*-Assay mit kontinuierlichen Echtzeit-Messungen mit dem *xCELLigence*-System kombiniert. Dadurch konnten die Ergebnisse der beiden Messmethoden miteinander verglichen und der zeitliche Verlauf der Effekte beurteilt werden.

Der *Alamarblue*-Assay ist eine häufig angewandte Methode mit einem breiten Anwendungsspektrum (Rampersad 2012). In der vorliegenden Studie wurde der Assay zur Endpunktmessung der Proliferation nach einer dreitägigen Inkubation verwendet.

Das *xCELLigence*-System basiert auf der kontinuierlichen Messung von Impedanz (= elektrischer Widerstand auf ein Signal) und kann die Zellmigration und -proliferation in Echtzeit erfassen (Ke, Wang et al. 2011).

Abschließend haben *in vitro* Versuche generell eine eingeschränkte Aussagekraft erlauben jedoch Untersuchungen auf zellulärem Niveau, die ansonsten nicht durchführbar wären.

7.2 Einfluss der okklusiven Wundflüssigkeit auf die Migration und Proliferation mesenchymaler Stammzellen

Initiale Erhöhung der MSC-Migration in Wunden

MSC sind wesentlich an der Steuerung der Proliferationsphase beteiligt und später für die Modulation des Narbengewebes verantwortlich (siehe **Abbildung 3**) (Maxson, Lopez et al. 2012). Dabei wirken MSC über die Sezernierung von Wachstumsfaktoren hauptsächlich parakrin (Gnecchi, Zhang et al. 2008). In der vorliegenden Studie wurde in den ersten Stunden eine deutliche Steigerung der MSC-Migration bei Inkubation mit okklusiven Wundflüssigkeiten im Vergleich zu einer Inkubation mit Blutsera nachgewiesen (siehe **Abbildung 16**). Dieser Effekt war bei den Patienten mit Fingerkuppenverletzungen signifikant, bei den Patienten mit Spalthautverletzungen dagegen nicht (siehe **Abbildung 16**). In Wunden und deren Umgebung sind generell nur eine geringe Anzahl an MSC zu finden (Gnecchi, Zhang et al. 2008), eine Steigerung der Einwanderung durch Chemotaxis bei Hypoxie wurde jedoch mehrfach beschrieben (Thangarajah, Vial et al. 2009) (Rubina, Kalinina et al. 2009). Vermutlich werden durch die Hypoxie im Wundgebiet Chemokin-Rezeptoren und chemotaktische Signalstoffe vermehrt exprimiert, die wiederum chemotaktisch auf MSC wirken (Thangarajah, Vial et al. 2009). Dies könnte die stark erhöhte MSC-Migration unter dem Einfluss okklusiver Wundflüssigkeiten im Vergleich zur Kontrolle erklären.

Eine Hypoxie fördert zusätzlich die Angiogenese durch eine erhöhte Produktion von VEGF, der wie PDGF, KGF, bFGF und TGF- β von MSC sezerniert wird (Rehman, Traktuev et al. 2004) (Gnecchi, Zhang et al. 2008). Erhöhte Zytokin-Konzentrationen (z.B. PDGF, TGF- β) wurden in Wundflüssigkeiten bereits mehrfach beschrieben (Ono, Gunji et al. 1995). Der Wachstumsfaktor PDGF erfüllt im Rahmen des Wundheilungsprozesses verschiedene Funktionen; dazu zählen eine Steigerung der VEGF-Expression und eine Förderung der Angiogenese (Heldin and Westermark 1999). Wang et al. konnten zeigen, dass VEGF die Migration von MSC in die Defektzone fördert und damit ggf. den okklusiv hypoxischen Effekt der Wundauflagen verstärkt (Wang, Wang et al. 2015).

Abflachung der MSC-Migration im Verlauf

Gemeinsam triggern MSC und FB die Aktivierung von Keratinozyten, die für den Wundverschluss der Defektzone durch Reepithelialisierung verantwortlich sind (Coulombe 2003). Wenn die Oberfläche der Wunde mit Epithel bedeckt ist, kommt es zu einem Migrationsstopp der Keratinozyten und zur Umwandlung in Plattenepithelzellen (Guo and Dipietro 2010). MSC in Haarfollikeln zeigen bei einer Verletzung eine erhöhte Migration in Richtung Defektzone, die allerdings nach dem Erreichen eines Plateaus wieder abfällt (Ito, Liu et al. 2005). In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls nach einem starken Migrationsanstieg ein Abfall festgestellt werden (siehe Abbildung 14). Die MSC könnten, wie oben beschrieben, durch die Bedeckung der Wundoberfläche mit dem OV ein Signal im Sinne eines vorläufigen Wundschlusses erhalten, wodurch ihre Migrationstendenz abnimmt.

Die Verringerung der MSC-Migration im zeitlichen Verlauf könnte aber auch mit der anti-inflammatorischen Wirkung von MSC in Wunden zusammenhängen. MSC beeinflussen über parakrine Faktoren (anti-inflammatorische Zytokine) die Entwicklung von Makrophagen in Richtung eines Phänotyps mit entzündungshemmender Wirkung (Chen, Tredget et al. 2008). Zusätzlich zu dem abschwächenden und verkürzenden Effekt eines OV auf die Entzündungsphase in vivo könnten bisher noch unbekannte Signale dafür verantwortlich sein, dass die Migrationstendenz der MSC frühzeitig gehemmt wird, da die regenerativen Effekte bereits ihre Wirkung entfalten (Ksander, Pratt et al. 1990).

Effekt der okklusiven Wundflüssigkeit auf die MSC-Proliferation

In der vorliegenden Studie konnte analog zur MSC-Migration initial eine starke Steigerung der Proliferation durch Inkubation der Zellen mit okklusiven Wundflüssigkeiten gezeigt werden. Nach Erreichen eines Plateaus kam es aber im weiteren Verlauf zu einem Abfall der MSC-Proliferation. Laut Buravkova et al. führt eine Hypoxie zu einer verstärkten MSC-Proliferation und Genaktivierung (Buravkova, Grinakovskaia et al. 2009). *In vitro* Studien zeigten weiterhin, dass eine hypoxische Zellumgebung die MSC-Proliferation im Vergleich zu einer normoxischen Umgebung steigert (Grayson, Zhao et al. 2007). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass MSC in ischämischem, hypoxischem Gewebe ihr regeneratives Potential über den Anstieg der Proliferation, Migration und Zytokin-Produktion erhöhen (Thangarajah, Vial et al. 2009).

In Folgestudien gilt es zu klären, ob die hypoxischen Bedingungen in ischämischen Wunden allein für eine gesteigerte Migration und Proliferation von MSC verantwortlich sind, ob OV diese Effekte steigern oder modulieren können und welche (inflammatorische) Signalmoleküle an den in der vorliegenden Studie beobachteten Effekten beteiligt sind.

7.3 Einfluss der okklusiven Wundflüssigkeit auf die Migration und Proliferation von Fibroblasten

FB gehören zu den wichtigsten Zellen der Wundheilung und wirken primär in der Entzündungs- und Granulationsphase (Barry 2003). Am vierten Tag nach einer Verletzung dominieren sie die Wundumgebung. Ihre Anzahl steigt kontinuierlich bis zum Ende der zweiten Woche an (Gray, Bishop et al. 1993) (Barry 2003). Danach sind FB für die Bildung des Granulationsgewebes verantwortlich (Gray, Bishop et al. 1993). Dieser als Fibroplasie bezeichnete Prozess scheint in okklusiv behandelten Wunden differenzierter abzuverlaufen als in trocken verbundenen Wunden (Dyson, Young et al. 1988) (Ksander, Pratt et al. 1990).

Induktion der FB-Migration durch okklusive Wundflüssigkeiten

An der Bildung der ersten provisorischen Matrix sind bFGF, TGF- β und PDGF beteiligt. Diese Mediatoren werden von FB produziert (Robson, Dubay et al. 2004). Dabei werden sowohl die Migration als auch die Proliferation von FB moduliert und schließlich die initiale Matrix durch Kollagen ersetzt (Pajulo, Pulkki et al. 2001) (Robson, Dubay et al. 2004). Die Steuerung der FB stellt somit einen wesentlichen Mechanismus der kutanen Wundheilung dar. Obwohl unterschiedliche Chemokine die Migration und Proliferation von FB beeinflussen, gilt bFGF als einer der stärksten Induktoren für diese Effekte (Kanazawa, Fujiwara et al. 2010). Zahlreiche Studien zu Wundflüssigkeitsanalysen von okklusiv behandelten Wunden zeigten erhöhte Konzentrationen bestimmter Zytokine wie bFGF (Vogt, Wagner et al. 1997). Kanazawa et al. untersuchten den Effekt von bFGF auf die Migration von FB *in vitro* und konnten dabei eine signifikante Steigerung der Migration beobachten (Kanazawa, Fujiwara et al. 2010). In der vorliegenden Studie bewirkten die Wundflüssigkeiten unter OV initial eine signifikante Steigerung der Fibroblasten-Migration. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse anderer Studien und können helfen, die regenerativen Effekte der OV zu erklären.

Hemmung der FB-Proliferation durch okklusive Wundflüssigkeiten

Die in mehreren Studien beschriebene Beschleunigung der Wundheilung durch OV wurde auf eine gesteigerte Proliferation von Keratinozyten und FB sowie auf eine stärkere Neoangiogenese und Zytokin-Ausschüttung zurückgeführt (Katz, Alvarez et al. 1991) (Madden, Nolan et al. 1989). Die Bildung von Granulationsgewebe hängt allerdings nur zu Beginn von einer Steigerung der FB-Proliferation ab (Diegelmann and Evans 2004). Kontinuierlich hohe FB-Proliferationsraten treten bei einer physiologischen Wundheilung nicht auf, sondern sind Kennzeichen hypertropher Narben (Diegelmann and Evans 2004). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Wundflüssigkeit unter OV zu einer kontinuierlichen Reduktion der FB-Proliferation führt. Dieser Zusammenhang könnte für die narbenprotektiven Effekte von OV bei konservativ behandelten Fingerkuppenverletzungen verantwortlich sein. Rinkevich et al. zeigten, dass die Blockierung der Proliferation einer FB-Zelllinie, die für die Bildung eines ausgeprägten Narbengewebes bekannt ist, die Narbenbildung

deutlich einschränkt (Rinkevich, Walmsley et al. 2015). Studien zur fetalen narbenlosen Wundheilung beschrieben eine reduzierte FB-Antwort auf inflammatorische Zytokine (Kennedy, Diegelmann et al. 2000). In diesem Kontext stellt sich die Frage, ob möglicherweise das feuchte Wundmilieu einen ähnlichen Effekt auf FB ausübt.

Zusammengefasst zeigen die Resultate der vorliegenden Studie einen möglichen narbenprotektiven Effekt von OV durch eine frühzeitige Induktion der FB-Migration bei gleichzeitiger Hemmung der FB-Proliferation.

7.4 Potentieller Einfluss der okklusiven Wundflüssigkeit auf die Narbenmodulation

Die Generierung eines feuchten Wundmilieus durch okklusive Wundauflagen beeinflusst die Narbenentwicklung und letztlich die Narbenqualität (Atiyeh, Amm et al. 2003). Entscheidend für diese Prozesse sind zelluläre Mechanismen in der Entzündungs- und Proliferationsphase, die nach wie vor noch nicht ausreichend erforscht sind (Dyson, Young et al. 1988) (Vogt, Andree et al. 1995).

Beeinflussung von Fibroblasten und der Kollagenmatrix

FB sind für die Bildung der initialen Fibrinmatrix, für die Kollagensynthese und schließlich für das *Remodeling* zu finalem Narbengewebe verantwortlich (Gray, Bishop et al. 1993) (Barry 2003). Bei der adulten kutanen Wundheilung kommt es im Vergleich zur unverletzten Haut zu einer vermehrten Vernetzung von Kollagenfasern, die die Narbenbildung fördert und die Elastizität der Matrix reduziert (Lovvorn, Cheung et al. 1999). Myofibroblasten (differenzierte FB) reduzieren die Wundoberfläche durch Wundkontraktion und verringern damit die mit Epithel neu zu bedeckende Fläche (Franz, Steed et al. 2007). Nach Abschluss des *Remodelings*, das bis zu zwei Jahre dauern kann, wird die provisorische Matrix durch MMP umgebaut und die finale Narbe entsteht (Singer and Clark 1999). Histologisch zeigt das adulte Narbengewebe anstatt der netzartigen Anordnung von Kollagenfasern unverletzter Hautareale eine parallele Organisation dieser Fasern, die die geringere Reißfestigkeit des Narbengewebes bedingt (Whitby and Ferguson 1991) (Longaker, Whitby et al. 1990) (Gurtner, Werner

et al. 2008). Dieses Gewebe besteht zum überwiegenden Teil aus Typ I Kollagen (Franz, Steed et al. 2007). Bei der narbenlosen fetalen Wundheilung wird das Kollagen dagegen netzartig organisiert und das Verhältnis von Kollagen Typ III zu Typ I ist deutlich erhöht (Longaker, Whitby et al. 1990). Okklusive Wundbehandlungen reduzieren die Narbenbildung und erhöhen die Narbenqualität (Namazi, Fallahzadeh et al. 2011). Das feuchte Wundmilieu und die Bedeckung der Wundoberfläche hemmen möglicherweise die FB-Proliferation. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die OV-Wundflüssigkeit in der Lage ist die Proliferation und metabolische Aktivität der FB zu hemmen. Da bei pathologischen Narben (z.B. hypertrophen Narben) eine überschießende FB-Proliferation im Vordergrund steht, könnte diese Inhibition wesentlich zur Narbenmodulation beitragen (Diegelmann and Evans 2004).

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Studie eine temporär gesteigerte FB-Migration unter dem Einfluss von Wundflüssigkeit detektiert werden, die nach einer zehnstündigen Inkubation wieder deutlich abnahm. Bei trocken behandelten Wunden ist eine schnelle FB-Migration und ein schneller Wundschluss entscheidend für die Verhinderung von Infektionen und Flüssigkeitsverlusten (Eming, Krieg et al. 2007). Diese rasche FB-Migration und anschließende Proliferation resultiert dann in der Narbenbildung. Diese Effekte waren in der vorliegenden Studie in der Gruppe der okklusiv behandelten Fingerkuppenverletzungen stärker ausgeprägt als in der Spalthautgruppe. Dieser Befund könnte möglicherweise erklären, warum Fingerkuppenverletzungen praktisch keine Narben bilden und sich Hautleisten der Finger nahezu vollständig regenerieren (Hoigne, Hug et al. 2014).

Zusammengefasst übernehmen FB zahlreiche Funktionen im Wundheilungsprozess. Eine initial schnelle FB-Migration ins Wundgebiet und eine anschließend kontrollierte FB-Proliferation könnten die regenerativen Effekte in der Wunde und damit die Anordnung der Kollagenmatrix im Sinne einer Verbesserung der Narbenqualität positiv beeinflussen.

Verkürzung der Entzündungsphase und Hemmung pro-inflammatorischer Zytokine

OV können die Entzündungs- und Proliferationsphase in der kutanen Wundheilung verkürzen und damit die Effekte pro-inflammatorischer Mediatoren besser als trockene Verbandsregimes abschwächen (Dyson, Young et al. 1988). Ksander et al. fanden im Tiermodell eine deutliche Reduktion von Kollagen und Granulationsgewebe in okklusiv behandelten Wunden. In histologischen Untersuchungen fanden sie eine signifikant reduzierte Anzahl von Granulozyten und Monozyten im Granulationsgewebe der feucht behandelten Wunden im Vergleich zu den Kontrollen. Insgesamt waren die Anzeichen der Entzündungsphase der Wundheilung deutlich geringer (Ksander, Pratt et al. 1990). Laut O'Shaughnessy et al. reduziert die Okklusion den Flüssigkeitsverlust von Wunden und fördert die Homöostase der Wundumgebung, was zu einer Abnahme der Makrophagenzahl und letztlich zu einer Vermeidung von hypertrophen Narben führt (O'Shaughnessy, De La Garza et al. 2009).

Einfluss von MSC auf die Narbenmodulation

MSC wirken parakrin im Wundgebiet, fördern die Angiogenese sowie die Reepithelialisierung, rekrutieren Zellen und beeinflussen die Entzündungsphase durch die Hemmung pro-inflammatorischer Zytokine (Laverdet, Micallef et al. 2014). MSC und Zytokine modulieren das Verhalten von FB und bestimmen damit wesentlich die Organisation und den Umbau der Matrix, die Kollagensynthese sowie die Differenzierung von FB in Myofibroblasten (Pajulo, Pulkki et al. 2001) (Robson, Dubay et al. 2004) (Maxson, Lopez et al. 2012). Damit sind MSC essentielle Modulatoren der Wund- und Narbenheilung und steuern das *Remodeling* (Chen, Hao et al. 2016). MSC produzieren in der Entzündungsphase anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 und hemmen gleichzeitig die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine wie Interferon- γ und TNF- α (Aggarwal and Pittenger 2005). Damit verhindern sie die typischen pathophysiologischen Anzeichen chronischer Wunden, die sich durch prolongierte Entzündungsphasen mit überschießender und verlängerter Infiltration von Entzündungszellen (z.B. neutrophile Granulozyten) auszeichnen (Diegelmann and Evans 2004). MSC können über eine Inhibition der Entzündungsreaktion, einer Anregung der Angiogenese und über die Induktion der Zellproliferation und -migration die Wundheilung positiv beeinflussen (Gnecchi, Zhang et al. 2008). In der vorliegenden

Studie bewirkte die Wundflüssigkeit unter OV eine gesteigerte Migration von FB und MSC. Dieser Effekt könnte für die Verbesserung der Heilungsraten, der Wund- und Narbenqualität okklusiv behandelter Wunden mitverantwortlich sein. Zusätzlich wurde eine für hypertrophe Narben typisch überschießende FB-Proliferation gehemmt (Ferguson, Whitby et al. 1996) .

Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, warum sich Fingerkuppen beim Menschen nach einer Verletzung fast vollständig regenerieren. Analog zu dem Regenerationspotential bestimmter Amphibien, Fische und Mäuse wird vermutet, dass pluripotente MSC für die herausragende Regeneration des verlorenen Gewebes mitverantwortlich sind, sich im Rahmen des Wundheilungsprozesses in Zelllinien der zu rekonstruierenden Gewebe differenzieren und diese formieren (Poss 2010) (Vidal and Dickson 1993).

Hypoxie und indirekte Narbenmodulation

Die MSC-Mobilisation im Wundgebiet wird durch Hypoxie stimuliert. Eine kontinuierliche Hypoxie, wie sie in ischämischen Wunden auftritt, steigert den Effekt (Liu, Yu et al. 2011). Verantwortlich für die erhöhte MSC-Aktivität ist vermutlich HIF-1 α (Liu, Yu et al. 2011). In der vorliegenden Studie konnte speziell in der Fingerkuppengruppe ein starker Anstieg der MSC-Migration unter dem Einfluss von Wundflüssigkeit nachgewiesen werden. Dieser Effekt war allerdings nur temporär. Nach Erreichen eines Plateaus sank die MSC-Migration wieder, was darauf schließen lässt, dass weitere Mechanismen in die Steuerung der MSC-Aktivität involviert sind. Eine Hypoxie fördert zusätzlich die Angiogenese, beschleunigt so die Wundheilung und kann somit ggf. die narbenmodulierenden Wirkungen von MSC unterstützen (Katz, Alvarez et al. 1991) (O'Toole, Marinkovich et al. 1997).

7.5 Einfluss der Wundflüssigkeit unter Okklusivverbänden auf die Angiogenese

Als wesentlicher Bestandteil des Wundheilungsprozesses versorgt die Angiogenese die Wundumgebung mit Sauerstoff und Nährstoffen, was speziell für die Bildung des Granulationsgewebes von Bedeutung ist. In der provisorischen Matrix dominieren neu gebildete Gefäße und machen ca. 60% des Volumens aus (Laschke, Harder et al. 2006) (Lingen 2001) (Risau 1997). Das in okklusiv behandelten Wunden vermehrt gebildete bFGF scheint für die Angiogenese bei der kutanen Wundheilung von besonderer Bedeutung zu sein (Brown and Bayat 2009) (Vogt, Wagner et al. 1997). Bei einer Verletzung wird bFGF aus geschädigten Endothelzellen freigesetzt und wirkt auf die Proliferation und Migration von Endothelzellen im Sinne einer Angiogenese-Induktion (Ku and D'Amore 1995). Die Endothelzellaktivierung erfolgt über pro-angiogenetische Zytokine (Ferrara, Gerber et al. 2003). VEGF gilt als Hauptmediator der Angio- und Vaskulogenese und wird bei Hypoxie über eine gesteigerte Produktion des Transkriptionsfaktors HIF-1 α vermehrt exprimiert (Gale and Yancopoulos 1999).

OV führen zu einer gesteigerten Synthese pro-angiogenetischer Mediatoren, zur Modulation des Granulationsgewebes und zur Förderung der Angiogenese (Jafari, Muller et al. 2017) (Madden, Nolan et al. 1989). Jafari et al. untersuchten okklusiv behandelte Fingerkuppenverletzungen mit Doppler-Ultraschall und analysierten das Wundsekret auf das Vorhandensein von Zytokinen (Jafari, Muller et al. 2017). Sie fanden erhöhte VEGF-, EGF-A- und PDGF-Konzentrationen in den Wundsekreten und eine signifikant erhöhte Vaskularisierung und Gewebeelastizität in den nahezu vollständig regenerierten Fingerkuppen im Vergleich zu unverletzten Finger der Gegenseite (Jafari, Muller et al. 2017). In den vorliegenden Untersuchungen erwies sich speziell das Wundsekret von Fingerkuppenverletzungen als effektiv in der Auslösung der initialen MSC-Migration und Proliferation.

Während eine Hypoxie in den frühen Stadien der Wundheilung die Regeneration des Gewebes fördert, kann sie im weiteren Verlauf die FB-Migration und die Angiogenese hemmen (Erba, Ogawa et al. 2011) (Oberringer, Meins et al. 2008) (Gordillo and Sen 2003). Jafari et al. konnten aber belegen, dass es bei Einsatz von Folienverbänden zu keiner Verringerung der Angiogenese, sondern im Gegenteil zu einer Steigerung der

Durchblutung und Geweberegeneration kommt (Jafari, Muller et al. 2017). Diese Befunde deuten darauf hin, dass neben der Hypoxie weitere Faktoren an den positiven Effekten okklusiver Wundtherapien beteiligt sind.

Möglicherweise beruhen die guten Ergebnisse bei der Abheilung okklusiv behandelte Fingerkuppenverletzungen auf einer Kombination aus hypoxischen Bedingungen, der Ausschüttung von Zytokinen wie VEGF, bFGF, EGF und PDGF und auf das in der vorliegenden Studie beobachtete Verhalten von MSC und FB (Smith, Willis et al. 2010) (Shah, Foreman et al. 1995) (Gnecchi, Zhang et al. 2008) (Vogt, Wagner et al. 1997).

7.6 Einfluss der Wundflüssigkeit unter Okklusivverbänden auf die Nervenregeneration

Folienverbände führen bei Fingerkuppenverletzungen in der Regel nicht nur funktionell und ästhetisch zu sehr guten Ergebnissen, sondern auch zu einer nahezu vollständigen Regeneration der Kuppensensibilität der betroffenen Finger (Mennen and Wiese 1993) (Seah, Wu et al. 2013). Bestimmte Mäuse, Amphibien und Fische können abgetrennte Gliedmaßen regenerieren (Rinkevich, Lindau et al. 2011). Die Regeneration von Fingerkuppen stellt beim Menschen dagegen eine Ausnahme dar. Wie oben beschrieben, wird vermutet, dass pluripotente MSC bei diesem Prozess eine bedeutende Rolle spielen und beispielsweise zu neuen Nervenzellen differenzieren (Poss 2010) (Vidal and Dickson 1993).

Die bei der Regeneration der verletzten Digitalnerven involvierten Prozesse, die nach Abschluss der Wundheilung zur einer normalen 2-Punkt-Diskrimination der betroffenen Finger führen, sind weitgehend unverstanden (Jafari, Muller et al. 2017). Jafari et al. fanden in Wundsekreten von okklusiv behandelte Fingerkuppenverletzungen signifikant erhöhte Konzentrationen von *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *leukemia inhibitory factor* (LIF) und EGF im Vergleich zu Wundsekreten von Brandwunden. Die Autoren schlussfolgerten, dass speziell die Erhöhung von BDNF in Zusammenhang mit der gesteigerten Angiogenese bei den neuronalen Regenerationsprozessen eine Rolle spielen (Jafari, Muller et al. 2017).

7.7 Ausblick

Moderne Wundauflagen sollen nach Reinigung der Wunden die Homöostase im Wundgebiet sicherstellen und regenerative Aspekte der Wundheilung unterstützen (Rehman, Traktuev et al. 2004). Für diese Aufgaben existiert eine Vielzahl verschiedener Materialien, die die Wundheilung in Abhängigkeit von der Art der Wunde und der Behandlung positiv beeinflussen (Landriscina, Rosen et al. 2015). Für den Wundheilungsprozess ist aber nicht nur die Auswahl der Wundauflage von Bedeutung. Vielmehr sollten in Zukunft feuchte Wundauflagen, die regenerativ im Wundmilieu wirken, mit regenerativ wirkenden Mediatoren (z.B. MSC) kombiniert werden.

Autologe MSC können verhältnismäßig leicht und risikoarm gewonnen werden und fördern durch ihr parakrines Wirkspektrum multiple positive Effekte der Wundheilung (Schneider, Unger et al. 2017) (Maxson, Lopez et al. 2012). MSC wirken anti-inflammatorisch, verkürzen die Entzündungsphase der Wundheilung und führen zu einer schnelleren Überleitung des Heilungsprozesses in die Proliferationsphase und in das *Remodeling* (Lau, Paus et al. 2009) (Maxson, Lopez et al. 2012). Diese Eigenschaften sind speziell für die Behandlung chronischer Wunden vorteilhaft. Die Nutzung des Potentials dieser Zellen könnte neue Behandlungsmaßstäbe bei der lokalen, gering invasive Wundversorgung setzen (Laverdet, Micallef et al. 2014). Das Ziel moderner, regenerativ wirkender Wundauflagen sollte die bestmögliche Wiederherstellung der Wundintegrität, der sensiblen Versorgung der Defektzone und der Oberflächenbeschaffenheit der verletzten Haut sein. Dazu sollten, je nach Verletzungsmuster und Wunde, moderne Wundauflagen mit regenerativen medizinischen Ansätzen kombiniert werden, um das bestmögliche Ergebnis für die Patienten zu erzielen.

8 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Wundflüssigkeit unter OV von Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen die Proliferation und Migration von MSC und FB in einem begrenzten Zeitfenster beeinflusst. Dank der eingesetzten modernen Untersuchungsmethoden konnte das Verhalten der MSC und FB kontinuierlich in Echtzeit analysiert werden. Mit den Ergebnissen konnten neue Erkenntnisse über mögliche verantwortliche Mechanismen gewonnen werden, die für die herausragende Effektivität von OV bei Fingerkuppenverletzungen verantwortlich sein könnten.

MSC sind bedeutende Modulatoren der Wund- und Narbenheilung und beeinflussen jede Phase der Wundheilung. Die frühe starke Aktivierung der MSC-Migration könnte mitverantwortlich für die rasche Geweberegeneration und frühe Modulation des Granulationsgewebes bei Fingerkuppenverletzungen sein. Die Hemmung der FB-Proliferation unterstützt den narbenprotektiven Effekt von OV und könnte ein Therapieansatz zur Verhinderung der pathologischen Narbenbildung darstellen. Die Interaktion von MSC und FB in okklusiv behandelten Wunden trägt möglicherweise wesentlich zu den guten klinischen Ergebnissen bei der Wundheilung von Fingerkuppenverletzungen und Spalthautentnahmestellen bei.

9 Literaturverzeichnis

Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." Blood **105**(4): 1815-1822.

Allen, M. J. (1980). "Conservative management of finger tip injuries in adults." Hand **12**(3): 257-265.

Alvarez, O. M., P. M. Mertz and W. H. Eaglstein (1983). "The effect of occlusive dressings on collagen synthesis and re-epithelialization in superficial wounds." J Surg Res **35**(2): 142-148.

Atasoy, E., E. Ioakimidis, M. L. Kasdan, J. E. Kutz and H. E. Kleinert (1970). "Reconstruction of the amputated finger tip with a triangular volar flap. A new surgical procedure." J Bone Joint Surg Am **52**(5): 921-926.

Atiyeh, B. S., C. A. Amm and K. A. El Musa (2003). "Improved scar quality following primary and secondary healing of cutaneous wounds." Aesthetic Plast Surg **27**(5): 411-417.

Barry, F. P. (2003). "Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells." Birth Defects Res C Embryo Today **69**(3): 250-256.

Beam, J. W. (2007). "Management of superficial to partial-thickness wounds." J Athl Train **42**(3): 422-424.

Berman, B., A. Maderal and B. Raphael (2017). "Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment." Dermatol Surg **43 Suppl 1**: S3-S18.

Birdsell, D. C., K. S. Hein and R. L. Lindsay (1979). "The theoretically ideal donor site dressing." Ann Plast Surg **2**(6): 535-537.

Brown, E. J. (1995). "Phagocytosis." Bioessays **17**(2): 109-117.

Brown, J. J. and A. Bayat (2009). "Genetic susceptibility to raised dermal scarring." Br J Dermatol **161**(1): 8-18.

Buravkova, L. B., O. S. Grinakovskaia, E. P. Andreeva, A. P. Zhambalova and M. P. Kozionova (2009). "[Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension]." Tsitologija **51**(1): 5-11.

Cass, D. L., K. M. Bullard, K. G. Sylvester, E. Y. Yang, M. T. Longaker and N. S. Adzick (1997). "Wound size and gestational age modulate scar formation in fetal wound repair." J Pediatr Surg **32**(3): 411-415.

Chaby, G., P. Senet, M. Vaneau, P. Martel, J. C. Guillaume, S. Meaume, L. Teot, C. Debure, A. Domp martin, H. Bachelet, H. Carsin, V. Matz, J. L. Richard, J. M. Rochet, N. Sales-Aussias, A. Zagnoli, C. Denis, B. Guillot and O. Chosidow (2007). "Dressings for acute and chronic wounds: a systematic review." Arch Dermatol **143**(10): 1297-1304.

Chau, N., G. C. Gauchard, C. Siegfried, L. Benamghar, J. L. Dangelzer, M. Francais, R. Jacquin, A. Sourdou, P. P. Perrin and J. M. Mur (2004). "Relationships of job, age, and life conditions with the causes and severity of occupational injuries in construction workers." Int Arch Occup Environ Health **77**(1): 60-66.

Cheema, S. A. and A. Ahmad (2012). "Frequency of sensory deficit in terms of two point discrimination in split thickness skin grafts and local flaps for soft tissue defects of fingers." J Ayub Med Coll Abbottabad **24**(1): 86-89.

Chen, D., H. Hao, X. Fu and W. Han (2016). "Insight into Reepithelialization: How Do Mesenchymal Stem Cells Perform?" Stem Cells Int **2016**: 6120173.

Chen, L., E. E. Tredget, P. Y. Wu and Y. Wu (2008). "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing." PLoS One **3**(4): e1886.

Clark, R. A. (1985). "Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I." J Am Acad Dermatol **13**(5 Pt 1): 701-725.

Colwell, A. S., M. T. Longaker and H. P. Lorenz (2003). "Fetal wound healing." Front Biosci **8**: s1240-1248.

Coulombe, P. A. (2003). "Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery." J Invest Dermatol **121**(2): 219-230.

Curtis, R. M. (1957). "Cross-finger pedicle flap in hand surgery." Ann Surg **145**(5): 650-655.

Damert, H. G. and S. Altmann (2012). "Behandlung von Fingerkuppenamputationen mittels Semiokklusivverband." Unfallchirurg **115**(9): 798-801.

de Alwis, W. (2006). "Fingertip injuries." Emerg Med Australas **18**(3): 229-237.

Diegelmann, R. F. and M. C. Evans (2004). "Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing." Front Biosci **9**: 283-289.

Ding, D. C., W. C. Shyu and S. Z. Lin (2011). "Mesenchymal stem cells." Cell Transplant **20**(1): 5-14.

Dowling, C. M., C. Herranz Ors and P. A. Kiely (2014). "Using real-time impedance-based assays to monitor the effects of fibroblast-derived media on the adhesion, proliferation, migration and invasion of colon cancer cells." Biosci Rep **34**(4).

Dyson, M., S. Young, C. L. Pendle, D. F. Webster and S. M. Lang (1988). "Comparison of the effects of moist and dry conditions on dermal repair." J Invest Dermatol **91**(5): 434-439.

Eberlin, K. R., K. Busa, D. S. Bae, P. M. Waters, B. I. Labow and A. H. Taghinia (2015). "Composite grafting for pediatric fingertip injuries." Hand (N Y) **10**(1): 28-33.

Ehrlich, H. P., A. Desmouliere, R. F. Diegelmann, I. K. Cohen, C. C. Compton, W. L. Garner, Y. Kapanci and G. Gabbiani (1994). "Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar." Am J Pathol **145**(1): 105-113.

Ehrlich, H. P. and T. M. Krummel (1996). "Regulation of wound healing from a connective tissue perspective." Wound Repair Regen **4**(2): 203-210.

Eming, S. A., T. Krieg and J. M. Davidson (2007). "Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms." J Invest Dermatol **127**(3): 514-525.

Erba, P., R. Ogawa, M. Ackermann, A. Adini, L. F. Miele, P. Dastouri, D. Helm, S. J. Mentzer, R. J. D'Amato, G. F. Murphy, M. A. Konerding and D. P. Orgill (2011). "Angiogenesis in wounds treated by microdeformational wound therapy." Ann Surg **253**(2): 402-409.

Eryilmaz, T., A. T. Tellioglu, H. R. Ozakpinar, H. F. Oktem, T. Sen, A. Albayrak and M. Alper (2013). "Correction of hyperpigmented palmar grafts with full-thickness skin grafts from the lateral aspect of the foot." J Plast Surg Hand Surg **47**(5): 405-408.

Estes, J. M., N. S. Adzick, M. R. Harrison, M. T. Longaker and R. Stern (1993). "Hyaluronate metabolism undergoes an ontogenic transition during fetal development: implications for scar-free wound healing." J Pediatr Surg **28**(10): 1227-1231.

Evans, D. M. and C. Bernardis (2000). "A new classification for fingertip injuries." J Hand Surg Br **25**(1): 58-60.

Evans, N. D., R. O. Oreffo, E. Healy, P. J. Thurner and Y. H. Man (2013). "Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche." J Mech Behav Biomed Mater **28**: 397-409.

Fassler, P. R. (1996). "Fingertip Injuries: Evaluation and Treatment." J Am Acad Orthop Surg **4**(1): 84-92.

Ferguson, M. W. and S. O'Kane (2004). "Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **359**(1445): 839-850.

Ferguson, M. W., D. J. Whitby, M. Shah, J. Armstrong, J. W. Siebert and M. T. Longaker (1996). "Scar formation: the spectral nature of fetal and adult wound repair." Plast Reconstr Surg **97**(4): 854-860.

Ferrara, N., H. P. Gerber and J. LeCouter (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-676.

Fleckman, P. and C. Allan (2001). "Surgical anatomy of the nail unit." Dermatol Surg **27**(3): 257-260.

Forrest, L. (1983). "Current concepts in soft connective tissue wound healing." Br J Surg **70**(3): 133-140.

Foucher, G. and R. W. Norris (1992). "Distal and very distal digital replantations." Br J Plast Surg **45**(3): 199-203.

Franz, M. G., D. L. Steed and M. C. Robson (2007). "Optimizing healing of the acute wound by minimizing complications." Curr Probl Surg **44**(11): 691-763.

Friedman, D. W., C. D. Boyd, J. W. Mackenzie, P. Norton, R. M. Olson and S. B. Deak (1993). "Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars." J Surg Res **55**(2): 214-222.

Gale, N. W. and G. D. Yancopoulos (1999). "Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development." Genes Dev **13**(9): 1055-1066.

Ghahary, A., Y. J. Shen, B. Nedelec, R. Wang, P. G. Scott and E. E. Tredget (1996). "Collagenase production is lower in post-burn hypertrophic scar fibroblasts than in normal fibroblasts and is reduced by insulin-like growth factor-1." J Invest Dermatol **106**(3): 476-481.

Gnecchi, M., Z. Zhang, A. Ni and V. J. Dzau (2008). "Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy." Circ Res **103**(11): 1204-1219.

Goldman, R. (2004). "Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future." Adv Skin Wound Care **17**(1): 24-35.

Gordillo, G. M. and C. K. Sen (2003). "Revisiting the essential role of oxygen in wound healing." Am J Surg **186**(3): 259-263.

Gray, A. J., J. E. Bishop, J. T. Reeves and G. J. Laurent (1993). "A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts." J Cell Sci **104 (Pt 2)**: 409-413.

Grayson, L. S., J. F. Hansbrough, R. L. Zapata-Sirvent, C. A. Dore, J. L. Morgan and M. A. Nicolson (1993). "Quantitation of cytokine levels in skin graft donor site wound fluid." Burns **19**(5): 401-405.

Grayson, W. L., F. Zhao, B. Bunnell and T. Ma (2007). "Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells." Biochem Biophys Res Commun **358**(3): 948-953.

Greaves, N. S., K. J. Ashcroft, M. Baguneid and A. Bayat (2013). "Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing." J Dermatol Sci **72**(3): 206-217.

Gregory, H., C. Heitmann and G. Germann (2007). "The evolution and refinements of the distally based dorsal metacarpal artery (DMCA) flaps." J Plast Reconstr Aesthet Surg **60**(7): 731-739.

Greiling, D. and R. A. Clark (1997). "Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix." J Cell Sci **110 (Pt 7)**: 861-870.

Grinnell, F. (2003). "Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices." Trends Cell Biol **13**(5): 264-269.

Grose, R. and S. Werner (2004). "Wound-healing studies in transgenic and knockout mice." Mol Biotechnol **28**(2): 147-166.

Guo, S. and L. A. Dipietro (2010). "Factors affecting wound healing." J Dent Res **89**(3): 219-229.

Gurdin, M. and W. J. Pangman (1950). "The repair of surface defects of fingers by trans-digital flaps." Plast Reconstr Surg (1946) **5**(4): 368-371.

Gurtner, G. C., S. Werner, Y. Barrandon and M. T. Longaker (2008). "Wound repair and regeneration." Nature **453**(7193): 314-321.

Ha, N. B., A. C. Chang, J. S. Sullivan and D. T. Leonello (2015). "Non-operative management of fingertip injuries with an intravenous dressing." J Wound Care **24**(6): 276, 278-279.

Hassan, W. U., U. Greiser and W. Wang (2014). "Role of adipose-derived stem cells in wound healing." Wound Repair Regen **22**(3): 313-325.

Hattori, Y., K. Doi, K. Ikeda, Y. Abe and V. Dhawan (2003). "Significance of venous anastomosis in fingertip replantation." Plast Reconstr Surg **111**(3): 1151-1158.

Hattori, Y., K. Doi, S. Sakamoto, H. Yamasaki, A. Wahegaonkar and A. Addosooki (2007). "Fingertip replantation." J Hand Surg Am **32**(4): 548-555.

Hauck, R. M., L. Camp, H. P. Ehrlich, G. C. Sagers, D. R. Banducci and W. P. Graham (2004). "Pulp nonfiction: microscopic anatomy of the digital pulp space." Plast Reconstr Surg **113**(2): 536-539.

Heldin, C. H. and B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." Physiol Rev **79**(4): 1283-1316.

Henry, G. and W. L. Garner (2003). "Inflammatory mediators in wound healing." Surg Clin North Am **83**(3): 483-507.

Hinman, C. D. and H. Maibach (1963). "Effect of Air Exposure and Occlusion on Experimental Human Skin Wounds." Nature **200**: 377-378.

Hoigne, D., U. Hug, M. Schurch, M. Meoli and U. von Wartburg (2014). "Semi-occlusive dressing for the treatment of fingertip amputations with exposed bone: quantity and quality of soft-tissue regeneration." J Hand Surg Eur Vol **39**(5): 505-509.

Hsu, M., Z. M. Peled, G. S. Chin, W. Liu and M. T. Longaker (2001). "Ontogeny of expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1), TGF-beta 3, and TGF-beta receptors I and II in fetal rat fibroblasts and skin." Plast Reconstr Surg **107**(7): 1787-1794; discussion 1795-1786.

Hunt, T. K. and H. W. Hopf (1997). "Wound healing and wound infection. What surgeons and anesthesiologists can do." Surg Clin North Am **77**(3): 587-606.

Ishikawa, K., Y. Ogawa, H. Soeda and Y. Yoshida (1990). "A new classification of the amputation level for the distal part of the finger ." J Jpn Soc Microsurg **3**: 54-62.

Ito, M., Y. Liu, Z. Yang, J. Nguyen, F. Liang, R. J. Morris and G. Cotsarelis (2005). "Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis." Nat Med **11**(12): 1351-1354.

Jafari, P., C. Muller, A. Grognez, L. A. Applegate, W. Raffoul, P. G. di Summa and S. Durand (2017). "First Insights into Human Fingertip Regeneration by Echo-Doppler Imaging and Wound Microenvironment Assessment." Int J Mol Sci **18**(5).

Kanazawa, S., T. Fujiwara, S. Matsuzaki, K. Shingaki, M. Taniguchi, S. Miyata, M. Tohyama, Y. Sakai, K. Yano, K. Hosokawa and T. Kubo (2010). "bFGF regulates PI3-

kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing." PLoS One **5**(8): e12228.

Katz, M. H., A. F. Alvarez, R. S. Kirsner, W. H. Eaglstein and V. Falanga (1991). "Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth." J Am Acad Dermatol **25**(6 Pt 1): 1054-1058.

Ke, N., X. Wang, X. Xu and Y. A. Abassi (2011). "The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability." Methods Mol Biol **740**: 33-43.

Kennedy, C. I., R. F. Diegelmann, J. H. Haynes and D. R. Yager (2000). "Proinflammatory cytokines differentially regulate hyaluronan synthase isoforms in fetal and adult fibroblasts." J Pediatr Surg **35**(6): 874-879.

Kilinc, H., O. Sensoz, R. Ozdemir, R. E. Unlu and C. Baran (2001). "Which dressing for split-thickness skin graft donor sites?" Ann Plast Surg **46**(4): 409-414.

Kindzierski, V. (2012). "External Stimulation of Differentiated and Undifferentiated Cells in vitro." Technical University Munich.

Kisch, T., J. M. Klemens, K. Hofmann, E. Liodaki, M. Gierloff, D. Moellmeier, F. Stang, P. Mailaender, J. Habermann and M. Brandenburger (2015). "Collection of Wound Exudate From Human Digit Tip Amputations Does Not Impair Regenerative Healing: A Randomized Trial." Medicine (Baltimore) **94**(41): e1764.

Ksander, G. A., B. M. Pratt, P. Desilets-Avis, C. O. Gerhardt and J. M. McPherson (1990). "Inhibition of connective tissue formation in dermal wounds covered with synthetic, moisture vapor-permeable dressings and its reversal by transforming growth factor-beta." J Invest Dermatol **95**(2): 195-201.

Ku, P. T. and P. A. D'Amore (1995). "Regulation of basic fibroblast growth factor (bFGF) gene and protein expression following its release from sublethally injured endothelial cells." J Cell Biochem **58**(3): 328-343.

Kurkinen, M., A. Vaheri, P. J. Roberts and S. Stenman (1980). "Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue." Lab Invest **43**(1): 47-51.

Kutler, W. (1947). "A new method for finger tip amputation." J Am Med Assoc **133**(1): 29.

Landriscina, A., J. Rosen and A. J. Friedman (2015). "Systematic Approach to Wound Dressings." J Drugs Dermatol **14**(7): 740-744.

Laschke, M. W., Y. Harder, M. Amon, I. Martin, J. Farhadi, A. Ring, N. Torio-Padron, R. Schramm, M. Rucker, D. Junker, J. M. Haufel, C. Carvalho, M. Heberer, G. Germann, B. Vollmar and M. D. Menger (2006). "Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes." Tissue Eng **12**(8): 2093-2104.

Lau, K., R. Paus, S. Tiede, P. Day and A. Bayat (2009). "Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing." Exp Dermatol **18**(11): 921-933.

Laverdet, B., L. Micallef, C. Lebreton, J. Mollard, J. J. Lataillade, B. Coulomb and A. Desmouliere (2014). "Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration." Pathol Biol (Paris) **62**(2): 108-117.

Lemmon, J. A., J. E. Janis and R. J. Rohrich (2008). "Soft-tissue injuries of the fingertip: methods of evaluation and treatment. An algorithmic approach." Plast Reconstr Surg **122**(3): 105e-117e.

Lingen, M. W. (2001). "Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing." Arch Pathol Lab Med **125**(1): 67-71.

Liu, L., Q. Yu, J. Lin, X. Lai, W. Cao, K. Du, Y. Wang, K. Wu, Y. Hu, L. Zhang, H. Xiao, Y. Duan and H. Huang (2011). "Hypoxia-inducible factor-1alpha is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood." Stem Cells Dev **20**(11): 1961-1971.

Lo, D. D., A. S. Zimmermann, A. Nauta, M. T. Longaker and H. P. Lorenz (2012). "Scarless fetal skin wound healing update." Birth Defects Res C Embryo Today **96**(3): 237-247.

Longaker, M. T., D. J. Whitby, N. S. Adzick, T. M. Crombleholme, J. C. Langer, B. W. Duncan, S. M. Bradley, R. Stern, M. W. Ferguson and M. R. Harrison (1990). "Studies in fetal wound healing, VI. Second and early third trimester fetal wounds demonstrate

rapid collagen deposition without scar formation." J Pediatr Surg **25**(1): 63-68; discussion 68-69.

Longaker, M. T., D. J. Whitby, R. W. Jennings, B. W. Duncan, M. W. Ferguson, M. R. Harrison and N. S. Adzick (1991). "Fetal diaphragmatic wounds heal with scar formation." J Surg Res **50**(4): 375-385.

Lorenz, H. P., M. T. Longaker, L. A. Perkocha, R. W. Jennings, M. R. Harrison and N. S. Adzick (1992). "Scarless wound repair: a human fetal skin model." Development **114**(1): 253-259.

Lovvorn, H. N., 3rd, D. T. Cheung, M. E. Nimni, N. Perelman, J. M. Estes and N. S. Adzick (1999). "Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair." J Pediatr Surg **34**(1): 218-223.

Macht, S. D. and H. K. Watson (1980). "The Moberg volar advancement flap for digital reconstruction." J Hand Surg Am **5**(4): 372-376.

Madden, M. R., E. Nolan, J. L. Finkelstein, R. W. Yurt, J. Smeland, C. W. Goodwin, J. Hefton and L. Staiano-Coico (1989). "Comparison of an occlusive and a semi-occlusive dressing and the effect of the wound exudate upon keratinocyte proliferation." J Trauma **29**(7): 924-930; discussion 930-921.

Martin, C. and J. Gonzalez del Pino (1998). "Controversies in the treatment of fingertip amputations. Conservative versus surgical reconstruction." Clin Orthop Relat Res(353): 63-73.

Mast, B. A., C. T. Albanese and S. Kapadia (1998). "Tissue repair in the fetal intestinal tract occurs with adhesions, fibrosis, and neovascularization." Ann Plast Surg **41**(2): 140-144; discussion 144-147.

Maxson, S., E. A. Lopez, D. Yoo, A. Danilkovitch-Miagkova and M. A. Leroux (2012). "Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair." Stem Cells Transl Med **1**(2): 142-149.

Megerle, K., K. Palm-Broking and G. Germann (2008). "Der Crossfingerlappen." Oper Orthop Traumatol **20**(2): 97-102.

Mennen, U. and A. Wiese (1993). "Fingertip injuries management with semi-occlusive dressing." J Hand Surg Br **18**(4): 416-422.

Meyer-Marcotty, M. V., S. Kall and P. M. Vogt (2007). "Neurovaskuläre Lappen zur Rekonstruktion von Fingerendglieddefekten." Unfallchirurg **110**(5): 433-446.

Moberg, E. (1964). "Aspects of Sensation in Reconstructive Surgery of the Upper Extremity." J Bone Joint Surg Am **46**: 817-825.

Muhldorfer-Fodor, M., B. Hohendorff, K. P. Vorderwinkler, J. van Schoonhoven and K. J. Prommersberger (2013). "Treatment of fingertip defect injuries with a semioclusive dressing according to Mennen and Wiese." Oper Orthop Traumatol **25**(1): 104-114.

Murai, M., H. K. Lau, B. P. Pereira and R. W. Pho (1997). "A cadaver study on volume and surface area of the fingertip." J Hand Surg Am **22**(5): 935-941.

Naitoh, M., N. Hosokawa, H. Kubota, T. Tanaka, H. Shirane, M. Sawada, Y. Nishimura and K. Nagata (2001). "Upregulation of HSP47 and collagen type III in the dermal fibrotic disease, keloid." Biochem Biophys Res Commun **280**(5): 1316-1322.

Namazi, M. R., M. K. Fallahzadeh and R. A. Schwartz (2011). "Strategies for prevention of scars: what can we learn from fetal skin?" Int J Dermatol **50**(1): 85-93.

O'Shaughnessy, K. D., M. De La Garza, N. K. Roy and T. A. Mustoe (2009). "Homeostasis of the epidermal barrier layer: a theory of how occlusion reduces hypertrophic scarring." Wound Repair Regen **17**(5): 700-708.

O'Toole, E. A., M. P. Marinkovich, C. L. Peavey, M. R. Amieva, H. Furthmayr, T. A. Mustoe and D. T. Woodley (1997). "Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue." J Clin Invest **100**(11): 2881-2891.

Oberringer, M., C. Meins, M. Bubel and T. Pohlemann (2008). "In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model." J Mol Histol **39**(1): 37-47.

Ono, I., H. Gunji, J. Z. Zhang, K. Maruyama and F. Kaneko (1995). "Studies on cytokines related to wound healing in donor site wound fluid." J Dermatol Sci **10**(3): 241-245.

Opalenik, S. R. and J. M. Davidson (2005). "Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair." FASEB J **19**(11): 1561-1563.

Page, B., M. Page and C. Noel (1993). "A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro." Int J Oncol **3**(3): 473-476.

Pajulo, O. T., K. J. Pulkki, K. K. Lertola, M. S. Alanen, M. S. Reunanen, R. V. Virtanen, A. I. Mattila-Vuori and J. A. Viljanto (2001). "Hyaluronic acid in incision wound fluid: a clinical study with the Cellstick device in children." Wound Repair Regen **9**(3): 200-204.

Peterson, S. L., E. L. Peterson and M. J. Wheatley (2014). "Management of fingertip amputations." J Hand Surg Am **39**(10): 2093-2101.

Pierce, G. F., T. A. Mustoe, B. W. Altmann, T. F. Deuel and A. Thomason (1991). "Role of platelet-derived growth factor in wound healing." J Cell Biochem **45**(4): 319-326.

Pinsolle, V., L. R. Salmi, D. M. Evans, P. Michel and P. Pelissier (2007). "Reliability of the pulp nail bone (PNB) classification for fingertip injuries." J Hand Surg Eur Vol **32**(2): 188-192.

Poss, K. D. (2010). "Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals." Nat Rev Genet **11**(10): 710-722.

Pricolo, V. E., M. D. Caldwell, B. Mastrofrancesco and C. D. Mills (1990). "Modulatory activities of wound fluid on fibroblast proliferation and collagen synthesis." J Surg Res **48**(6): 534-538.

Quell, M., T. Neubauer and M. Wagner (1998). "Die Behandlung von Fingerkuppeldefektverletzungen mit einem semiokklusiven Verband." Handchir Mikrochir Plast Chir **30**(1): 24-29.

Rampersad, S. N. (2012). "Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays." Sensors (Basel) **12**(9): 12347-12360.

Rehman, J., D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine and K. L. March (2004). "Secretion of

angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells." Circulation **109**(10): 1292-1298.

Rinkevich, Y., P. Lindau, H. Ueno, M. T. Longaker and I. L. Weissman (2011). "Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip." Nature **476**(7361): 409-413.

Rinkevich, Y., G. G. Walmsley, M. S. Hu, Z. N. Maan, A. M. Newman, M. Drukker, M. Januszyk, G. W. Krampitz, G. C. Gurtner, H. P. Lorenz, I. L. Weissman and M. T. Longaker (2015). "Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential." Science **348**(6232): aaa2151.

Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.

Robson, M. C., D. A. Dubay, X. Wang and M. G. Franz (2004). "Effect of cytokine growth factors on the prevention of acute wound failure." Wound Repair Regen **12**(1): 38-43.

Rubina, K., N. Kalinina, A. Efimenko, T. Lopatina, V. Melikhova, Z. Tsokolaeva, V. Sysoeva, V. Tkachuk and Y. Parfyonova (2009). "Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation." Tissue Eng Part A **15**(8): 2039-2050.

Satish, L. and S. Kathju (2010). "Cellular and Molecular Characteristics of Scarless versus Fibrotic Wound Healing." Dermatol Res Pract **2010**: 790234.

Scheid, A., R. H. Wenger, L. Schaffer, I. Camenisch, O. Distler, A. Ferenc, H. Cristina, H. E. Ryan, R. S. Johnson, K. F. Wagner, U. G. Stauffer, C. Bauer, M. Gassmann and M. Meuli (2002). "Physiologically low oxygen concentrations in fetal skin regulate hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor-beta3." FASEB J **16**(3): 411-413.

Schilling, J. A. (1976). "Wound healing." Surg Clin North Am **56**(4): 859-874.

Schneider, S., M. Unger, M. van Griensven and E. R. Balmayor (2017). "Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine." Eur J Med Res **22**(1): 17.

Seah, B. Z., C. C. Wu, S. J. Sebastin and A. Lahiri (2013). "Tactile sensibility on the fingernail." J Hand Surg Am **38**(11): 2159-2163.

Shah, M., D. M. Foreman and M. W. Ferguson (1994). "Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents." J Cell Sci **107 (Pt 5)**: 1137-1157.

Shah, M., D. M. Foreman and M. W. Ferguson (1995). "Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring." J Cell Sci **108 (Pt 3)**: 985-1002.

Singer, A. J. and R. A. Clark (1999). "Cutaneous wound healing." N Engl J Med **341**(10): 738-746.

Slemp, A. E. and R. E. Kirschner (2006). "Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management." Curr Opin Pediatr **18**(4): 396-402.

Smith, A. N., E. Willis, V. T. Chan, L. A. Muffley, F. F. Isik, N. S. Gibran and A. M. Hocking (2010). "Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury." Exp Cell Res **316**(1): 48-54.

Soderberg, T., A. Nystrom, G. Hallmans and J. Hulten (1983). "Treatment of fingertip amputations with bone exposure. A comparative study between surgical and conservative treatment methods." Scand J Plast Reconstr Surg **17**(2): 147-152.

Tamai, S. (1982). "Twenty years' experience of limb replantation--review of 293 upper extremity replants." J Hand Surg Am **7**(6): 549-556.

Teller, P. and T. K. White (2009). "The physiology of wound healing: injury through maturation." Surg Clin North Am **89**(3): 599-610.

Thangarajah, H., I. N. Vial, E. Chang, S. El-Ftesi, M. Januszyk, E. I. Chang, J. Paterno, E. Neofytou, M. T. Longaker and G. C. Gurtner (2009). "IFATS collection: Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia." Stem Cells **27**(1): 266-274.

Tos, P., P. Titolo, N. L. Chirila, F. Catalano and S. Artiaco (2012). "Surgical treatment of acute fingernail injuries." J Orthop Traumatol **13**(2): 57-62.

Uraloglu, M., M. Livaoglu, O. Agdogan, S. Mungan, E. Alhan and N. Karacal (2014). "An evaluation of five different dressing materials on split-thickness skin graft donor site and full-thickness cutaneous wounds: an experimental study." Int Wound J **11**(1): 85-92.

van den Broek, L. J., W. M. van der Veer, E. H. de Jong, S. Gibbs and F. B. Niessen (2015). "Suppressed inflammatory gene expression during human hypertrophic scar compared to normotrophic scar formation." Exp Dermatol **24**(8): 623-629.

Versteeg, H. H., J. W. Heemskerk, M. Levi and P. H. Reitsma (2013). "New fundamentals in hemostasis." Physiol Rev **93**(1): 327-358.

Vidal, P. and M. G. Dickson (1993). "Regeneration of the distal phalanx. A case report." J Hand Surg Br **18**(2): 230-233.

Vogt, P. M., C. Andree, K. Breuing, P. Y. Liu, J. Slama, G. Helo and E. Eriksson (1995). "Dry, moist, and wet skin wound repair." Ann Plast Surg **34**(5): 493-499; discussion 499-500.

Vogt, P. M., D. Wagner, M. Lehnhardt, F. W. Peter and H. U. Steinau (1997). "Monitoring growth factors during wound healing as the basic principle of effective clinical growth factor therapy?" Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd **114**: 1373-1375.

Voytik-Harbin, S. L., A. O. Brightman, B. Waisner, C. H. Lamar and S. F. Badylak (1998). "Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell growth and survival of fibroblasts." In Vitro Cell Dev Biol Anim **34**(3): 239-246.

Wang, H., X. Wang, J. Qu, Q. Yue, Y. Hu and H. Zhang (2015). "VEGF Enhances the Migration of MSCs in Neural Differentiation by Regulating Focal Adhesion Turnover." J Cell Physiol **230**(11): 2728-2742.

Werner, S. and R. Grose (2003). "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." Physiol Rev **83**(3): 835-870.

Werner, S., T. Krieg and H. Smola (2007). "Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing." J Invest Dermatol **127**(5): 998-1008.

Whitby, D. J. and M. W. Ferguson (1991). "The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice." Development **112**(2): 651-668.

Winter, G. D. (1962). "Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig." Nature **193**: 293-294.

Winter, G. D. and J. T. Scales (1963). "Effect of air drying and dressings on the surface of a wound." Nature **197**: 91-92.

Witte, M. B. and A. Barbul (1997). "General principles of wound healing." Surg Clin North Am **77**(3): 509-528.

Yang, C. C., S. D. Lin and H. S. Yu (1997). "Effect of growth factors on dermal fibroblast contraction in normal skin and hypertrophic scar." J Dermatol Sci **14**(2): 162-169.

Zhang, X., S. Wen, B. Wang, Q. Wang, C. Li and H. Zhu (2008). "Reconstruction of circulation in the fingertip without vein repair in zone I replantation." J Hand Surg Am **33**(9): 1597-1601.

Zook, E. G. (1990). "Anatomy and physiology of the perionychium." Hand Clin **6**(1): 1-7.

Zwanenburg, R. L., P. M. Werker and D. A. McGrouther (2014). "The anatomy and function of Cleland's ligaments." J Hand Surg Eur Vol **39**(5): 482-490.

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

10.1 Abbildungen

Abbildung 1. Phasen der Wundheilung nach (Greaves, Ashcroft et al. 2013) und (Clark 1985)

Abbildung 2. Umwandlung der Matrix im Zuge der Wundheilung nach (Witte and Barbul 1997)

Abbildung 3. Wirkungen von MSC und FB in den Phasen der Wundheilung nach (Maxson, Lopez et al. 2012). FB – Fibroblasten, IL-10/4 – Interleukin 10/4, MMPs – Matrix-Metalloproteinasen, MSC – mesenchymale Stammzellen, PDGF – *platelet-derived growth factor*, TNF – Tumor-Nekrose-Faktor, VEGF – *vascular endothelial growth factor*

Abbildung 4. Anatomie der Fingerkuppe nach (de Alwis 2006) und (Peterson, Peterson et al. 2014). DIP-Gelenk – distales Interphalangealgelenk

Abbildung 5. Arterielle Durchblutung der Fingerkuppe, Ansicht von dorsal nach (Peterson, Peterson et al. 2014)

Abbildung 6. Klassifikation der Fingerkuppenverletzungen nach Allen (Allen 1980)

Abbildung 7. Klassifikation der Fingerkuppenverletzungen nach Fassler (Fassler 1996)

Abbildung 8. Klassifikation der Fingerkuppenverletzungen nach Tamai (Tamai 1982). In Rot – schematische Darstellung der arteriellen Durchblutung.

Abbildung 9. VY-Dehnungslappenplastik nach Atasoy zur Deckung von distalen Fingerkuppenverletzungen nach (Meyer-Marcotty, Kall et al. 2007). DIP Gelenk – distales Interphalangealgelenk

Abbildung 10. Palmare Dehnungslappenplastik nach Moberg zur Deckung von distalen Daumenkuppendifekten nach (Macht and Watson 1980).

Abbildung 11. Anlage des Okklusivverbandes bei Fingerkuppenverletzungen unter Belassung eines Reservoirs für die Wundflüssigkeit (in Rot).

Abbildung 12. Versorgung einer akuten Fingerkuppenverletzung am kleinen Finger links mit einem Okklusivverband. Links: frische Verletzung, rechts: Ansicht von ulnar mit angelegtem Okklusivverband

Abbildung 13. Schutzverband über dem angelegten Okklusivverband bei frischen Fingerkuppenverletzungen.

Abbildung 14. Anlage des Okklusivverbandes auf Spalthautentnahmestellen. In Rot – Fläche unter der Folie, wo sich Wundsekret sammelt.

Abbildung 15. Schematische Darstellung des *Alamarblue*-Assays. AB – Alamarblue Flüssigkeit.

Abbildung 16. Zeitverlauf der Zellmigration mesenchymaler Stammzellen (MSC) unter dem Einfluss von Wundflüssigkeiten (WF) und Blutsera.

Alle Gruppen angegeben in $\bar{x} \pm SEM$.

* $p < 0,05$ \bar{x} Fingerkuppen-WF vs. \bar{x} Fingerkuppen-Sera.

+ $p < 0,05$ \bar{x} Spalthaut-WF vs. \bar{x} Spalthaut-Sera.

$p < 0,01$, Ω $p < 0,05$ \bar{x} WF vs. \bar{x} Sera

Abbildung 17. Zeitverlauf der HS27-FB-Migration unter dem Einfluss von okklusiven Wundflüssigkeiten (WF) und korrespondierenden Blutsera.

Alle Gruppen angegeben in $\bar{x} \pm SEM$.

* $p < 0,05$ \bar{x} Fingerkuppen-WF vs. \bar{x} Fingerkuppen-Sera. Ω $p < 0,01$ \bar{x} WF vs. \bar{x} Sera

Abbildung 18. Zeitverlauf der MSC-Proliferation unter dem Einfluss von okklusiven Wundflüssigkeiten (WF) und korrespondierenden Blutsera.

Alle Gruppen angegeben in $\bar{x} \pm SEM$.

Abbildung 19. Zeitverlauf der HS27-FB-Proliferation unter dem Einfluss von okklusiv behandelten Wundflüssigkeiten (WF) und korrespondierenden Blutsera.

Alle Gruppen angegeben in $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

* $p < 0,05$ \bar{x} Fingerkuppen-WF vs. \bar{x} Fingerkuppen-Sera.

Ω $p < 0,05$ \bar{x} WF vs. \bar{x} Sera

Abbildung 20. MSC- und HS27-FB-Proliferation nach einer 72-stündigen Inkubation mit okklusiv behandelten Wundflüssigkeiten (WF) und korrespondierenden Blutsera.

Alle Gruppen angegeben in $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

* $p < 0,05$ \bar{x} Fingerkuppen-Wundflüssigkeiten (WF) vs. \bar{x} Fingerkuppen-Sera.

Ω $p < 0,05$ \bar{x} aller Wundflüssigkeiten vs. \bar{x} aller Sera.

10.2 Tabellen

Tabelle 1. Wachstumsfaktoren in der Wundheilung (Auswahl) nach (Singer and Clark 1999). aFGF – *acidic fibroblast growth factor*, bFGF – *basic fibroblast growth factor*, KGF – *keratinocyte growth factor*, EGF – *epidermal growth factor*, FB – Fibroblasten, TGF- α – *transforming growth factor α* , TGF- $\beta 1$ – $\beta 3$ – *transforming growth factor $\beta 1$ – $\beta 3$* , TNF- α – *tumor necrosis factor α* , VEGF – *vascular endothelial growth factor*, PDGF – *platelet-derived growth factor*, IGF-1 – *insulin-like growth factor 1*

Tabelle 2. Zusammenfassung der Effekte einer feuchten Wundbehandlung (Auswahl)

11 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer Professor Hans-Günther Machens, der mir das Projekt ermöglicht und mich in meiner Ausbildung zum Arzt und Wissenschaftler immer unterstützt hat. Danken möchte ich auch besonders meinem Mentor Doktor Holger Erne für sein tatkräftiges Engagement und die fachmännische Betreuung meiner Arbeit. Dr. Erne vertiefte zusätzlich mein Interesse am Fach der Handchirurgie, indem er mich im klinischen Alltag sowie auf Kongressen auf die Feinheiten und Spezialgebiete dieses Faches hinwies und mich kontinuierlich förderte.

Mein Dank gilt insbesondere auch Ursula Hopfner und Manuela Kirsch, die jederzeit bei Fragen im und um das Labor für mich da waren.