



Technische Universität München

Experimentelle Plastische Chirurgie

Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie

**Untersuchung des Einflusses des Wund-Microenvironments auf
Viabilität und Metabolismus mesenchymaler Stammzellen und
peripherer Blutzellen**

Lilit Mirzoyan

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Arndt F. Schilling
2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 11.02.2019 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.11.2019
angenommen.

I Inhaltsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1 Einleitung	1
1.1 Die physiologische Wundheilung	1
1.2 Die gestörte Wundheilung.....	6
1.3 Das Microenvironment einer Wunde und dessen Auswirkungen auf die Wundheilung	8
2 Fragestellung	12
3 Material und Methoden	14
3.1 Material	14
3.1.1 Geräte	14
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	15
3.1.3 Chemikalien	15
3.1.4 Lösungen	16
3.2 Methoden	16
3.2.1 Isolation mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe	16
3.2.2 Isolation peripherer Blutzellen.....	17
3.2.3 Sauerstoffmessungen	18
3.2.4 Analysemethoden: Bestimmung der Zellviabilität/ Zellüberleben.....	21
3.2.5 Hypoxie versus Normoxie	23
3.2.6 Einfluss von Temperaturunterschieden und Hypoxie.....	23
3.2.7 Bestimmung der Angiogenesefaktoren mittels Elisa	24
3.3 Statistik.....	25
4 Ergebnisse.....	26
4.1 Einfluss von Wund-Umgebungsparametern auf das Überleben und die Stoffwechselaktivität mesenchymaler Stammzellen	26
4.1.1 Einfluss von Hypoxie auf die Viabilität mesenchymaler Stammzellen	26

4.1.2 Einfluss von Temperatur und Hypoxie auf die Viabilität mesenchymaler Stammzellen	28
4.2 Einfluss von relativer Zellkonzentration auf O ₂ -Homöostase	32
4.3 Die Auswirkungen einer perizellulären Hypoxie auf Bildung von Angiogenesefaktoren durch periphere Blutzellen (PBZ)	33
4.4 Vergleich zwischen zellinduzierter vs. extern kontrollierter Hypoxie auf die Angiogenesefaktor-Produktion	37
5 Diskussion	39
5.1 Vitalität und Überlebensfähigkeit mesenchymaler Stammzellen unter Wundbedingungen	39
5.1.1 Hypoxie versus Normoxie	39
5.1.2 Auswirkungen niedriger Temperaturen auf Metabolismus und Überleben mesenchymaler Stammzellen	41
5.2 Ausbildung einer perizellulären Hypoxie ohne Hypoxieinkubator und Auswirkungen auf die Bildung von Angiogenesefaktoren	45
5.2.1 Die Auswahl einer hohen BVUA führt zur Entstehung einer perizellulären Hypoxie und vermehrter Produktion von Angiogenesefaktoren	45
5.2.2 Eine zellinduzierte Hypoxie ist vergleichbar mit einer extern-kontrollierten Hypoxie	50
5.3 Überblick und mögliche therapeutische Anwendungen einer hypoxischen Präkonditionierung	52
6 Zusammenfassung	56
7 Literaturverzeichnis	58
8 Danksagung	65
9 Anlagen	66

Verzeichnis der verwendeten Abbildungen

- Abb. 1 Stadien der Wundheilung
- Abb. 2 Einfluss der Wund-Umgebungsparameter auf zelluläre Viabilität und Funktion
- Abb. 3 Verschiedene Phasen nach Zentrifugation von Vollblut
- Abb. 4 Schema zur Erläuterung der BVUA (blood volume per unit area)
- Abb. 5 Schematische Darstellung der Messzeitpunkte für das O₂-Monitoring
- Abb. 6 Live-Dead-Staining und Zählung vitaler und avitaler Zellen
- Abb. 7 Viabilitäts-Assays der MSC's mittels WST-1-Assay und LDH-Release
- Abb. 8 Live-Dead-Staining und Zellzählung von MSC's mit Temperaturunterschieden
- Abb. 9 Viabilitäts-Assays mesenchymaler Stammzellen unter Temperaturexposition
- Abb. 10 Sauerstoff-Monitoring in Vollblutkulturen mit unterschiedlicher BVUA
- Abb. 11 Plasma-VEGF-Konzentrationen der Blutkulturen nach 7 Tagen
- Abb. 12 Zeitverlauf der Plasma-VEGF- und Thrombospondin-1-Konzentrationen
- Abb. 13 Vergleich der Wirkung von zellinduzierter und extern induzierter Hypoxie
- Abb. 14 Schematische Darstellung für die VEGF-Produktion durch hypoxisch präkonditionierte periphere Blutzellen

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BVUA	Blood volume per unit area
Bzw.	Beziehungsweise
cm ²	Quadratcentimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α)
HRE	Hypoxia responsive elements (Hypoxie-responsible Elemente)
LDH	Laktatdehydrogenase
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MSC	Mesenchymale Stammzelle
n	Anzahl
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	Phosphat buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
pg	Pikogramm
pH	potentia hydrogenii
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
TGF- β	Transforming growth factor- β
Tsp-1	Thrombospondin-1

Abkürzungsverzeichnis

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Die physiologische Wundheilung

Eine Wunde ist definiert als eine Störung der normalen anatomischen Struktur und der Funktion eines Gewebes [1]. Um die anatomische Kontinuität und die Funktion des Gewebes wiederherzustellen wird der Prozess der Wundheilung eingeleitet.

Im Folgenden soll zunächst der physiologische Ablauf der Wundheilung dargestellt werden. Die normale Wundheilung lässt sich in vier verschiedene Phasen [2] unterteilen, von denen jede durch charakteristische Vorgänge geprägt ist: die Latenzphase/ Phase der Hämostase [3], die inflammatorische Phase [4], die Proliferationsphase [5] und die Regenerationsphase [6].

Die Abschnitte der Wundheilung werden hier aus Gründen der Übersichtlichkeit voneinander getrennt dargestellt. Da sich im lebenden Organismus die einzelnen Phasen überlappen und die jeweiligen Vorgänge der einzelnen Phasen zur gleichen Zeit stattfinden [6], lassen sich die einzelnen Abschnitte zeitlich nicht immer scharf voneinander abgrenzen.

Die erste Phase wird als Latenzphase oder auch Hämostase-Phase [3] bezeichnet. Durch eine Verletzung intakten Gewebes werden Kapillaren unterbrochen [7] und der Blutfluss somit gestört. Unmittelbar nach der Verletzung eines Gefäßes führen Thromboxan und Prostaglandine zu einer Vasokonstriktion [2] der Gefäße, um einen weiteren Blutverlust zu verhindern. Nach einer fünf- bis zehnminütigen Phase der Vasokonstriktion folgt die Vasodilatation [2], die allen voran durch Histamin ausgelöst wird. Histamin sorgt auch für eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwände, so dass Leukozyten aus den Blutgefäßen leichter in das Wundbett eintreten können. Durch die Verletzung der Gefäßwand kommt Blut in Kontakt mit Kollagen und anderen Strukturen der extrazellulären Matrix, und die Thrombozyten werden aktiviert [8] und aggregieren (siehe Abb. 1).

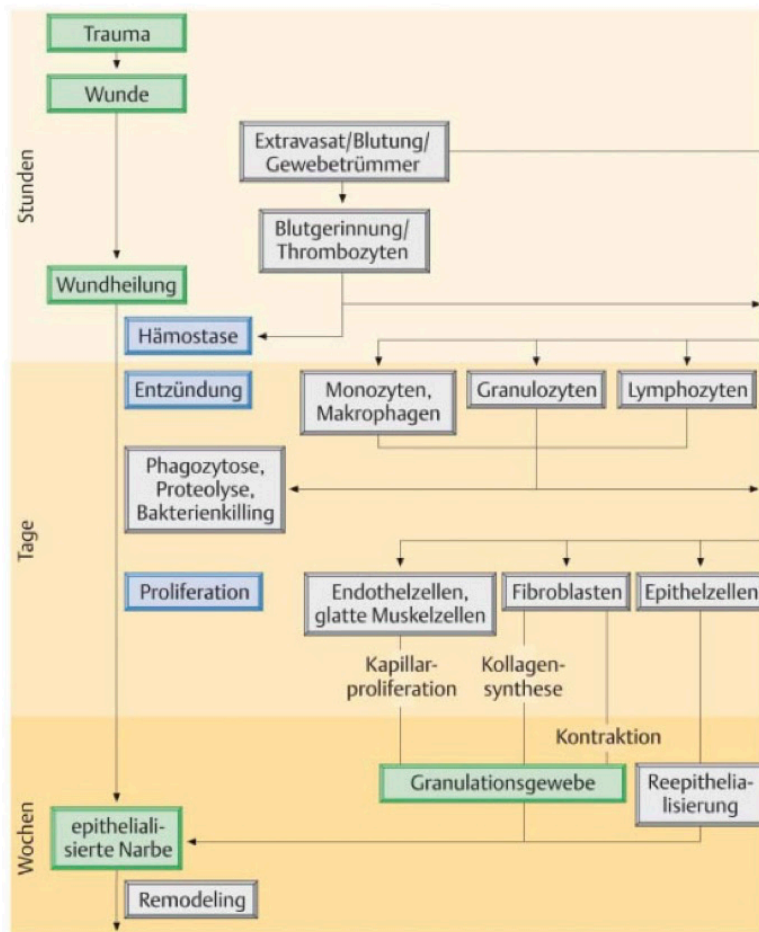


Abbildung 1: Stadien der Wundheilung (modifiziert nach Hirner, A. und Weise, K., Chirurgie, 2. Auflage, 2008, 2.2 Physiologie der Wundheilung) Nach der Wundsetzung kommt infolge einer Gefäßläsion Blut in Kontakt mit Kollagen, hierdurch werden Thrombozyten aktiviert und aggregieren. Durch die Ausschüttung von Chemokinen werden Leukozyten angezogen: Zelldetritus und Bakterien werden von Immunzellen phagozytiert bzw. durch Proteolyse entfernt. In der Proliferationsphase wird Kollagen durch Fibroblasten synthetisiert, und durch neu ausgebildete Blutgefäße vaskularisiert. Während der Remodellingphase erfolgt die Wundkontraktion, die zu einer vermehrten Reißfestigkeit der Wunde führt.

Bei der Thrombozytenaggregation verbinden sich die Blutplättchen miteinander über Glykoproteine an ihrer Zellmembran und verschließen die Wunde provisorisch. Sobald die Gerinnungskaskade in Gang kommt, bildet sich ein stabiles Fibrinnetz [8] aus, welches das zerstörte Blutgefäß verschließen kann. Die Thrombozyten sezernieren darüber hinaus eine Reihe von verschiedenen Proteinen, insbesondere Serotonin, Bradykinin, Prostaglandine, und Thromboxan [4], welche die Zellproliferation anregen und

die Blutgefäße dilatieren und permeabel machen.

Als nächstes folgt die Exsudations- oder auch Inflammationsphase. Durch die Ausschüttung von bestimmten Chemokinen und Zytokinen werden die Zellen des Immunsystems, wie Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten [3], zur verletzten Stelle gelockt (s. Abb. 1). Bereits innerhalb der ersten Stunde nach der Wundsetzung erreichen so neutrophile Granulozyten das Wundbett und phagozytieren dort Bakterien [9, 10] und Zelltrümmer. Sobald die Granulozyten ihre Aufgabe beendet haben, gehen sie durch Apoptose zugrunde und werden von Makrophagen [8] abgeräumt. Es treten jedoch auch weitere Leukozyten in die Wunde ein, um Erreger effizient zu beseitigen. Zum einen finden sich T-Helferzellen [11], die bestimmte Zytokine ausschütten, um andere T-Helferzellen zur Zellteilung anzuregen und um die Gefäßpermeabilität zu erhöhen. Die von Th1-Zellen sezernierten Zytokine aktivieren Makrophagen, die von Th2-Zellen ausgeschütteten Zytokine hingegen aktivieren B-Lymphozyten [11].

Am zweiten Tag nach Entstehen der Wunde werden die neutrophilen Granulozyten dann durch Makrophagen [2] ersetzt. Monozyten können über die Blutbahn in das verletzte Gewebe eintreten und wandeln sich dort zu Makrophagen um [12]. Ihre Hauptfunktion ist das Phagozytieren von Bakterien, Granulozyten und geschädigtem Gewebe [12]. Die Makrophagen besitzen Proteasen, mit deren Hilfe sie das verletzte Gewebe abbauen können. Sie sezernieren außerdem Wachstumsfaktoren sowie Zytokine, um die Proliferationsphase einzuleiten. Auch die Mastzellen spielen eine wichtige Rolle in der inflammatorischen Phase der Wundheilung. Sie setzen ihre Granula frei [12], die mit Enzymen, Histamin und anderen aktiven Aminen gefüllt sind. Diese Stoffe sind für die charakteristischen Entzündungszeichen wie Rötung und Schwellung [12] der Wunde verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass in chronischen Wunden die Infiltration mit Neutrophilen und Monozyten in das Wundbett sehr verzögert ist [13], und eine Infiltration der Wunde mit Lymphozyten zur chronischen Inflammation des Gewebes führt. Somit ist die Reihenfolge, in welcher die inflammatorischen Zellen in das Wundbett gelangen, sowie deren zeitliche und örtliche Verteilung von großer Bedeutung für den Heilungsprozess. Sobald die Inflammationsphase

ihrem Ende zusteuert, nimmt die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und der Makrophagen in der Wunde ab.

Nun kann die nächste Phase der Wundheilung, die Proliferationsphase, beginnen. Durch von Makrophagen sezernierte Faktoren wie beispielsweise PDGF (platelet derived growth factor) und TGF- β (transforming growth factor- β) werden Fibroblasten [14] zum Wundgebiet gelockt. Die Fibroblasten nehmen eine wichtige Rolle während dieser Phase im Wundheilungsprozess ein, da sie Kollagen produzieren [10] und somit maßgeblich an der Bildung einer neuen Extrazellulärmatrix beteiligt sind. Zusammen mit einsprießenden Kapillaren bildet sich ein neues Granulationsgewebe [2] aus. Endothelzellen wandern in die Wunde ein, um die Angiogenese voranzutreiben. Kapillaren sprießen ein und bilden ein neues Kapillarbett, das die Durchblutung verbessert. Die Endothel-Proliferation wird durch Hypoxie und Laktat im Wundgebiet angetrieben [6].

Während der Proliferationsphase bilden die eingewanderten Fibroblasten zunächst Kollagen vom Typ III [8]. So entsteht ein weiches Narbengewebe mit zufälliger Faseranordnung. Später wird dann das Typ III-Kollagen mit dem stabileren Typ I – Kollagen [8] ersetzt. Die höchste Zahl an Fibroblasten findet sich zwischen der ersten und zweiten Woche nach der Wundsetzung. Die Fibroblasten werden durch Wachstumsfaktoren wie PDGF [15], TGF- β [16] und Fibronectin [8] zur Proliferation angeregt. Doch auch die Fibroblasten selbst sezernieren Wachstumsfaktoren zur Aktivierung von Epithelzellen. Das Kollagennetz verspannt die Wunde mit Fasern und stabilisiert sie auf diese Weise. Am Ende der Granulationsphase gehen die Fibroblasten zunehmend durch Apoptose [17] unter, sodass das Granulationsgewebe nun nicht mehr aus Zellen, sondern hauptsächlich noch aus Kollagen besteht. Damit sich die Wunde verkleinern kann, findet in dieser Phase noch eine Wundkontraktion statt. Die Anordnung der Kollagenfibrillen spielt hierbei eine wesentliche Rolle: durch eine Elimination von Wasser nimmt die Dicke der Kollagenfibrillen zu [18]. Durch diese Neuordnung der Kollagenfasern in dem neu entstehenden Granulationsgewebe entsteht eine wesentlich

dichtere Extrazellulärmatrix [18]. Dieser Prozess trägt maßgeblich zur Wundkontraktion und zum Wundverschluss bei. Nach ca. 7 Tagen transformieren die Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese besitzen die gleichen Aktinfilamente, die auch in glatten Muskelzellen zu finden sind. Durch eine Kontraktion dieser Aktinfilamente kommen sich die Wundränder näher. Am Ende der Wundkontraktion gehen auch die Myofibroblasten apoptotisch unter [17].

In der folgenden Regenerations- oder Reparativen Phase erfolgt die Epithelisation, weshalb diese Phase auch Epithelialisierungsphase [19] genannt wird. Diese letzte Phase der Wundheilung beginnt zwischen dem 5. und 10. Tag [6, 7] nach der Wundentstehung. Die Hauptaufgabe dieser Phase der Wundheilung besteht in der Kollagensynthese und in der Entstehung eines geordneten Gewebes [8]. Keratinozyten wandern in das Wundgebiet ein und proliferieren dort. Um in das Gewebe eindringen zu können, sezernieren die Keratinozyten dabei verschiedene Faktoren wie Plasminogenaktivator, das Plasmin aktiviert und den Wundschorf so zersetzt. Die Epithelzellen und Keratinozyten produzieren Kollagenasen [3, 20] und Proteasen um Gewebsschäden der Extrazellulärmatrix zu zersetzen. In dieser Phase wird auch das Typ-III-Kollagen, das in der Granulationsphase vorherrschend war, durch das stabilere Typ-I-Kollagen ersetzt [3, 19]. Die Wunde verspannt sich besser, da sich die Kollagenfasern nun richtig anordnen können. Die dicken und dichten Bündel des Kollagens vom Typ I sind für den Aufbau und die Struktur des neuen Gewebes verantwortlich [10]. Als Ergebnis hat sich das Granulationsgewebe nun in stabiles Narbengewebe umgewandelt. Die maximale Stärke und Spannkraft eines neu entstandenen Narbengewebes beträgt rund 70% der Stärke intakter Haut [6]. Im klinischen Alltag ist diese Phase besonders wichtig, da sich die Wunde in dieser Phase weitgehend schließt [8].

1.2 Die gestörte Wundheilung

Chronische Wunden oder Wunden mit verzögerter Heilung, haben die zuvor beschriebenen vier Stadien der normalen Wundheilung nicht vollständig durchlaufen [19], sodass es zu keiner adäquaten Abheilung des Gewebes gekommen ist. Bei einer derartigen Wundheilungsstörung kommt es zu pathologischen Entzündungszuständen [21], die viel länger andauern [22] können, als es bei der physiologischen Wundheilung der Fall ist. Die Entstehung einer solchen chronifizierten Wunde ist ein multifaktorielles Geschehen, das im klinischen Alltag einer interdisziplinären Therapie bedarf. Im folgenden Abschnitt sollen zunächst einige wichtige Ursachen der Pathogenese chronischer Wunden aufgezeigt werden.

Über 90% aller chronischen Wunden lassen sich äthiologisch 3 Gruppen [23] zuordnen: chronisch venöse Ulzera, diabetische Ulzera und Druckulzera [12]. Bei der Entstehung jeder dieser Wundarten ist eine Vielzahl verschiedener Faktoren und Umstände beteiligt, die sich gegenseitig verstärken. Da es aufgrund der multifaktoriellen Entstehung chronischer Wunden [24] sehr schwierig ist, die Auswirkung einzelner Faktoren zu untersuchen, sind viele der im Folgenden festgestellten Erkenntnisse durch die Untersuchung von Wundsekret [3] und der an Wunden beteiligten Zellarten entstanden.

Die an der Entstehung chronischer Wunden beteiligten Ursachen lassen sich in lokale und systemische Faktoren einteilen. Lokale Faktoren [10], wie zum Beispiel durch Bakterien hervorgerufene Wundinfektionen [25, 26], mechanische Gewebsschädigung, Ischämie [23] und Fremdkörper [24] können in erheblichem Ausmaß zur Ausbildung einer chronischen Wunde beitragen. Darüber hinaus gibt es auch systemische Zustände [24], wie etwa chronische Erkrankungen (Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz), Fehl- oder Mangelernährung, Alkoholkonsum und eine Glukokortikoidtherapie, sowie Nikotinabusus, welche die Entstehung einer chronischen Wunde stark begünstigen können.

Dies sind nur einige wenige Beispiele an chronischen Wunden beteiligter Faktoren, die in ihrer Summe zu einer erheblichen Beeinträchtigung der normalen Wundheilung führen können. Im Folgenden werden einige wichtige

Entstehungsmechanismen chronischer Wunden beschrieben, die für diese Arbeit wichtig waren.

Damit eine Wunde die physiologische Heilung, die zuvor beschrieben wurde, durchlaufen kann, sind gewisse Umgebungsparameter und Bedingungen von großer Bedeutung. So kann sich beispielsweise die Sauerstoffkonzentration [23] des verwundeten Gewebes erheblich auf die Funktion und Leistung der im Wundbett vorhandenen Zellen auswirken. Eine relevante Gewebeschämie in einer Wunde führt zur Dysfunktion von neutrophilen Granulozyten [22, 27] und Fibroblasten und somit auch zur verminderten Kollagensynthese [28]. Es konnte gezeigt werden, dass eine ausreichende Durchblutung des Gewebes und eine suffiziente Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen direkt proportional zur Kollagensynthese ist [28].

Abgesehen von der Perfusion und Oxygenierung einer Wunde ist die bakterielle Besiedelung ein weiterer entscheidender Faktor für den Verlauf der Wundheilung [29]. Sowohl oberflächliche, als auch tiefe Wunden sind einer bakteriellen Kolonisation und damit einhergehenden potentiellen Infektionen ausgesetzt [23]. Das menschliche Immunsystem reagiert auf eine bakterielle Besiedelung in Form einer akuten Entzündungsreaktion [26]. Während dieser inflammatorischen Reaktion werden neutrophile Granulozyten angelockt, die ihrerseits Proteasen freisetzen, die nicht nur die extrazelluläre Matrix abbauen, sondern auch die im Wundbett vorhandenen Zellen schädigen [10, 13]. Durch die Zersetzung der Extrazellulärmatrix wird auch die Epithelialisierung der Wunde erheblich verzögert [23, 25]. Das Vorhandensein eines Biofilmes auf einer Wunde schützt die bakteriellen Erreger vor der Immunantwort des Wirtsorganismus [25].

Einen weiteren wichtigen Punkt bei schlecht heilenden Wunden stellt oftmals das Rauchen dar [10]. Der Nikotinkonsum führt in vielen Fällen zu Komplikationen der Wundheilung. Nikotin selbst ist ein potenter Vasokonstriktor, der zu einer lokalen Ischämie des Wundgewebes führt [19]. Die Folgen der Ischämie auf das Gewebe und die Wundheilung wurden bereits früher beschrieben. Darüber hinaus führt Nikotinkonsum zu einer

vermehrten Thrombozytenaggregation [10, 19]. Dadurch wird die Entstehung von Thromben begünstigt und somit die Blutzufuhr weiter gedrosselt. Tabak enthält über 4000 verschiedene Inhaltsstoffe, die eine toxische Wirkung auf heilendes Gewebe ausüben können [19]. Kohlenstoffmonoxid (CO) beispielsweise besitzt eine 200-fach höhere Bindungsaffinität zu Hämoglobin im Vergleich zu Sauerstoff [10]. Das durch die Bindung von CO an Hämoglobin entstandene Methämoglobin führt zu einer reduzierten Sauerstoffzufuhr und behindert damit die normale Zellfunktion [19].

1.3 Das Microenvironment einer Wunde und dessen Auswirkungen auf die Wundheilung

Da für das Überleben von Zellen jeder Art grundsätzlich gewisse Voraussetzungen an die Umgebung erfüllt sein müssen, ist es wichtig, diese Bedingungen in der Umgebung einer Wunde genauer zu verstehen. Denn nur aus dem Wissen über das Verhalten der Zellen unter verschiedenen Umgebungsparametern lässt sich eine Aussage über ihr weiteres Überleben treffen.

In ihrem physiologischen Milieu sind menschliche Zellen in einem Zellverband vorhanden. Durch die Wundentstehung wird dieser intakte Zellverband unterbrochen und die Zellen werden verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. Bei der Wundsetzung werden unweigerlich Kapillaren verletzt, sodass es zum Zustand einer Hypoxie kommt.

Sitkowsky et. al [27] haben herausgefunden, dass sich hypoxischer Stress auf verschiedene Weise auf die Funktionalität von Immunzellen auswirkt. Während B-Zellen unter Hypoxie weiterhin Immunglobuline produzieren können, inhibiert Hypoxie scheinbar die T-Zell-gesteuerte Immunantwort.

Pugh et al. [30] beschreiben die Auswirkungen einer Hypoxie auf die Angiogenese, die auch in Wunden eine wichtige Rolle spielt. Zusammengefasst stellt Sauerstoff eine der wichtigsten Determinanten für die Angiogenese dar. Die Auswirkungen einer zellulären Hypoxie werden durch das sogenannte HIF-System [30] vermittelt. Die HIF-1 α -Untereinheiten

werden durch Hypoxie aktiviert, reagieren mit HRE's (hypoxia responsive elements) und entfalten eine Transkriptionsaktivität [31].

Ferrara et al. [32] postulieren, dass der Angiogenesefaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) eine Schlüsselrolle für die Angiogenese spielt. Die Genexpression von VEGF wird durch eine niedrige Sauerstoffkonzentration induziert [33]. Ferrara et al. zeigen auf, dass in zahlreichen in vivo-Studien festgestellt werden konnte, dass VEGF das Wachstum von Endothelzellen und somit die Gefäßneubildung stimuliert. Daneben besitzt VEGF mit seinen unterschiedlichen Isoformen auch andere Funktionen. Die Isoform VEGFA ist vor allem für die Angiogenese verantwortlich. VEGFC und VEGFD steuern vor allem die lymphatische Angiogenese. Die VEGF-Familie koordiniert und fördert somit in erheblichem Ausmaß die Ausbildung der verschiedenen anatomischen Komponenten des Gefäßsystems sowohl in physiologischen, als auch in pathologischen Zuständen [32].

Hadjipanayi et al. [34] legen dar, dass eine Hypoxie im Gewebe zu einer ischämie-getriggerten Angiogenese führt. Unterhalb einer bestimmten Sauerstoffkonzentration reagieren die meisten Gewebearten durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1a. Die eintretende Stabilisierung von HIF-1a führt zur Expression verschiedener Angiogenesefaktoren, wie etwa VEGF, PDGFB (platelet-derived growth factor B), Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und Angiopoietin. Laut Hadjipanayi et al. ist das Problem chronischer Wunden, bei denen es sich oftmals um ischämisches Gewebe handelt, eine dauerhafte Exposition einer Hypoxie, während akute Wunden einer Hypoxie zeitlich begrenzt ausgesetzt sind. Den Zellen scheint es somit bei einer dauerhaften Hypoxie-Exposition nicht möglich zu sein, die für eine suffiziente Gewebepfusion und Angiogenese erforderlichen Angiogenesefaktoren (z.B. VEGF) zu produzieren.

Byrne et al. [35] belegen, dass eine perizelluläre Hypoxie bei malignen Tumoren zu einer rascheren Tumorprogression und zum Tumorwachstum führt. Laut Byrne et al. herrscht in Bereichen, in denen sich Tumorzellen unkontrolliert teilen, ein stark hypoxisches Microenvironment vor. Um unter

diesen Bedingungen zu überleben, können sich die Tumorzellen durch die Aktivierung von Onkogenen sowie die gleichzeitige Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen an die hypoxischen Umgebungsbedingungen anpassen und proliferieren. Byrne et al. zeigen auf, dass die Tumorzellen in Reaktion auf eine Hypoxie vermehrt Angiogenesefaktoren, unter anderem VEGF, sezernieren, und damit die Neubildung von Blutgefäßen initiieren. Dies ist ein Beispiel dafür, dass Hypoxie nicht nur im physiologischen Zustand eine wichtige Rolle spielt, sondern auch bei pathologischen Zuständen Einfluss auf das Zellüberleben und die Zellfunktion nimmt.

Darüber hinaus hat ein hypoxisches Microenvironment jedoch auch Auswirkungen auf andere an der Wundheilung beteiligte Zellarten. Mesenchymale Stammzellen nehmen bei der Wundheilung eine zentrale Funktion ein. Die Stammzellen sind in nahezu allen menschlichen Gewebsarten vorhanden und besitzen ein hohes Maß an Regenerationsvermögen und können zu allen Zellarten der mesenchymalen Zelllinie differenzieren [36]. MSC's können sich beispielsweise zu Adipozyten, Chondrozyten oder Osteozyten differenzieren [37]. Für die Wundheilung spielen diese Zellen mit einem hohen Differenzierungspotential eine große Rolle, da sie durch Ausschüttung von Chemokinen die Migration von pro-inflammatorischen Makrophagen in das Wundgebiet bewirken [38]. MSC's fördern zudem die Angiogenese und Neovaskularisierung des geschädigten Gewebes indem sie mit den vorhandenen Endothelzellen interagieren [38]. Die mesenchymalen Stammzellen migrieren zum Wundgebiet und können durch Transdifferenzierung zu verschiedenen Zelltypen der Haut die fehlenden Zellen ersetzen [39]. Die MSC's können laut Sasaki et. al. zu Keratinozyten, Endothelzellen und Perizyten differenzieren [39]. Auch die Interaktion von MSC's und Fibroblasten wurde näher untersucht: dabei zeigte sich, dass bei einer erhöhten MSC-Konzentration die Migration und Proliferation der Fibroblasten durch bestimmte Zytokine gehemmt wurde [40]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anzahl der vorhandenen MSC's im Wundgebiet erhebliche Auswirkungen auf deren Funktion während des Heilungsprozesses hat [40].

Aufgrund ihrer Omnipräsenz können mesenchymale Stammzellen aus verschiedensten Gewebearten wie Knochenmark, Fettgewebe, peripherem Blut, und auch aus Organen wie Herz und Lunge isoliert werden [38].

Valorani et al. stellten fest, dass ein hypoxisches Microenvironment mit O₂-Konzentrationen unter 3% das natürliche Milieu darstellt in dem sich die Stammzellen befinden. Eine hypoxische Umgebung scheint eine wichtige Komponente für die Weiterdifferenzierung der MSC's und für ihr Überleben zu sein. Laut Valorani et al. werden Laborversuche meist unter atmosphärischen O₂-Konzentrationen (21% O₂) durchgeführt. Hierbei wird jedoch nicht berücksichtigt, dass die physiologische Zellenische der Stammzellen stark hypoxisch ist. So zeigten Valorani et al, dass MSC's unter hypoxischen Bedingungen 5-fach höhere Proliferationsraten und eine höhere Viabilität aufwiesen als unter normoxischer Inkubation. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass eine hypoxische Konditionierung der Stammzellen gefolgt von einer normoxischen Inkubation das Differenzierungspotential zu Adipozyten und Osteozyten erhöhte [37].

Fehrer et al. zeigten in Erweiterung zu diesen Ergebnissen, dass eine alleinige Inkubation unter starker Hypoxie zu einer Verminderung des Differenzierungspotentials mesenchymaler Stammzellen führt [41]. Sie zeigten jedoch ebenfalls, dass eine zeitlich begrenzte hypoxische Inkubation gefolgt von normoxischer Inkubation zu einer verbesserten Differenzierung der Stammzellen führte [41].

Anhand dieser Studien wird die Bedeutung der Umgebungsparameter für das Überleben und Differenzierungsvermögen mesenchymaler Stammzellen verdeutlicht.

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, weitere Umgebungsparameter des zellulären Microenvironments und deren Auswirkungen auf Zellüberleben und Zellfunktion zu analysieren. Da an der Wundheilung eine komplexe Interaktion von Zellen und Botenstoffen beteiligt ist, wurde in diesen Versuchen unter Modellbedingungen die jeweilige Zellart isoliert unter dem Einfluss der jeweiligen Umgebungsparameter untersucht.

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss wichtiger Umgebungsbedingungen auf das Überleben mesenchymaler Stammzellen untersucht. Die Auswirkungen einer perizellulären Hypoxie und verschiedenen Temperaturen wurden unter standardisierten Bedingungen erfasst (s. Abb. 2, rechts). Die Auswirkungen dieser in Wunden anzutreffenden, extremen Umgebungsparameter auf die Zellfunktionen wurden über 7 Tage ermittelt.

In den folgenden Versuchen sollte der Einfluss des zellulären Microenvironments anhand einer ebenfalls an der Wundheilung maßgeblich beteiligten Zellart gezeigt werden. Jede Art der Wundheilung ist von einer suffizienten Durchblutung des verletzten Gewebes abhängig. Das Verhalten peripherer Blutzellen auf äußere Stressfaktoren, welche in Wunden vorherrschen, spielt hierbei eine entscheidende Rolle für den nachfolgenden Heilungsprozess. In einer Wunde variiert das Sauerstoffangebot, das den Blutzellen zur Verfügung steht. Zur Veranschaulichung möglicher Zellreaktionen auf ein variables Sauerstoffangebot wollten wir den Sauerstoffverlauf peripherer Blutzellen bei verschiedenen Hypoxie-Stufen darstellen.

Die zugrunde liegende Hypothese lautete, dass der Sauerstoffverbrauch der peripheren Blutzellen mit der Zelldichte korreliert und dass diese sich

unmittelbar auf Produktion und Sekretion pro- und anti-angiogenetischer Steuermoleküle auswirkt (s. Abb. 2, links). Um diese Theorie verifizieren zu können, wurden zeitgleich pro- und anti-angiogenetische Faktoren aus den zellfreien Überständen der jeweiligen Kulturen ermittelt. Wir ermittelten die VEGF-Konzentration aus Vollblutkulturen unter verschiedenen Hypoxie-Graden (siehe Abb. 2, links).

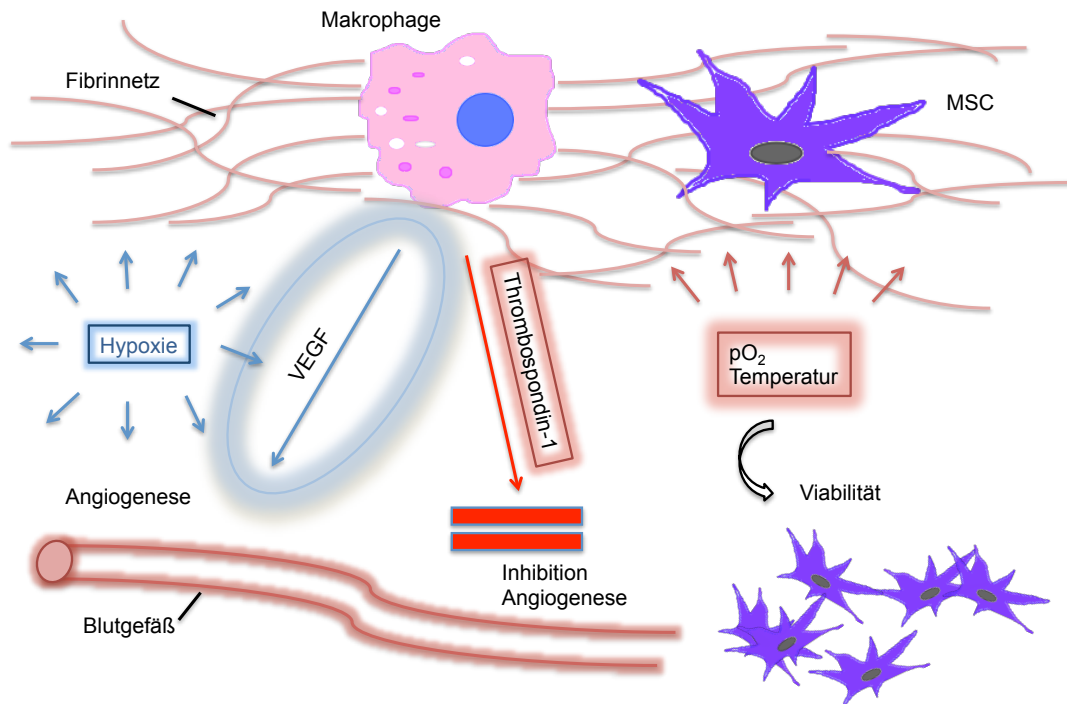


Abbildung 2: Einfluss der Wund-Umgebungsparameter auf zelluläre Viabilität und Funktion. Linke Bildhälfte: Eine perizelluläre Hypoxie beeinflusst die Fähigkeit peripherer Blutzellen, angiogenetische Proteine wie VEGF, sowie anti-angiogenetische Proteine wie Thrombospondin-1 (Tsp-1) zu synthetisieren. Die peripheren Blutzellen wurden einem variierenden Sauerstoffangebot ausgesetzt; die Auswirkungen einer Hypoxie wurden durch die Bildung pro- und anti-angiogenetischer Proteine erfasst.

Rechte Bildhälfte: Das Überleben und die Stoffwechselaktivität mesenchymaler Stammzellen wird maßgeblich vom Microenvironment beeinflusst. Die Effekte der Umgebungsbedingungen wie Temperatur und Sauerstoffangebot wurden hinsichtlich der Stoffwechselprozesse in MSC's untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

2 Laminar Flow Werkbänke (Sicherheitsstufe II)	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
SDR Sensordish® Reader für O ₂ - und pH-Messung online in der Zellkultur	PreSens – Precision Sensing GmbH
Zentrifuge gekühlt für 15/ 50ml Röhrchen, FACS Röhrchen und Zellkulturplatten	Rotanta 460R Hettich Zentrifuge
Minifuge	Eppendorf
Standard CO ₂ -Brutschränke für Zellkultur	Thermo Scientific, Binder
Zellkultur-Brutschrank mit verstellbarer O ₂ Konzentration für Hypoxie [über N ₂ -Zufuhr geregelt]	Thermo Scientific, Binder
Multifunktions- ELISA microplate reader (Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader)	Berthold Technologies
Invertiertes Phasenkontrastmikroskop (Primo Vert)	Zeiss
Invertiertes, motorisiertes Fluoreszenzmikroskop (Observer) mit sensitiver Schwarz-Weiß-Kamera und Software (Axiovision)	Zeiss
Real-Time PCR Cycler	Bio-Rad
Neubauer-Zählkammer 0,1mm Tiefe, 0,0025m ²	Assistent Germany

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Polypropylen-Röhrchen zu 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml 15ml u. 50ml	Eppendorf, Greiner BioOne
Well Platten (6 Wells, 12 Wells, 24 Wells, 96 Wells)	TPP, Greiner BioOne
Pipettenspitzen (20 - 200 µl und 1000 µl)	TipOne
Serologische Pipetten (5, 10, 25 und 50 ml)	Greiner BioOne
Oxodish Reader Platten	PreSens – Precision Sensing GmbH Art.nr.:200000430 (Platten)
96-Well PCR-Platten (200µl)	Bio-Rad, Art.nr.: HSL-9xxx (Low profile semi-skirted)

3.1.3 Chemikalien

PBS w/o Ca ²⁺ & Mg ²⁺	Biochrom Art.nr.: L1825
DMEM Medium with stable L- Glutamine & Phenolred	Biochrom Art.nr.: FG0445
Antibiotikum/ Antimykotikum	PAA Art.nr.: P11-002
FCS [Fetal Bovine Serum Gold, EU approved, heat inactivated]	PAA Art.nr.: A15-152
Quantikine Elisa	R & D Systems
Human VEGF	Art.nr.: DVE00
Human Thrombospondin-1	Art.nr.: DTSP10
LDH (Laktat Dehydrogenase)	Roche
Cytotoxicity Detection Kit	Art.nr.: 11644793001
Cell proliferation Reagent WST-1 (water soluble tetrazolium)	Roche Art.nr.: 11644807001
Live-dead-staining	Invitrogen™, Life Technologies Art.nr.: L-3224
Trypsin-Lösung	Biochrom Art.nr.: L2163

EDTA-Röhrchen (BD Vacutainer BD Diagnostics
EDTA Plus Röhrchen aus PET 10ml, Art.nr.: BD367525
10,8mg K₂ EDTA, lila)

3.1.4 Lösungen

DMEM-Zellkulturmedium: Biochrom (Berlin)
10% FCS, 1% Penicillin/
Streptomycin/ Amphotericin B [Ab/Am]
(Pen/ Strep = Ab, Amph. B = Am)

3.2 Methoden

3.2.1 Isolation mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe

Pluripotente adulte mesenchymale Stammzellen wurden aus flüssigem „surgical waste“ der Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie gewonnen. Zur Vorbereitung der Zellisolation wurde hierfür zunächst eine Kollagenase-Lösung aus 1 mg Kollagenase A (0,1 %) und 1 ml PBS (1 %) angefertigt. Durch die Enzymmischung wurde das Fettgewebe angedaut, damit sich die Stammzellen aus ihrem natürlichen Zellverband herauslösen konnten. Die Kollagenase, die in Pulverform vorlag, wurde mit PBS-Lösung gründlich vermischt. Um die angefertigte Lösung für die Zellkultur zu sterilisieren, wurde die Kollagenase-Mischung mit einer 20 ml-Spritze aufgezogen und durch einen sterilen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,22 mm filtriert. Anschließend wurden jeweils 25 ml Fett in 50 ml Ficoll-Tubes gefüllt. Danach wurde jedes der mit Fett gefüllten 50 ml Ficoll-Tubes mit 25 ml der vorbereiteten Kollagenase-Lösung bis zur 50 ml-Marke aufgefüllt. Das Fettgewebe wurde also mit der Kollagenase-Lösung in einem Mengen-Verhältnis von 1:1 vermischt. Daraufhin wurden die Ficoll-Tubes für 30 Minuten in ein auf 37° Celsius aufgewärmtes Wasserbad gestellt und alle 10 Minuten sanft geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Tubes bis zum Oberrand mit DMEM-Medium (enthält 10 % FCS, 1% Antibiotikum/ Antimykotikum) aufgefüllt und 10 Minuten lang bei 1800 rpm und 20° Celsius zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Um sicher zu gehen, dass hierbei das Zellpellet im Tube verblieb, wurde das

Pellet während des Abkippens mit einer sterilen Einmalpinzette festgehalten. Das Zellpellet wurde in einer 5 ml PBS-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden nun durch einen Zell-Strainer mit einer Porengröße von 100 µm gefiltert und in einem frischen Ficoll-Tube gemeinsam gepoolt. Anschließend erfolgte erneut die Zentrifugation der Tubes bei 1300 rpm und 20° Celsius. Danach wurde der Überstand nochmals abgekippt und das Pellet dieses Mal in jeweils 10 ml Kulturmedium (DMEM) resuspendiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde in 175 cm² großen Kulturflaschen zur Anzucht der Zellen gebracht. Zu jeder Kulturflasche wurden zusätzlich jeweils 25 ml Kulturmedium (DMEM) hinzugegeben. Somit konnte aus anfänglich zwei 50 ml Ficoll-Tubes mit jeweils 25 ml Fettgewebe jeweils eine 175 cm² große Kulturflasche für die Zellaussaat gefüllt werden.

3.2.2 Isolation peripherer Blutzellen

Für die Isolation peripherer Blutzellen wurde bei einem gesunden 25-jährigen, nicht-rauchenden weiblichen Spender eine peripher-venöse Blutabnahme durchgeführt. Für die Versuche wurden unterschiedliche Mengen an Vollblut benötigt, das zunächst in 10 ml EDTA-Röhrchen gesammelt wurde. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei Normoxie (bei 5 % CO₂ und 37°C). Zur Proteinbestimmung aus dem Blutplasma wurde das Vollblut 10 Minuten lang bei 1500 g und 4° Celsius zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma aus der obersten Phase des Röhrchens entnommen (siehe Abb. 3). Bei der Abnahme des Plasmas aus dem Röhrchen mit einer sterilen 1000 µl-Pipette wurde darauf geachtet, möglichst keine Zellen aus dem peripher-venösen Blut zu entnehmen.

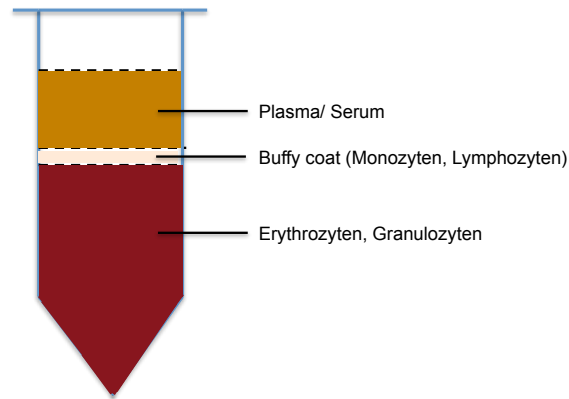


Abbildung 3: Verschiedene Phasen nach Zentrifugation von Vollblut bei 1500g und 4°C für 10 Minuten.

3.2.3 Sauerstoffmessungen

Um die Reaktion peripherer Blutzellen unter verschiedenen Hypoxie-Graden näher zu untersuchen, wurde peripher entnommenes menschliches Vollblut aus einem gesunden Probanden in verschiedenen Konzentrationen in einem Blut-Luft-Gemisch 7 Tage lang inkubiert bei 37°C (5% CO₂). In einer Wunde variiert das Sauerstoffangebot, das den Blutzellen pro Volumeneinheit zur Verfügung steht. Um die Auswirkungen verschiedener Sauerstoffkonzentrationen auf den Zellmetabolismus darzustellen, wurde der Sauerstoffverlauf peripherer Blutzellen bei verschiedenen Blutzellkonzentrationen ermittelt. Mit einem Sensordish Reader (SDR) wurde die Sauerstoffkonzentration in Vollblut unter Wundbedingungen gemessen, da hierdurch Rückschlüsse auf das Überleben der peripheren Blutzellen und ihren Sauerstoffverbrauch gezogen werden können. Jedes Well der OxoDish-Platte ist im Zentrum mit einem fluoreszierenden Farbstoff beschichtet. Der Farbstoff wird durch den Sensordish Reader unterhalb der OxoDish-Platte angeregt, dadurch entsteht eine Fluoreszenz. Die Exzitationsdauer des Lumineszenzfarbstoffs wird durch den transparenten Boden der Platte hindurch vom Sensordish Reader nicht-invasiv erfasst. Die Exzitationsdauer des Lumineszenzfarbstoffs hängt vom Sauerstoffpartialdruck in der OxoDish-Platte ab. Somit kann die jeweilige O₂-Konzentration von der Software berechnet und angezeigt werden.

Für das Monitoring der Sauerstoffkonzentrationen in Vollblutkulturen wurde peripher venöses Blut (Durchschnittliche Anzahl peripherer Blutzellen: $5 \times 10^9/L$) bei zwei gesunden 25-jährigen freiwilligen Probanden (männlich und weiblich, Nichtraucher, BMI = $23.6 \pm 2.5 \text{ kg/m}^2$) entnommen. Das Blut wurde aus den EDTA-Röhrchen für das O₂-Monitoring in die 24-Well Oxodish-Reader-Platten gefüllt. Das Sauerstoff-Monitoring der Vollblutkulturen wurde mit 4 verschiedenen Blutzelldichten, bezogen auf die Gesamtfläche der Wells (2 cm^2), durchgeführt. Die im Folgenden als BVUA's (blood volume per unit area) bezeichneten Blutzelldichten setzten sich wie folgt zusammen: $1,5 \text{ ml/cm}^2$, 1 ml/cm^2 , $0,75 \text{ ml/cm}^2$, $0,5 \text{ ml/cm}^2$ und $0,25 \text{ ml/cm}^2$. Die OxoDish Reader Platte wurde anschließend entweder allein mit dem Deckel verschlossen, oder aber zusätzlich mit einem Parafilm abgedichtet, um den Gasaustausch mit der Umwelt vollständig zu verhindern. Der Versuchsansatz, bei dem die OxoDish-Platte allein mit dem Deckel verschlossen wurde entsprach einem offenen, also einem mit der Umwelt in Verbindung stehenden System. Der zusätzlich mit Parafilm abgedichtete Versuchsansatz hingegen sollte ein geschlossenes, abgedichtetes System widerspiegeln. Diese unterschiedlichen Ausgangsbedingungen entstanden aus der Annahme, dass es bei Wunden an unterschiedlichen Körperstellen auch Unterschiede in der Sauerstoffversorgung gibt. Eine Zellkonzentration von $0,25 \text{ ml/cm}^2$ und $0,5 \text{ ml/cm}^2$ entsprach einer niedrigen BVUA, entsprechend stellte $0,75 - 1,5 \text{ ml/cm}^2$ eine hohe BVUA dar. In Abb. 4 sind die verschiedenen Phasen bei hoher, beziehungsweise bei einer niedrigen BVUA genauer dargestellt.

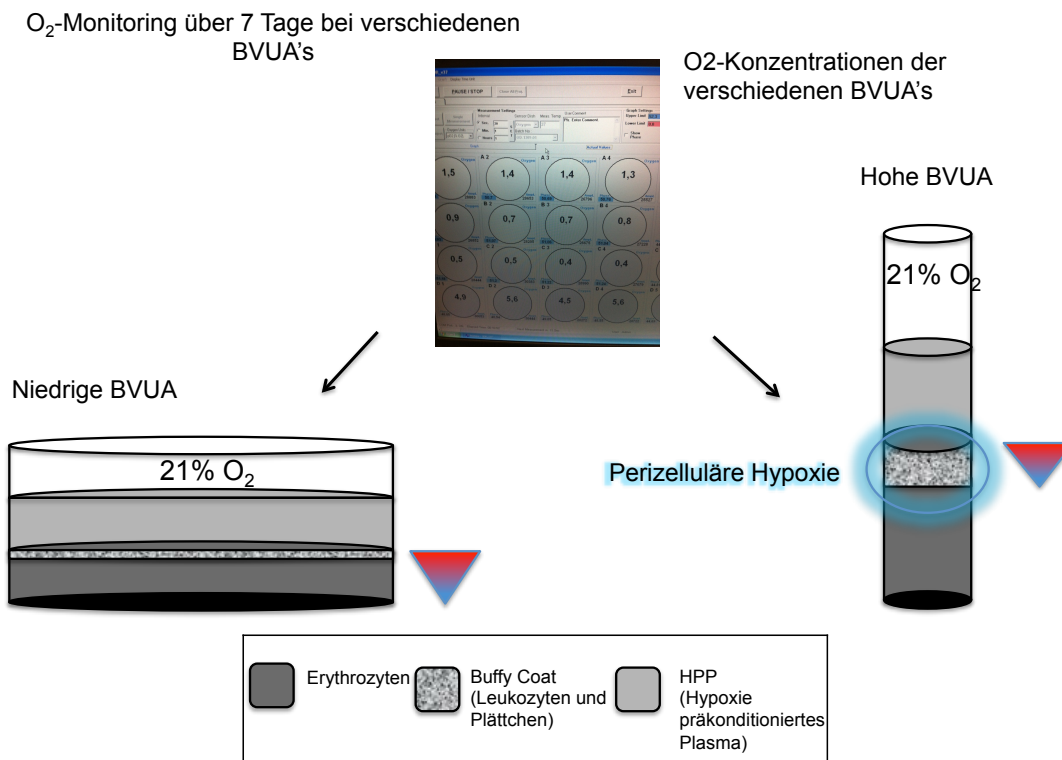


Abbildung 4: Schema zur Erläuterung der BVUA (blood volume per unit area). Bei niedriger BVUA (oben links) kann keine perizelluläre Hypoxie entstehen, da alle Zellen des Zelllayers Kontakt zu den angrenzenden Schichten haben. Erst bei einer hohen BVUA (rechts oben) „veratmen“ die obersten Zellschichten des Buffy Coats den gelösten Sauerstoff; zum Kern des Buffy Coats hin entsteht zunehmend perizelluläre Hypoxie.

Nach der korrekten Platzierung der Oxodish Reader Platte auf dem Sensordish Reader wurden die Einstellungen der Messungen vorgenommen sowie die Messdauer bestimmt.

Alle Messungen fanden im Inkubator bei einer Temperatur von 37° Celsius, Normoxie (21% O₂) und 5% CO₂ statt. Hierdurch wurden für jede Versuchsreihe stets gleiche Ausgangsbedingungen geschaffen. Die Sauerstoffkonzentrationen für die verschiedenen BVUA's wurden kontinuierlich 7 Tage lang für jeweils 24 Stunden ermittelt, wobei die Sensordish-Platten über die gesamte Messdauer im Brutschrank verblieben. Bei den Messungen wurde der prozentuale Anteil von Sauerstoff in „% O₂“ für jedes Well angegeben. In Abb. 5 werden die einzelnen Messzeitpunkte näher erläutert.

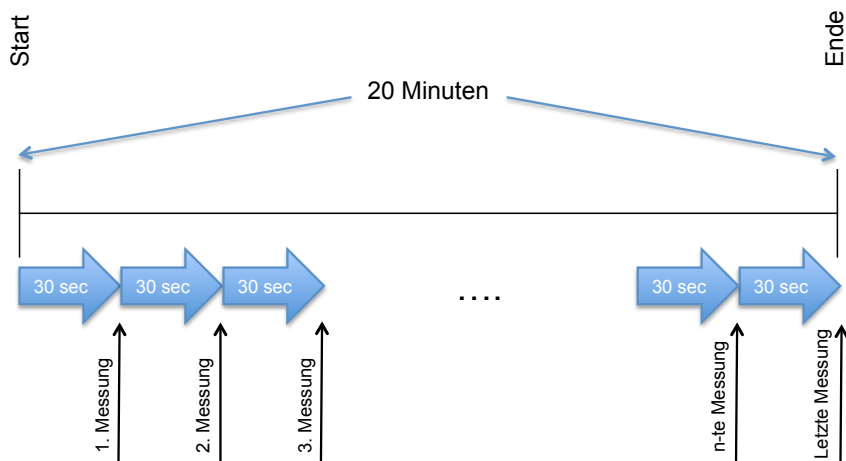


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Messzeitpunkte für das O₂-Monitoring. Die Messungen erfolgten 7 Tage lang. Pro Tag wurde eine 20-minütige Messung durchgeführt, jeweils in 24-stündigen Abständen. Innerhalb der 20 Minuten Messzeit erfolgte in 30-Sekunden-Intervallen eine Messung.

3.2.4 Analysemethoden

Bestimmung der Zellviabilität/ Zellüberleben

a) WST-1-Assay

Mit dem WST-1-Test wurde die metabolische Aktivität von mesenchymalen Stammzellen bestimmt, um ihre Überlebensfähigkeit unter Wundbedingungen zu untersuchen. Der Test beruht auf der Bestimmung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase. Die mitochondriale Dehydrogenase spaltet wasserlösliche Tetrazolium-Salze in Formazan-Salze. Diese Reaktion führt zu einem Farbumschlag, welcher mit einer optischen Dichtemessung quantifiziert werden kann. Die Menge des gebildeten Formazan-Farbstoffes korreliert mit der Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen. Zur Testung wurden zu 100 µl Zellkulturmedium pro Well jeweils 10 µl WST-1-Reagenz dazu gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit dem Reagenz für 1,5 Stunden im Brutschrank bei 37° Celsius und 5% CO₂ inkubiert. Die Formazan-Absorption wurde mit einem Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 590 nm) bestimmt. Für jeden Versuchsansatz wurden drei Proben verwendet. Zusätzlich wurde die optische Dichte für drei „leere“

Proben ohne Zellmaterial bestimmt, um eine Absorption allein durch das Zellmedium und das Reagenz auszuschließen.

b) LDH-Assay

Der LDH-Zytotoxizitäts-Assay ist ein kolorimetrisches Verfahren, mit dem der Zelltod quantifiziert und damit das Zellüberleben unter verschiedenen Wundbedingungen untersucht werden kann. Die Laktatdehydrogenase ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches in das extrazelluläre Medium freigesetzt wird, sobald die Zellmembran beschädigt wird. Im zellfreien Überstand kann die Aktivität der Laktatdehydrogenase mit einem enzymatischen Test ermittelt werden. Hierzu wurden jeweils 100 µl zellfreier Überstand aus der zu untersuchenden Probe entnommen. Nach Zugabe des LDH-Reaktions-Mixes, der aus jeweils 2,5 µl Katalysator und 112,5 µl Farbstoff je Probe zusammengesetzt war, wurden die Proben 30 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die LDH katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Laktat und reduziert dabei NAD zu NADH^+H^+ . Die frei werdenden Protonen werden auf ein Tetrazolium-Salz übertragen und führen zur Bildung eines roten Formazan-Salzes. Die Absorption des Formazan-Farbstoffes wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenz-Wellenlänge 690 nm) erfasst. Aus der Menge des gebildeten Formazan-Salzes ließ sich die Aktivität der LDH bestimmen.

c) Live-Dead-Assay

Um das Zellüberleben zu quantifizieren wurde eine „Lebend-Tod“-Färbung der Zellen mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen durchgeführt. Lebende Zellen wurden mit dem grün fluoreszierenden Calcein AM angefärbt. Gleichzeitig wurden tote Zellen mit dem rot fluoreszierenden Ethidium-Homodimer 1 (EthD-1) sichtbar gemacht. Die Vitalität der Zellen war abhängig davon, ob die Zellmembran intakt war oder nicht. Das Calcein durchdringt die intakte Zellmembran und weist die intrazelluläre Esterase-Aktivität nach, wohingegen Ethidium-Homodimer 1 nur in Zellen mit bereits beschädigter Zellmembran eindringen kann und daher selektiv nur abgestorbene Zellen rot färbt. Für den Reaktionsmix wurden die Fluoreszenzfarbstoffe in einer PBS-Lösung mit $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ verdünnt (Calcein AM: 1:8000, Ethidium-Homodimer

1:1:2000). Nach Entfernen des zellfreien Überstandes wurde der Reaktionsmix mit den Farbstoffen zu den Proben gegeben. Nach einer 2-minütigen Inkubation der Färbelösung mit den Zellen wurde der Überstand abgenommen und jeweils 100 µl PBS-Lösung hinzu gegeben. Die angefärbten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

3.2.5 Hypoxie vs. Normoxie

Mesenchymale Stammzellen (p8) wurden 7 Tage lang unter zwei verschiedenen Bedingungen inkubiert: unter Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 37°C) und unter Hypoxie (3% O₂, 5% CO₂, 37°C). Täglich erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Stammzellen mithilfe des Live-Dead-Assays, um das Zellüberleben quantitativ zu erfassen. Für die Aufnahmen wurde pro Well per Zufallsprinzip jeweils ein Abschnitt unter 20-facher Vergrößerung ausgewählt. Da die Auswahl der Abschnitte per Zufallsprinzip erfolgte, ist aus den Zählungen keine Aussage zur Gesamtzellzahl möglich. Die Zählung der vitalen und avitalen Zellen wurde mit dem Programm „Image J“ anhand der Aufnahmen durchgeführt. Aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mittels Live-Dead-Assays sind jeweils die Ergebnisse der Zellzählungen vitaler Zellen (grüne Färbung) und avitaler Zellen (rote Färbung) zu sehen.

Um die Ergebnisse vitaler und avitaler Zellen besser zu quantifizieren, erfolgten außerdem täglich Viabilitäts-Assays zu den jeweiligen Bedingungen. Es wurde täglich pro Bedingung jeweils ein LDH-Assay und ein WST-Assay durchgeführt.

3.2.6 Einfluss von Temperaturunterschieden und Hypoxie

Um die Auswirkung von Temperaturunterschieden in Kombination mit einer hypoxischen Umgebung auf das Zellüberleben zu untersuchen, wurden mesenchymale Stammzellen (p5) zunächst zwei Stunden lang unter 6 verschiedenen Temperaturen zwischen 30,0°C – 45,8°C in einem PCR-Cycler-Gerät inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 7 Tage lang in einem Hypoxie-Inkubator (3% O₂, 37°C, 5% CO₂) unter gleichen Bedingungen inkubiert. An den Tagen 1, 3 und 7 nach der Zellaussaat wurde die Viabilität

der Zellen anhand des LDH-Release, des WST-1-Assays und des Live-Dead-Stainings auf die jeweils verschiedenen Temperaturen hin untersucht.

3.2.7 Bestimmung der Angiogenesefaktoren

Nach der Messung der Sauerstoffkonzentrationen in Vollblut über jeweils 5 bis 7 Tage wurden aus dem Blutplasma bzw. Serum die Konzentrationen der anti-angiogenetischen Faktoren Thrombospondin-1 (Tsp-1), sowie des Angiogenesefaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) bestimmt.

Die monoklonalen Antikörper gegen Tsp-1 und VEGF waren in der jeweiligen Mikrotiterplatte verankert. Für jeden Elisa wurden Standardreihen in einer jeweils 6- bis 7-stufigen Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen angefertigt. Nach Zugabe der Standards und der Proben in einen geeigneten Probenverdünnungspuffer wurde die Mikrotiterplatte 2 bzw. 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Inkubation des Tsp-1-Elisas wurde die Mikrotiterplatte auf einen Schüttler gestellt. Nach der zwei- bis dreistündigen Inkubationszeit wurden die Standards bzw. Proben mit dem Probenverdünner verworfen und die Elisas vier Mal mit Waschpuffer gespült. Dann wurde jeweils 200 µl Konjugatlösung pro Well mit dem jeweiligen Detektions-Antikörper zu den Standards und Proben gegeben. Es erfolgte eine erneute Inkubation für die Dauer von zwei Stunden bei Raumtemperatur, wobei die Mikrotiterplatte mit dem Tsp-1-Elisa abermals auf dem Schüttler verblieb. Dem folgte wieder das Absaugen und Spülen der Platte mit dem Waschpuffer. Sowohl beim VEGF-, als auch beim Tsp-1-Elisa wurde direkt nach dem Waschschrift 200 µl Substratlösung pro Well hinzugefügt. Die Platte wurde daraufhin 20 bis 25 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, wobei währenddessen regelmäßig die Farbentwicklung beobachtet wurde. Im letzten Schritt wurden 50 µl einer Stop-Lösung auf die Standards und Proben gegeben, woraufhin sich ein Farbumschlag von blau nach gelb zeigte. Mit dem Elisa Microplate-Reader wurde im Anschluss die optische Dichte bei 450 nm gemessen. Mithilfe der Absorptionsmaxima und den Standardkonzentrationen wurde eine Standardkurve für jeden Elisa erstellt. Aus dieser Kurve ließ sich die Konzentration des gesuchten Proteins für die jeweils gemessene optische Dichte errechnen.

3.3 Statistik

Die Versuche zur Reaktion mesenchymaler Stammzellen bei variierendem Microenvironment erfolgten für jede Gruppe im sechsfachen Ansatz ($n = 6$).

Die Versuche zur Auswirkung einer perizellulären Hypoxie und Angiogenese erfolgten für jede Gruppe im dreifachen Ansatz ($n = 3$).

Für jede Testgruppe wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und unter Verwendung des *student's t-test* sowie der einfaktoriellen Varianzanalyse (Anova) p-Werte ermittelt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert. Für alle statistischen Berechnungen wurde die Software "IBM SPSS-Statistics 23" verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Wund-Umgebungsparametern auf das Überleben und die Stoffwechselaktivität mesenchymaler Stammzellen

4.1.1 Einfluss von Hypoxie auf die Viabilität mesenchymaler Stammzellen

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss von Hypoxie auf das Überleben mesenchymaler Stammzellen untersucht, die eine zentrale Rolle im Wundheilungsprozess einnehmen. Die Aktivität der MSC's wurde mittels Viabilitäts-Assays jeweils unter Normoxie (21% O₂) und unter Hypoxie (3% O₂) quantifiziert.

Die Ergebnisse der Zählungen vitaler und avitaler Zellen in Abb. 6 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen einer hypoxischen vs. normoxischen Inkubation. Nur die Anzahl vitaler Zellen an den Tagen 1 und 2 ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie.

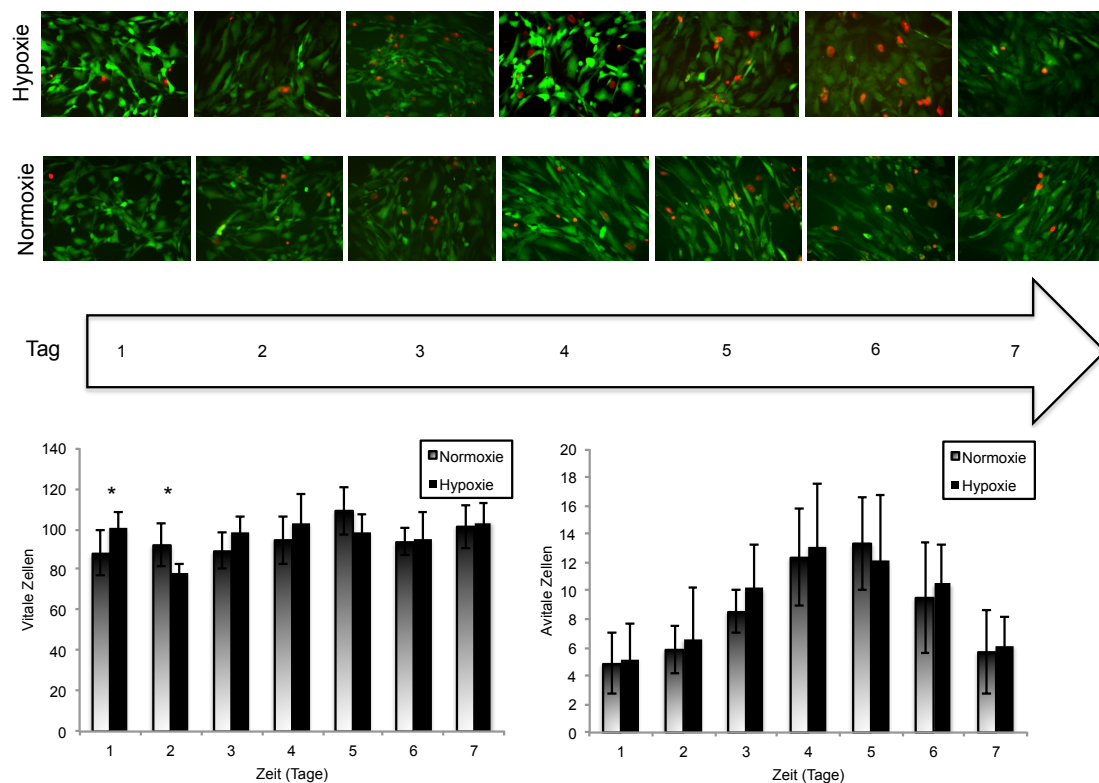


Abbildung 6: Live-Dead-Staining (oben) und Zählung vitaler und avitaler Zellen (unten); über 7 Tage erfolgten tägliche fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unter jeweils hypoxischer und normoxischer Inkubation, die vitalen und avitalen Zellen wurden mit dem Programm ‚Image J‘ gezählt. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm SD, n=6, T-Test *p < 0.05.

4 Ergebnisse

Die Untersuchung der Viabilität der mesenchymalen Stammzellen mit dem WST-1-Assay und LDH-Assay (s. Abb. 7) korrelierte nicht mit den Ergebnissen aus den Zellzählungen. Der WST-1-Assay ergab einen hoch signifikanten Unterschied: unter hypoxischen Bedingungen waren die Zellen an den Tagen 1 – 7 wesentlich stärker metabolisch aktiv im Vergleich zur normoxischen Umgebung (Abb. 7).

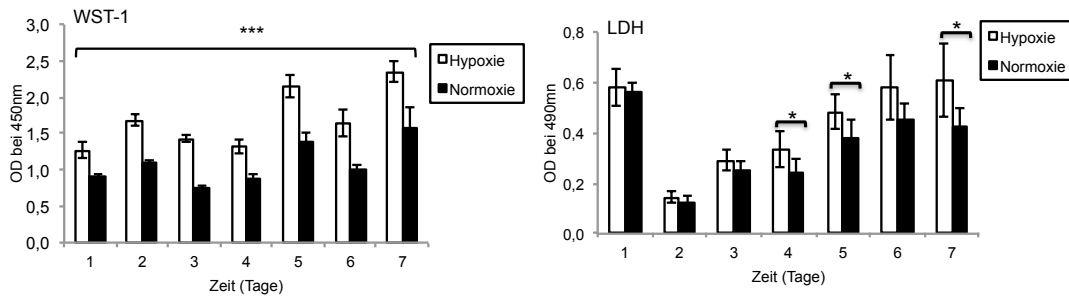


Abbildung 7: Viabilitäts-Assays der MSC's mittels WST-1-Assay und LDH-Release.

Es erfolgten tägliche Messungen über 7 Tage, jeweils unter Hypoxie (3% O₂) oder Normoxie (21% O₂), bei 37°C und 5% CO₂. Aufgeführt sind Mittelwerte ± SD, n=6, T-Test ***p <0.001; Zellfreies Medium wurde als Negativkontrolle zusätzlich getestet (Daten nicht gezeigt).

Der LDH-Assay ergab einen signifikant vermehrten Zelluntergang unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie. Somit schien unter hypoxischer Inkubation insgesamt ein vermehrter Zellumsatz stattzufinden, der vermehrt zum Zelluntergang führte. Im LDH-Assay ergaben sich an den Tagen 4, 5 und 7 signifikante Unterschiede zwischen hypoxischer und normoxischer Inkubation. Da keine Erfassung der absoluten Zellzahl erfolgte, war aus den Viabilitäts-Assays keine Aussage bezüglich der tatsächlichen Anzahl überlebender Zellen möglich.

4.1.2 Einfluss von Temperatur und Hypoxie auf Viabilität mesenchymaler Stammzellen

Nach Untersuchen des Zellüberlebens unter Hypoxie und Normoxie wurde der Einfluss einer weiteren Variablen, der Temperatur, auf die Viabilität von MSC's untersucht. Im physiologischen Wundmilieu können Unterschiede in der Durchblutung des Gewebes auch zu Temperaturunterschieden führen. Ein großes Problem chronischer, nicht heilender Wunden ist eine Minderdurchblutung des Gewebes. Das heilende Gewebe ist dadurch zum einen schlechter mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Zum anderen wirkt sich eine mangelhafte Durchblutung von Wunden möglicherweise durch variierende Temperaturen direkt auf das Zellüberleben aus.

Die Auswertungen der Aufnahmen aus den Live-Dead-Stainings ergaben an Tag 1 nach der Zellaussaat signifikant erhöhte Zellzahlen bei Temperaturen zwischen 30,0°C – 33,7°C im Vergleich zu den höheren Temperaturen (s. Abb. 8). An Tag 3 wurden signifikant höhere Zellzahlen bei 31,1°C und 33,7°C festgestellt. An Tag 7 waren bei 30,0°C signifikant mehr Zellen vital als bei allen anderen Temperaturen. Aus diesen Ergebnissen ging hervor, dass bei niedrigeren Temperaturen als der normalen Körpertemperatur, die üblicherweise 37°C beträgt, signifikant mehr vitale Zellen gezählt wurden als unter höheren Temperaturen. Bei 45,8°C waren keine vitalen Zellen mehr nachweisbar, da unter diesen Temperaturen bereits der Zelltod eingetreten war. Auch bei 42,0°C konnten signifikant verminderte Zellzahlen bei den vitalen Zellen nachgewiesen werden, sodass unter dieser Temperatur das Zellüberleben vermutlich erschwert möglich ist.

Die Auswertung der avitalen Zellzahlen ergab an Tag 1 keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Temperaturen. An Tag 3 wurden bei 42,0°C signifikant vermehrt avitale Zellen gezählt. An Tag 7 wurden auch bei 42,0°C und bei 45,8°C signifikant mehr avitale Zellen verzeichnet.

Diese Feststellungen deckten sich mit den Ergebnissen der vitalen Zellzahlen, da unter höheren Temperaturen als der physiologischen Körpertemperatur das Zellüberleben scheinbar verlangsamt oder gar nicht möglich war.

4 Ergebnisse

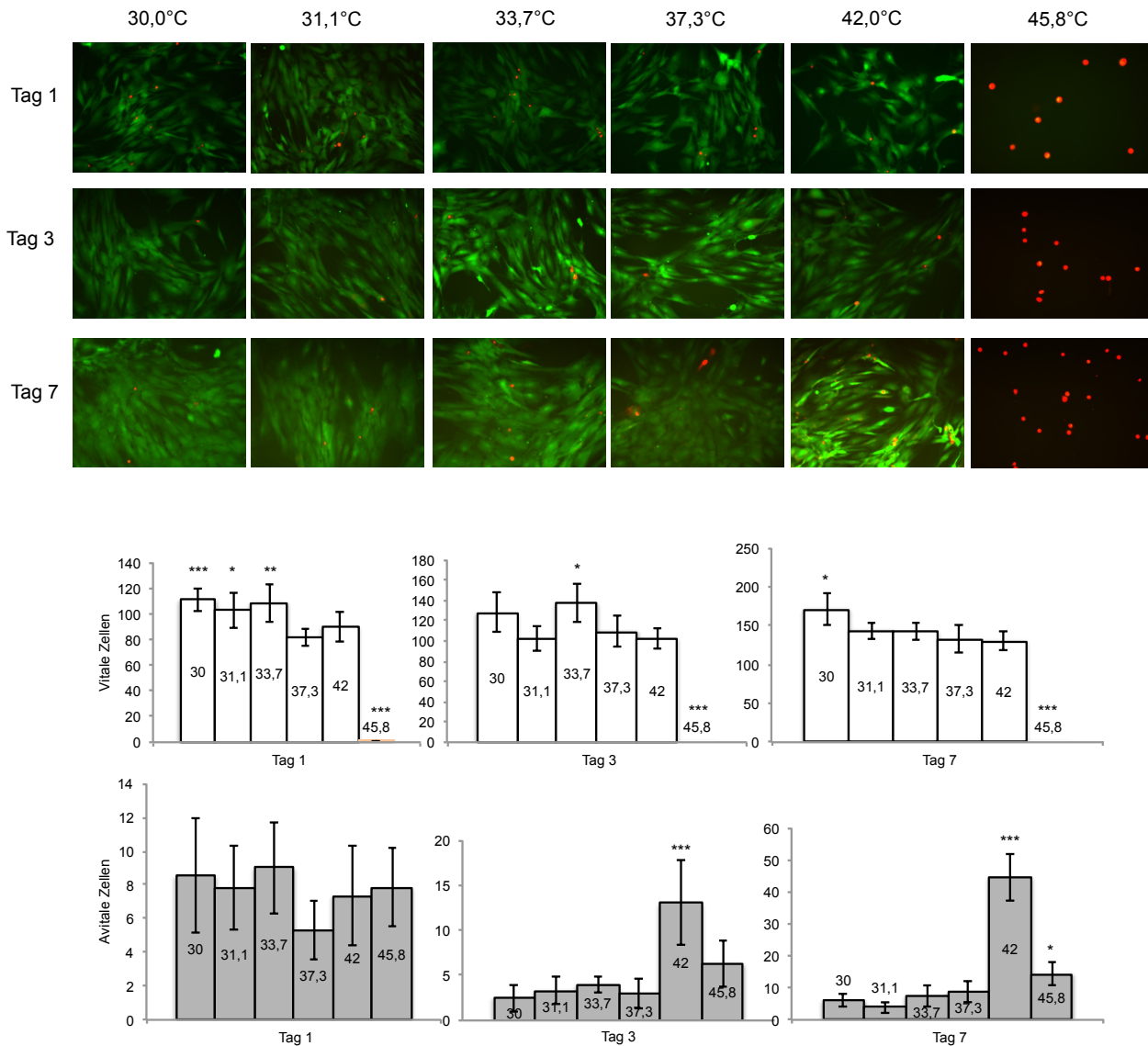


Abbildung 8:

Live-Dead-Staining und Zellzählung von MSC's mit Temperaturunterschieden an Tagen 1, 3 und 7 nach Zellaussaat;

Live-Dead-Staining der Zellen (oben).

Zellzählung unter Verwendung des Programms „Image J“ (unten), Aufgeführt sind Mittelwerte = SD, n=6, *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001.

Im nächsten Schritt wurden zu den gleichen Zeitpunkten, an den Tagen 1, 3 und 7 nach Zellaussaat, Viabilitäts-Assays der Zellen durchgeführt. An Tag 1 konnten im WST-Assay keine signifikanten Unterschiede in der Viabilität der Zellen vermessen werden (s. Abb. 9). An Tag 3 wiesen die Zellen ab Temperaturen $\geq 37,3^{\circ}\text{C}$ eine signifikant geringere Viabilität im Vergleich zu

4 Ergebnisse

den niedrigeren Temperaturen auf. An Tag 7 wiesen die Zellen, die bei Temperaturen von 42,0°C und 45,8°C inkubiert worden waren, ebenfalls eine signifikant verminderte Viabilität auf.

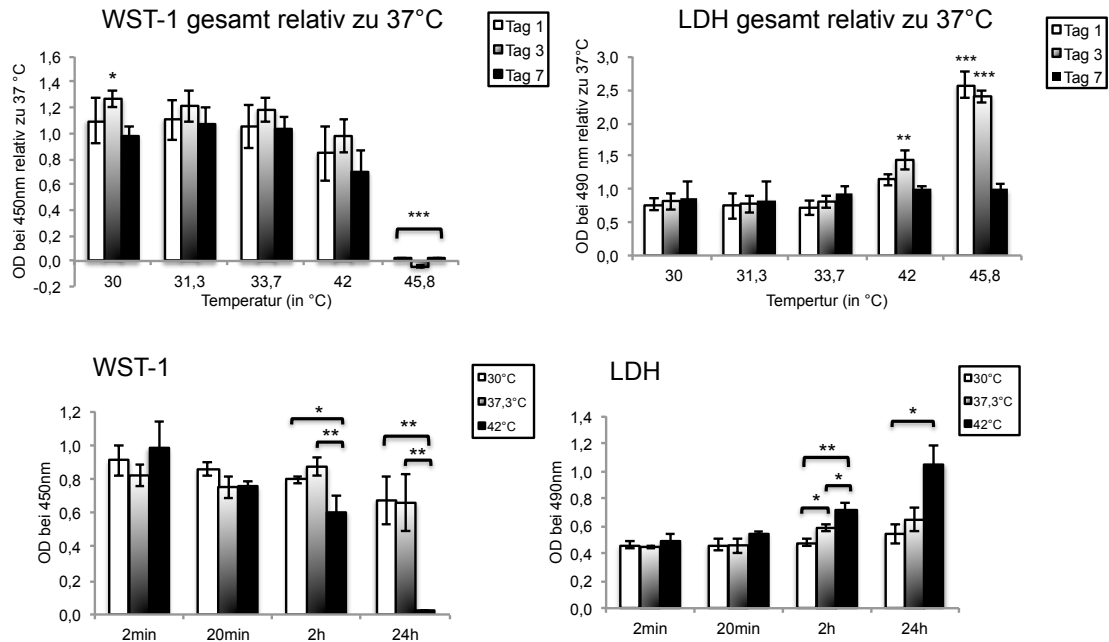


Abbildung 9: Viabilitäts-Assays mesenchymaler Stammzellen unter Temperaturexposition.

Oben: gezeigt sind die Ergebnisse für WST-1 und LDH-Release bei zweistündiger Inkubation unter 5 verschiedenen Temperaturen (von 30,0°C – 45,8°C) und insgesamt 7-tägiger Inkubation unter 3% O₂, 5% CO₂ und 37°C.

Unten: mesenchymale Stammzellen wurden jeweils 2 Minuten, 20 Minuten, 2 Stunden oder 24 Stunden lang unter 3 verschiedenen Temperaturen inkubiert, anschließend wurde die Viabilität mittels WST-1- und LDH-Assay bestimmt.

Gezeigt sind Mittelwerte ± SD, n=6, *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001 (einfaktorielle Varianzanalyse).

Der LDH-Assay ergab, dass an Tag 1 bei 45,8°C bereits alle Zellen abgestorben waren, wie auch die Ergebnisse der Live-Dead-Stainings bereits zeigten. An Tag 3 waren bei 42,0°C und bei 45,0°C ebenfalls vermehrt abgestorbene Zellen zu verzeichnen im Vergleich zu niedrigeren Temperaturen. An Tag 7 konnten interessanterweise keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Zelltodes bei den verschiedenen Temperaturen festgestellt werden.

Bei einem Temperaturgradienten zwischen 30,0°C – 42,0°C nahm die Viabilität der Zellen mit abnehmender Temperatur zu. Mit steigender Temperatur nahm hingegen der Anteil avitaler/ abgestorbener Zellen zu.

Um die Auswirkungen der Temperaturunterschiede auf die MSC's abhängig von der Dauer ihrer Exposition zu untersuchen, wurden die Stammzellen mit jeweils 4 verschiedenen Zeitspannen den jeweiligen Temperaturen ausgesetzt.

Eine 2-minütige sowie eine 20-minütige Exposition der Stammzellen mit den jeweiligen Temperaturen reichte nicht aus, um im WST-Assay sowie im LDH-Release zu signifikanten Unterschieden zu führen. Ab einer 2-stündigen Exposition hingegen zeigten sich signifikante Unterschiede.

Nach einer 2-stündigen Exposition bei der entsprechenden Temperatur konnte ein signifikant erhöhter WST-Wert bei 30°C und 37°C im Vergleich zu 42°C gemessen werden (s. Abb. 9). Auch nach 24-stündiger Exposition war die Viabilität der MSC's unter 42°C Exposition hoch signifikant niedriger ($p < 0.01$). Die Ergebnisse des LDH-Assays korrelierten mit diesen Beobachtungen. Nach 2-stündiger sowie nach 24-stündiger Exposition unter 42°C war der LDH-Release signifikant höher im Vergleich zu geringeren Temperaturen.

4.2 Einfluss von relativer Zellkonzentration auf O₂-Homöostase

Im Folgenden wird der Sauerstoffverbrauch peripherer Blutzellen unter kontinuierlichem O₂-Monitoring bei variierenden Blutzellkonzentrationen studiert. Die zu untersuchende Hypothese lautet, dass der Sauerstoffverbrauch der peripheren Blutzellen proportional zur Zelldichte zunimmt.

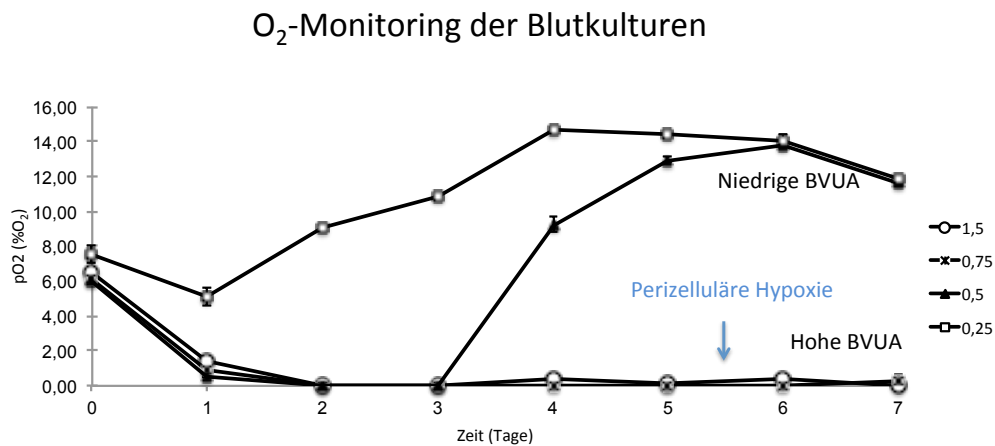


Abbildung 10: Sauerstoff-Monitoring in Vollblutkulturen mit unterschiedlicher BVUA. Gezeigt ist die O₂-Konzentration 4 verschiedener BVUA's (0,25, 0,5, 0,75, 1,5 ml/cm²) über 7 Tage im Normoxie-Inkubator (20% O₂, 37°C, 5% CO₂). Bei niedriger BVUA konnte keine anhaltende perizelluläre Hypoxie entstehen; erst ab einer BVUA $\geq 0,75$ ml/cm² entstand eine anhaltende Hypoxie <1% O₂ über 7 Tage. n=4, abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Bei näherer Betrachtung des Sauerstoffverlaufs (Abb. 10) fiel auf, dass bei hohen BVUA's bereits am Tag 1 eine relevante Hypoxie entstehen konnte. Der Sauerstoffpartialdruck fiel bei hohen BVUA's rapide ab. Bei 0,5 ml/cm² stieg ab Tag 3 die O₂-Konzentration wieder an, während bei den höheren BVUA's (0,75 und 1,5 ml/cm²) eine anhaltende, tiefe Hypoxie bis zu Tag 7 anhielt. Bei einer niedrigen BVUA von 0,25 ml/cm² entstand keine relevante Hypoxie von <1% O₂. An Tag 1 fiel bei 0,25 ml/cm² die O₂-Konzentration minimal ab; dieser Abfall war möglicherweise auf einen anfänglichen Sauerstoffverbrauch der Zellen zurückzuführen. Am Tag 2 stieg die O₂-Konzentration bei niedriger BVUA wieder an. An Tag 4 war bei der niedrigsten BVUA (0,25 ml/cm²) ein Plateau des Sauerstoffanstiegs erreicht.

Augenscheinlich war zu diesem Zeitpunkt ein Gleichgewicht zwischen Sauerstoffverbrauch und Sauerstofffreisetzung eingetreten, sodass kein weiterer Sauerstoff freigesetzt wurde und das Plateau der O₂-Konzentration erreicht war.

Aus diesen Resultaten ging auch hervor, dass der Grenzbereich der BVUA, der für eine anhaltende perizelluläre Hypoxie von <1% O₂ erforderlich war, bei einer BVUA zwischen 0,5 - 0,75 ml/cm² lag. Ab einer BVUA von ≥0,75 ml/cm² trat eine 7-tägige, relevante Hypoxie ein. Dieses Ergebnis war für die folgenden Versuche relevant, da peripheren Blutzellen die Eigenschaft zugeschrieben wird, unter einer akut eingetretenen Hypoxie Angiogenesefaktoren zu bilden und somit die Neoangiogenese des heilenden Gewebes zu fördern.

4.3 Die Auswirkungen einer perizellulären Hypoxie auf die Bildung von Angiogenesefaktoren durch periphere Blutzellen (PBZ)

In den zuvor aufgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass für das Entstehen einer anhaltenden Hypoxie <1% O₂ eine hohe BVUA (≥ 0,75 ml/cm²) erforderlich war. Das Entstehen dieser perizellulären Hypoxie spielt im Wundheilungsprozess eine wichtige Rolle, da durch die hypoxischen Umgebungsbedingungen vermehrt Angiogenesefaktoren gebildet werden.

Um diesen Zusammenhang für periphere Blutzellen zu belegen, und vor allem die genaue zeitliche Korrelation zwischen Hypoxie und der Bildung von Angiogenesefaktoren aufzuzeigen, wurden aus den Plasmaüberständen der Vollblutkulturen der verschiedenen BVUA's (von jeweils 0,5, 0,75 und 1,5 ml/cm²) die Konzentrationen des Angiogenesefaktors VEGF bestimmt (s. Abb. 11). Die gezeigten VEGF-Konzentrationen der verschiedenen BVUA's wurden am Tag 7 nach Beginn der Inkubation aus den Zellüberständen gewonnen.

4 Ergebnisse

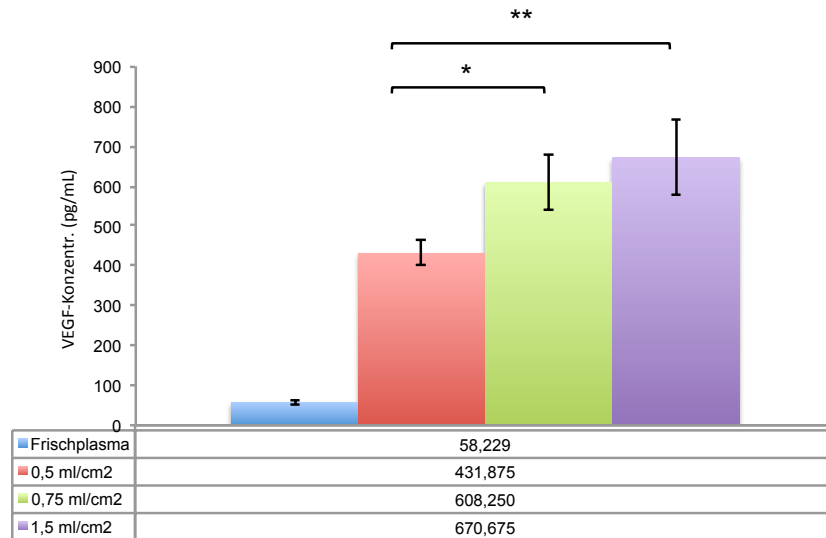


Abbildung 11: Plasma-VEGF-Konzentrationen der Blutkulturen nach 7 Tagen bei 37 °Celsius und 5% CO₂. Gezeigt ist die VEGF-Bildung bei BVUA's von 0,5, 0,75 und 1,5 ml/cm²; Frischplasma war an Tag 0 entnommenes Blutplasma; aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=4); * = p < 0,05 (vs. 0,5 ml/cm²); ** = p < 0,01 (vs. 0,5 ml/cm²).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der VEGF-Produktion in den Blutkulturen mit hohen BVUA's (mit 0,75 und 1,5 ml/cm²). In diesen Blutkulturen trat auch jeweils eine über 7 Tage anhaltende Hypoxie (<1% O₂) ein (s.o. Abb. 10). Die Plasma-VEGF-Konzentrationen waren bei hohen BVUA's im Vergleich zur niedrigeren BVUA (von 0,5 ml/cm²) etwa ~1,5 höher. In den Blutkulturen mit niedriger BVUA 0,5 ml/cm² trat nur eine kurzfristige Hypoxie ein, welche von einem Anstieg der perizellulären Sauerstoffkonzentration gefolgt wurde (s. Abb. 10). Somit veränderte sich mit der Dauer der Hypoxie auch die Bildung der Angiogenesefaktoren durch die peripheren Blutzellen. Die VEGF-Konzentration in Frischplasma wurde ebenfalls mitbestimmt und ergab hoch signifikante Unterschiede im Vergleich zu den anderen Blutkulturen.

Um den zeitlichen Verlauf der Angiogenese unter lang anhaltender Hypoxie genauer zu bestimmen, wurden Blutkulturen mit einer BVUA = 1,5 ml/cm² fünf Tage lang (bei 20% O₂, 37 °Celsius und 5% CO₂) inkubiert (s. Abb. 12). Diese BVUA wurde gewählt, da hierunter eine gesicherte perizelluläre Hypoxie über 7 Tage entstehen konnte, wie aus den vorherigen Versuchen ersichtlich ist.

4 Ergebnisse

Durch tägliche Zentrifugation des Vollblutes wurde das Blutplasma gewonnen (1500 g) und auf die Faktoren VEGF (ein Angiogenesefaktor) und Thrombospondin-1 (TSP-1, einem Inhibitor der Angiogenese) mittels Elisa (R&D Systems) untersucht.

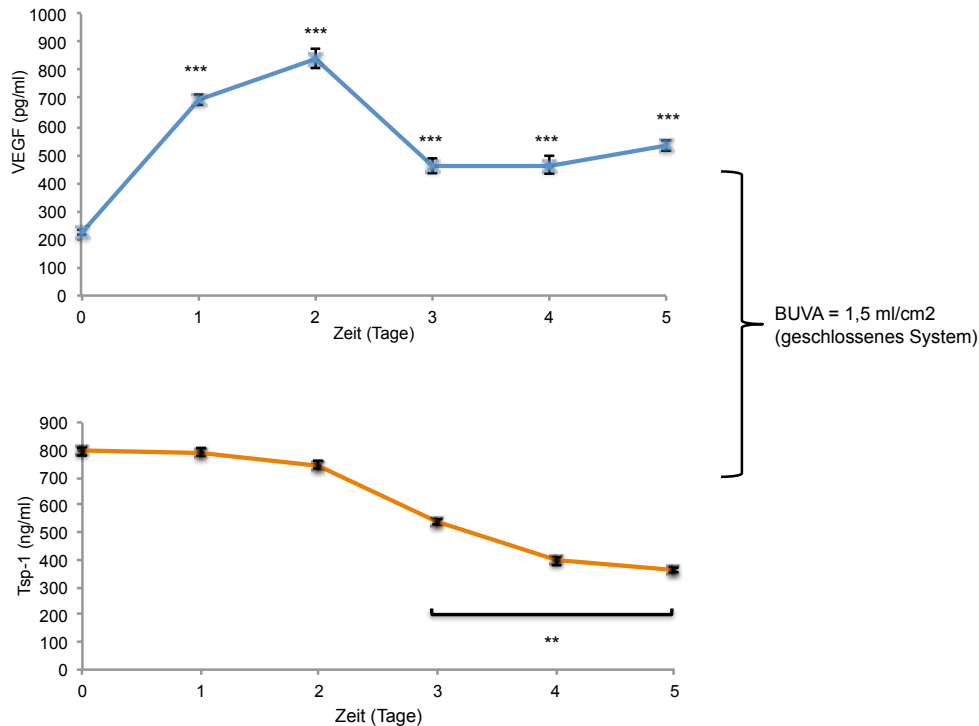


Abbildung 12: Zeitverlauf der Plasma-VEGF- und Thrombospondin-1-Konzentrationen in Blutkulturen mit BVUA = 1,5 ml/cm² über 5 Tage (bei 37°C, 20% O₂ und 5% CO₂); aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardabweichung; es gab pro getestetem Faktor jeweils drei Versuchsansätze (n=3).

Die VEGF-Konzentration (Abb. 12) der Blutkulturen stieg in den ersten 48 Stunden stark an und fiel ab dem 2. Tag rapide ab. Bis zum 5. Tag wurde dann eine annähernd konstante VEGF-Konzentration erreicht. Dieses Plateau war etwa doppelt so hoch wie die VEGF-Ausgangskonzentration (verglichen mit Tag 0).

Die Tsp-1-Konzentration war die ersten zwei Tage lang relativ stabil und nahm dann ab. An Tag 5 war die Tsp-1-Konzentration auf etwa 50 % der Ausgangskonzentration gesunken. Das Eintreten einer signifikanten, anhaltenden Hypoxie führte somit scheinbar zu einem signifikanten Anstieg

der VEGF-Konzentration und einem signifikanten Abfall der Tsp-1-Konzentration. Demnach führte eine anhaltende perizelluläre Hypoxie zu vermehrter Bildung pro-angiogenetischer Faktoren (VEGF). Gleichzeitig nahm die Bildung des anti-angiogenetischen Faktors Tsp-1 unter Hypoxie auf 50 % der Ausgangskonzentration ab.

4.4 Vergleich zwischen zellinduzierter vs. extern kontrollierter Hypoxie auf die Angiogenesefaktor-Produktion

Es konnte bisher gezeigt werden, dass unter anhaltender perizellulärer Hypoxie (<1% O₂) die VEGF-Bildung im Vergleich zur Ausgangskonzentration signifikant zunahm. Um die Auswirkungen einer perizellulären Hypoxie auf periphere Blutzellen zu überprüfen, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die gleiche Zellantwort auch auf eine extern kontrollierte Hypoxie auftreten würde.

Zu diesem Zweck wurden die VEGF-Konzentrationen und Tsp-1-Konzentrationen aus zwei verschiedenen Vollblutkulturen nach jeweils 5 Tagen Inkubationszeit miteinander verglichen: 1) Vollblutkultur mit dauerhafter zellinduzierter Hypoxie (geschlossene Kammer mit BVUA von 1 ml/cm² und einem hypoxischen Plateau von <1% O₂) und 2) Vollblutkultur mit extern kontrollierter Hypoxie (offene Kammer mit BVUA von 0,4 ml/cm² und 3% O₂ im Hypoxie-Inkubator; ebenfalls hypoxisches perizelluläres Plateau von <1% O₂). Wie in Abb. 13 ersichtlich ist, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der VEGF-Produktion zwischen den Blutkulturen, die unter zellinduzierter Hypoxie (mit BVUA 1 ml/cm²) bzw. extern kontrollierter Hypoxie (3% O₂) inkubiert wurden. Auch die Thrombospondin-1-Konzentrationen zeigten in den Blutkulturen mit zellinduzierter und mit extern kontrollierter Hypoxie keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 13). Die VEGF-Level waren unter zellinduzierter Hypoxie im Vergleich zu Frischplasma auf das 7-fache erhöht. Die Tsp-1-Konzentration betrug unter Hypoxie nur die Hälfte verglichen mit Frischplasma. Scheinbar trat unter anhaltender Hypoxie <1 % eine vermehrte Bildung pro-angiogenetischer Faktoren und eine verminderte Produktion anti-angiogenetischer Faktoren ein.

4 Ergebnisse

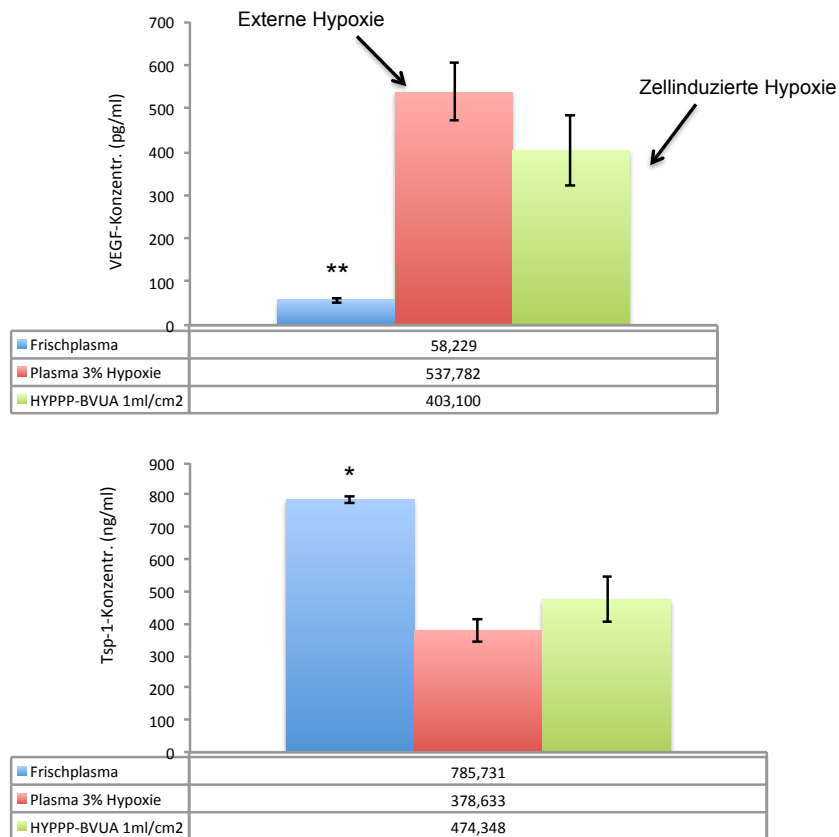


Abbildung 13: Vergleich der Wirkung von zellinduzierter und extern induzierter Hypoxie auf die pro- und anti-angiogenetische Faktorbildung durch periphere Blutzellen; die Diagramme vergleichen die VEGF- und Thrombospondin-1-Konzentrationen in Plasma aus Vollblutkulturen nach 5 Tagen Inkubation unter 37°C und 5% CO₂; die Faktorenkonzentrationen in Frisch-Plasma wurden als Kontrollen mitbestimmt; pro Faktor und Bedingung wurden jeweils drei Versuchsansätze getestet (n=3); gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3); *p <0.05, **p <0.01 (jeweils Frischplasma gegen Plasma 3% Hypoxie bzw. HYPPP-BVUA 1 ml/cm²).

5 Diskussion

5.1 Vitalität mesenchymaler Stammzellen in einer Wunde: Untersuchung der Überlebensfähigkeit mesenchymaler Stammzellen unter Wundbedingungen

5.1.1 Hypoxie versus Normoxie

Zahlreiche Studien haben sich in der Vergangenheit bereits mit dem Einsatz mesenchymaler Stammzellen in der regenerativen Medizin [38, 42] beschäftigt. Mesenchymale Stammzellen eignen sich aufgrund einer Vielzahl von Eigenschaften für die Behandlung von Gewebsdefekten: sie exprimieren keine MHC-II Antigenkomplexe an ihrer Oberfläche [42, 43] und rufen somit keine Abstoßungsreaktionen im Empfängerorganismus hervor. Mesenchymale Stamm-/ Stromazellen lassen sich aus den meisten adulten Geweben leicht isolieren [44] und passen sich dem Empfängergewebe gut an. Die Zellen adaptieren an das Zielgewebe entweder, indem sie sich in den zellspezifischen Phänotyp differenzieren [45], oder indem sie ein besseres Zellmilieu herstellen [46], welches den endogenen Zellen eine adäquate Wundreparatur ermöglicht.

Das Ziel unserer Arbeit war es heraus zu finden, wie sich mesenchymale Stammzellen in einem der Wunde angeglichenen Milieu verhalten, und unter welchen Bedingungen sie noch lebensfähig sind.

Unsere Beobachtungen, dass die Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen stärker metabolisch aktiv waren als unter normoxischen, decken sich mit anderen vergleichbaren Studien, in denen gezeigt wurde, dass mesenchymale Stammzellen unter 2-3% O₂ vermehrt proliferieren als unter 21% O₂ [47]. Dieser Zusammenhang erklärt sich aus der Tatsache, dass mesenchymale Stammzellen in ihrem physiologischen Milieu nicht O₂-Konzentrationen von 21% ausgesetzt sind, sondern dass ein Sauerstoffgehalt von < 3% viel mehr dem natürlichen Milieu im Körper entspricht [47, 48]. Fehrer et al. konnten zeigen, dass aus Knochenmark isolierte MSC's unter

physiologischen O_2 -Konzentrationen von 3% länger überlebten, und im Vergleich zu normoxischer Zellkultur (21% O_2) stärker proliferierten [41].

Valorani et al. zeigten in Korrelation dazu, dass bei MSC's unter 14-tägiger Inkubation unter Hypoxie (2% O_2) im Vergleich zu normoxischer Inkubation (21% O_2) eine erhöhte Zellpopulation, eine erhöhte Zellviabilität, sowie eine Reduktion des Zelltodes unter Hypoxie auftrat [37].

Die Erkenntnisse, dass mesenchymale Stammzellen unter Hypoxie weiterhin metabolisch aktiv sind und überleben, sind für die Optimierung der Therapie von Wundheilungsstörungen von großer Bedeutung. Chronische Wunden sind durch eine inadäquate Durchblutung und somit einen insuffizienten Sauerstofftransport zu den Zellen charakterisiert. Da MSC's in ihrer physiologischen Nische sehr niedrigen O_2 -Konzentrationen ausgesetzt sind, kann das Verhalten und Überleben der MSC's auf andere Umstände, wie zum Beispiel eine Wundheilungsstörung, die ebenfalls ein hypoxisches Microenvironment hervorrufen, übertragen und genutzt werden. Viele Studien befassen sich derzeit mit der Charakterisierung und der therapeutischen Anwendung hypoxisch präkonditionierter MSC's. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass MSC's, die kurzzeitig ex vivo hypoxisch präkonditioniert wurden (1% O_2), nach Implantation in ischämisches Muskelgewebe im Vergleich zu normoxischen MSC's zu einer deutlich verbesserten Regeneration des Muskelgewebes und zu vermehrter Neoangiogenese führten [49].

Rosova et al. verdeutlichen die Problematik, dass mesenchymale Stammzellen bei der therapeutischen Anwendung zur Reparatur von Gewebsdefekten normalerweise unter atmosphärischen Raumbedingungen (21% O_2) inkubiert werden und sich nach der Implantation an den wesentlich niedrigeren Sauerstoffpartialdruck des Zielgewebes (<1% O_2) anpassen müssen [50]. Hypoxisch bzw. normoxisch vorbehandelte MSC's wurden in den linken Ventrikel von Testmäusen injiziert, die zuvor einen ischämischen Gewebsdefekt gesetzt bekamen. Es zeigte sich, dass die Tiere mit hypoxisch vorbehandelten MSC's eine schnellere Wiederherstellung der Durchblutung des Gewebsdefektes aufwiesen [50]. Zudem konnten Rosova et al. zeigen, dass die MSC's unter hypoxischer Stimulation eine signifikant höhere

Migrationsfähigkeit in das Zielgewebe aufwiesen im Vergleich zu MSC's unter atmosphärischen Umgebungsbedingungen [50].

5.1.2 Auswirkungen niedriger Temperaturen auf Metabolismus und Überleben mesenchymaler Stammzellen

Nachdem die Auswirkung des Sauerstoffpartialdruckes auf MSC's aufgezeigt wurde, sollte als nächstes ein weiterer entscheidender Umgebungsparameter untersucht werden: die Temperatur. Während der Einsatz und das Verhalten einer zellulären Hypoxie bei mesenchymalen Stammzellen in zahlreichen Studien ausgiebig und umfassend untersucht wurden, sind die Auswirkungen von Temperaturunterschieden auf das Überleben von MSC's weitgehend unerforscht.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass mesenchymale Stammzellen unter Hypoxie (3% O₂) und niedrigeren Temperaturen als der physiologischen Körpertemperatur am stärksten metabolisch aktiv waren.

In einer Studie konnten Xu et al. zeigen, dass mesenchymale Stammzellen während der Kryokonservierung externem osmotischen Stress durch Hinzufügen kryoprotektiver Agenzien, sowie Stress in Form von Kälte ausgesetzt sind und diese Stressoren schließlich zur Apoptose führen [51].

Xu et al. [52] konnten nachweisen, dass eine langsame Kühlgeschwindigkeit von 1°C/ min. im Vergleich zu einer schnelleren Kühlgeschwindigkeit von 10°C/ min. zu einem verbesserten Erhalt der Zellmorphologie bei MSC's führte und die Zellen nicht aus ihrem Verband herauslöste.

Neben einem Kälteschock kann auch ein Hitzeschock den Zelltod hervorrufen. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bereits eine 2-stündige Exposition von 45,8°C ausreicht, um den irreversiblen Zelluntergang hervorzurufen. Die zelluläre Antwort auf einen Hitzeschock wird durch Gene für die sogenannten Hitzeschockproteine (Hsp) kodiert. Zellen reagieren auf viele chemische und physische Stressoren, wie beispielsweise

UV-Strahlung, Chemotherapeutika oder Mangel an Nährstoffen, indem sie die hochkonservierten Hitzeschockproteine synthetisieren [53]. Neben ihrer Aktivität als Chaperone zur Vermeidung einer Fehlfaltung von Proteinen besitzen die Hitzeschockproteine auch anti-apoptotische Funktionen [53]. Eine Schlüsselrolle bei einem Hitzeschock nehmen die Proteine der Hsp70-Familie ein. Alekseenko et al. fanden in einer Reihe von Experimenten heraus, dass humane embryonale Stammzellen (ESC) während eines „milden“ Hitzeschocks von 45°C für 10 Minuten weiterhin metabolisch aktiv waren; eine Exposition der Zellen mit derselben Temperatur über eine Dauer von 30 Minuten („schwerer“ Hitzeschock) führte hingegen zu einer Verringerung der Zellviabilität um 30 - 35% durch Apoptose [54]. Ein milder Hitzeschock führte zu einer Zunahme der Hsp70-Proteine in ESC's und Fibroblasten; unter einem schweren Hitzeschock dagegen nahmen die Hsp70-Proteine in den ESC's ab und in den Fibroblasten zu [54]. Diese Erkenntnisse sind bedeutsam, da embryonale Stammzellen ihre Pluripotenz über einen langen Zeitraum und eine Reihe äußerer Stressmechanismen beibehalten. Da sich nur wenige Studien bezüglich des Überlebens dieser Zellart unter einem Hitzeschock finden, müssen weitere Versuche durchgeführt werden, um die zugrunde liegenden Zellschutzmechanismen zu ergründen.

Reissis et al. haben in eine Studie untersucht, wie sich Temperaturen von 38°C, 48°C und 58°C auf die Viabilität von mesenchymalen Stammzellen auswirken [55]. Die Fragestellung für diese Versuche war, ob sich beim Einschlagen einer Revisions-Hüftprothese mit Zement während der Polymerisation des Zements die entstehenden hohen Temperaturen (bis ca. 48°C) auf die metabolische Aktivität der MSC's auswirken. Reissis et al. konnten zeigen, dass ein kurzzeitiger Hitzeschock bis zu maximal 48°C über eine Dauer von 150 Sekunden zu keiner verminderten Zellaktivität führt. Bei Temperaturen von 58°C trat hingegen der sofortige Zelltod ein, unabhängig von der Dauer der Exposition [55]. In der vorliegenden Arbeit waren dagegen bereits bei 45,8°C keine lebenden Zellen mehr nachweisbar. Die Dauer der Exposition der Zellen war in unseren Versuchen mit 2 Stunden jedoch wesentlich länger. Somit lassen sich die Auswirkungen der hohen Temperatur

und der damit einhergehende Zellschaden mit der Dauer der Exposition korrelieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 2-minütige und eine 20-minütige Exposition der MSC's mit Temperaturen von 30,0°C – 42,0°C zu keinen signifikanten Unterschieden der Viabilität führte. Bei einer längeren Expositionsdauer hingegen zeigten sich deutliche Unterschiede im Zellüberleben. Bei 2 Stunden und 24 Stunden Expositionsdauer waren signifikant höhere Zellschäden bei 42°C eingetreten als bei niedrigeren Temperaturen. Aus diesen Versuchsergebnissen lässt sich ableiten, dass die Expositionsdauer vermutlich einen erheblichen Einfluss auf das Überleben der Zellen hat.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ab einer bestimmten Körpertemperatur, die dem Eintreten von Fieber entspricht, ein Zellschaden eintreten kann. Hales et. al. beschreiben das Dilemma, das im Körper während einer erhöhten Körperkerntemperatur auftritt [56]. Die Wärmeabgabe erfolgt zunächst über die Hautoberfläche und dem Schwitzen. Hierfür muss jedoch die Durchblutung in der Haut stark gefördert werden. Dies setzt wiederum ein erhöhtes Herz-Minuten-Volumen voraus [56]. Aus dieser Kaskade geht hervor, dass ab einem bestimmten Punkt die Thermoregulation durch das Aufrechterhalten des mittleren arteriellen Drucks stark limitiert wird. Zudem kann nach einer initialen Umverteilung des Blutvolumens die Durchblutung lebensnotwendiger Organe nicht mehr gewährleistet werden, sodass es zum Organversagen kommt.

Fieber ist eine Reaktion des Organismus auf vielerlei äußere Faktoren: Infektionen, Endotoxinfreisetzung, Trauma und Stress sind nur einige Beispiele hierfür. Es gibt zahlreiche Studien die darauf hindeuten, dass Fieber eine Abwehrreaktion des Körpers darstellt und die unspezifische sowie die spezifische Immunität erhöht [57]. Die Entstehung des Fiebers ist ein hochkomplexer Prozess, an dem eine Vielzahl von Zytokinen und Mediatoren beteiligt sind, die zunächst den Sollwert der Körperkerntemperatur erhöhen. Ab einer Körpertemperatur von 42°C ist, in Korrelation zu unseren Ergebnissen, ein Überleben infolge des Zelluntergangs nicht möglich [57].

Die Hyperthermie ist in der modernen Tumorthherapie, in Kombination mit einer Chemotherapie und/ oder einer Radiatio, eine etablierte Therapieform.

Studien haben ergeben, dass eine Hitzeexposition von $> 42^{\circ}\text{C}$ zunächst zu einem Wachstumsstopp der Zellen führt, bei initial noch reversiblen Zellschaden [58]. Bei längerer Expositionsdauer oder einer Exposition mit einer höheren Temperatur steigt die Zelltodrate exponentiell an [58]. Die molekularen und immunologischen Effekte einer Hyperthermie-Behandlung bei Tumorkranken gilt es weiterhin zu erforschen, da es aufgrund der Multimodalität einer solchen Behandlung sehr schwierig ist, die herbeigeführten Ergebnisse auf die Anwendung einer Hyperthermie zurückzuführen.

Die Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Temperaturen auf die metabolische Aktivität mesenchymaler Stammzellen hat nicht nur Einfluss auf das Verständnis und wichtige Prinzipien der Wundheilung. Als Beispiel von weiteren Auswirkungen von externem Stress in Form von Temperaturunterschieden auf das Zellüberleben stellt die Kryokonservierung dar. Das Einfrieren von Zellen und Gewebematrizes ist eine effektive Methode zur Konservierung von Zelllinien über lange Zeitabschnitte und ist als Standardmethode in Laboratorien etabliert. Xu et al. haben untersucht, wie sich das Einfrieren und das Wiederauftauen auf die Zelleistung auswirken [52]. Die Ergebnisse dieser Studie sind von großer Bedeutung, da ein veränderter Zellmetabolismus nach dem Wiederauftauen erhebliche Auswirkungen auf sämtliche Versuchsergebnisse hätte. Xu et al. konnten feststellen, dass die Zellviabilität nach einer Kryokonservierung bei adhärennten humanen mesenchymalen Stammzellen um 30% abnahm bei einer Kühlungsgeschwindigkeit von $1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. und $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Die Gruppe fand ebenfalls heraus, dass Zellen im Verband wesentlich empfindlicher gegenüber dem Kälteschock waren als Zellen in einer Suspension.

5.2 Ausbildung einer perizellulären Hypoxie ohne Hypoxieinkubator und Auswirkungen auf die Bildung von Angiogenesefaktoren

5.2.1 Die Auswahl einer hohen BVUA führt zur Entstehung einer perizellulären Hypoxie und vermehrter Produktion von Angiogenesefaktoren

In einer Wunde sind sämtliche an der Wundheilung beteiligte Zellen äußeren Stressoren wie variablen Temperaturen, einem variierenden Sauerstoffangebot, pH-Wert-Veränderungen, Bakterien, oder mechanischen Reizen ausgesetzt. Wir konnten in den vorherigen Untersuchungen die Auswirkungen von Wund-Bedingungen auf das Überleben mesenchymaler Stammzellen aufzeigen. Im Folgenden soll die Reaktion peripherer Blutzellen (PBZ), die ebenfalls ein wichtiger Bestandteil in jeder Wunde sind, unter Stressbedingungen betrachtet werden.

Wir konnten durch unsere Versuche die Hypothese bestätigen, dass durch eine hohe Blutzelldichte von $>0,75 \text{ ml/cm}^2$ eine zellinduzierte, über 7 Tage anhaltende Hypoxie entsteht. Die Erklärung hierfür ist vermutlich die Tatsache, dass bei einem dünneren Zellschicht, entsprechend einer niedrigen BVUA unserer Versuche, alle Zellen Kontakt zur Oberfläche und somit Kontakt zu Sauerstoff haben. Der Sauerstoff kann zu allen Zellen diffundieren, deshalb stellt sich bei einer niedrigen BVUA keine anhaltende Hypoxie ein. Wird dagegen eine hohe BVUA ausgewählt, so haben die oberen Zellschichten noch Kontakt zur Oberfläche und der Sauerstoff kann zu den oben gelegenen Zellen hin diffundieren. Um die tiefer gelegenen Zellschichten herum stellt sich hingegen eine perizelluläre Hypoxie ein, da der gesamte Sauerstoff durch die Zellen an der Oberfläche bereits ‚veratmet‘ und damit verbraucht wurde.

Bei einer BVUA von $0,25 \text{ ml/cm}^2$ konnte in den ersten 24 Stunden ein leichter Abfall der O_2 -Konzentration festgestellt werden. Dieser Abfall war am ehesten durch Sedimentationsprozesse nach Zellaussaat bedingt. An den Tagen 1 bis 4 nahm die O_2 -Konzentration kontinuierlich zu. Der Anstieg der O_2 -Konzentration spiegelt die Tatsache wider, dass durch die geringe Zellzahl

alle Zellen Kontakt zur Oberfläche haben und der vorhandene Sauerstoff zu allen Zellen hin diffundieren kann. An den Tagen 4 – 7 stellte sich ein Plateau bei etwa 12 – 14% O₂ ein, das zu Tag 7 hin leicht abnahm. Bei dieser Sauerstoffkonzentration wurde vermutlich ein Gleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch erreicht.

Bei einer BVUA von 0,5 ml/cm² trat zwischen Tag 0 bis 3 eine tiefe, perizelluläre Hypoxie <1% O₂ ein. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde der verfügbare Sauerstoff durch Zellen an der Oberfläche verbraucht; somit entstand in den tieferen Zellschichten zunächst eine Hypoxie. An den Tagen 3 – 6 nahm dann die Sauerstoffkonzentration kontinuierlich zu. Dieses Phänomen kann am ehesten dadurch begründet werden, dass bei einer BVUA von 0,5 ml/cm² nicht genügend Zellen vorhanden waren, damit der gesamte Sauerstoff verbraucht werden konnte. Zu Beginn wurde ein Teil des Sauerstoffs bis zu Tag 3 von den Zellen verbraucht. Danach adaptierten die Zellen möglicherweise an die niedrige Sauerstoffkonzentration und stellten ihren Metabolismus um. Zwischen Tag 6 und 7 konnte ein leichter Abfall der O₂-Konzentration gemessen werden. Diese Beobachtung könnte auch auf einen Abfall in der Gesamtzellzahl hin deuten.

Zwischen den hohen BVUA's von 0,75 und 1,5 ml/cm² ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, sodass der Grenzbereich für die Entstehung einer tiefen (<1% O₂), lang anhaltenden (7-tägigen) Hypoxie ab einer BVUA von $\geq 0,75$ ml/cm² festgelegt wurde. Diejenigen Zellen, die von einer tiefen perizellulären Hypoxie umgeben sind, können vermutlich dadurch überleben, indem sie ihren Stoffwechsel erfolgreich auf anaerobe Energiegewinnung umstellen.

In einer Studie von Forristal et al. wurde untersucht, ob das Sauerstoffangebot in der Umgebung von Zellen den Zellstoffwechsel reguliert [59]. Zu diesem Zwecke wurden humane embryonale Stammzellen (hESCs) sowohl unter 5% O₂, als auch unter 20% O₂ inkubiert. Die hESC's stellen eine ideale Zellart für diese Untersuchung dar, da sie pluripotent sind und ein enormes Regenerationspotential besitzen. Die hESCs konsumierten bei 5% O₂ signifikant mehr Glukose und produzierten signifikant mehr Laktat verglichen zu einer Inkubation unter 20% O₂. Korrelierend zu unseren

Ergebnissen konnten Forristal et. al. in ihrer Studie zeigen, dass pluripotente Stammzellen unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (5% O₂) weniger Sauerstoff konsumieren und ihre Energiegewinnung auf anaerobe Glykolyse umstellen konnten. Außerdem exprimierten hESCs unter 5% O₂ vermehrt Marker für Pluripotenz und proliferierten stärker als unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen. Bei allen untersuchten hESCs, unabhängig von der umgebenden Sauerstoffkonzentration, war Glukose das Hauptsubstrat zur Energiegewinnung. Der erhöhte Glukoseverbrauch unter hypoxischen Bedingungen weist auf eine enge Korrelation zwischen Zellstoffwechsel und Umgebungsbedingungen hin. Unter einem verringerten Sauerstoffangebot konnten die hESC's ihren Stoffwechsel auf Glykolyse umstellen. Die Glykolyse wird unter Hypoxie zur Hauptquelle der ATP-Gewinnung. Chen et. al. konnten zeigen, dass mesenchymale Stammzellen im undifferenzierten Zustand die Energiegewinnung vor allem durch Glykolyse bewerkstelligen [60]. Während einer osteogenen Differenzierung stellten die Stammzellen ihren Stoffwechsel auf aerobe Energiegewinnung durch oxydative Phosphorylierung um, da die ATP-Produktion hierdurch effizienter war [60]. In einer früheren Studie von Rajpurohit et al. konnte ebenfalls eine starke Korrelation zwischen dem Sauerstoffangebot und dem Zellmetabolismus-Pathway in Bezug auf Chondrozyten aus Hühnerembryonen gezeigt werden [61]. Die Anpassung an ein verändertes Sauerstoffangebot in der Umgebung verleiht Zellen eine elementare Überlebensstrategie. Rajpurohit et. al. konnten nachweisen, dass bei einer Zellinkubation unter vier verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen, von 0,04 % – 21 %O₂, der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion mit abnehmender O₂-Konzentration kontinuierlich zunahm [61]. Angesichts der Tatsache, dass Chondrozyten den Großteil ihres Daseins in einem physiologisch sehr hypoxischen Milieu verbringen, deuten diese Daten stark darauf hin, dass sich die Zellen ihrer Umgebung, ihrer Durchblutungssituation und ihrem Sauerstoffangebot durch Veränderungen im Zellstoffwechsel anpassen können.

Um die Auswirkungen einer zellinduzierten Hypoxie in unseren Versuchen zu verifizieren, wurde im nächsten Schritt die VEGF-Konzentration im Zellplasma nach 7-tägiger Inkubation unter der jeweiligen Bedingung gemessen. Während sich zwischen den beiden hohen BVUA's (0,75 und 1,5 ml/cm²)

keine signifikanten Unterschiede in der VEGF-Produktion durch die Zellen ergaben, war die VEGF-Produktion dieser Kulturen 1,5-fach höher im Vergleich zu einer BVUA von $0,5 \text{ ml/cm}^2$. Durch das Verändern der hypoxischen Zellexposition mit Anpassen der Blutzelldichte entstanden somit messbare Unterschiede in der angiogenetischen Faktorbildung. Die VEGF-Bildung im Frischplasma wurde als Negativkontrolle verwendet.

Eine Hoch-Regulierung der angiogenetischen Faktorbildung unter Hypoxie wurde in der Literatur bereits eingehend und umfassend beschrieben. Unsere bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Zellen ab einer bestimmten Zellkonzentration ohne den Einsatz eines Hypoxie-Inkubators eine perizelluläre, zellinduzierte Hypoxie hervorrufen können, die zu einer signifikant erhöhten Bildung der Angiogenesefaktoren führt.

Unsere folgenden Versuche zielten darauf ab, den zeitlichen Verlauf der pro- und anti-angiogenetischen Faktorenbildung bei einer hohen BVUA ($1,5 \text{ ml/cm}^2$) über 5 Tage aufzuzeigen. Nach einem kontinuierlichen Anstieg der VEGF-Konzentration über die ersten 2 Tage mit einem Maximum von $\sim 650 \text{ pg/ml}$ nahmen die VEGF-Level in den darauffolgenden 24 Stunden zunächst rapide ab. Schließlich konnte eine leichte Zunahme und Plateaubildung der VEGF-Konzentration an Tagen 4 und 5 vermessen werden; die VEGF-Konzentration war hierbei etwa doppelt so hoch wie zu Beginn. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die peripheren Blutzellen zunächst unter akutem hypoxischen Stress in den ersten zwei Tagen nach Exposition eine rasche und effektive pro-angiogenetische Antwort einleiten, vermutlich um das Zellüberleben unter vermindertem Sauerstoffangebot zu sichern. Zwischen den Tagen 2 und 3 trat vermutlich eine allmähliche Adaption der Zellen an die veränderten Umgebungsbedingungen ein, sodass die VEGF-Faktorbildung zunächst langsam absank. Zwischen den Tagen 3 bis 5 wurde schließlich eine Plateau-Konzentration von VEGF erreicht, die signifikant höher war als die Ausgangskonzentration, aber niedriger als die anfängliche Faktorbildung. Dieser Verlauf spricht deutlich dafür, dass die peripheren Blutzellen dazu in der Lage sind, sich ihren Umgebungsbedingungen genau anzupassen und die Angiogenesefaktor-Bildung auch mit der Dauer der Exposition eng korreliert.

Zusätzlich zur pro-angiogenetischen wurde auch die anti-angiogenetische Faktorbildung unter Hypoxie, repräsentiert durch Thrombospondin-1 (Tsp-1), untersucht. Tsp-1 ist ein kalziumbindendes Protein, das die Zellproliferation, die Migration und Apoptose über eine Vielzahl spezifischer Oberflächenrezeptoren reguliert [62]. Tsp-1 übernimmt seine Funktion als Regulatorprotein bei einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Bedingungen, wie z.B. bei Entzündungsprozessen, bei der Wundheilung, Angiogenese und Tumorprogression. Neben diesen Aufgaben ist Tsp-1 der Hauptaktivator für TGF- β (transforming growth factor β) und einer der wichtigsten Angiogenese-Inhibitoren [62]. Für unsere Versuche war die Funktion von Tsp-1 als starker Inhibitor der Angiogenese wegweisend.

Von Tag 0 bis 2 konnte zunächst ein Plateau der Tsp-1-Konzentration unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. Ab dem Tag 2 bis 5 nahm die Tsp-1-Konzentration kontinuierlich ab. Die Abnahme des anti-angiogenetischen Faktors in diesem Zeitraum korrelierte mit der zunehmenden VEGF-Produktion von Tag 3 bis 5. Somit zeigte sich, dass unter anhaltender Hypoxie der pro-angiogenetische Weg durch die peripheren Blutzellen bevorzugt wurde, und der anti-angiogenetische Pathway im Sinne des Zellüberlebens stark abnahm ($p < 0,05$).

5.2.2 Eine zellinduzierte Hypoxie ist vergleichbar mit einer extern-kontrollierten Hypoxie

Nachdem in den bisherigen Versuchen die Effektivität und das Potential einer perizellulären Hypoxie in Hinblick auf die vermehrte Bildung von Angiogenesefaktoren aufgezeigt werden konnte, soll im Folgenden ein Vergleich zwischen zellinduzierter und extern-kontrollierter Hypoxie erarbeitet werden.

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass ohne die Verwendung eines Hypoxie-Inkubators eine perizelluläre Hypoxie hervorgerufen werden kann, die durch die Zellen selbst entsteht. Die VEGF-Konzentrationen nach 5-tägiger Inkubation zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen a) einer Inkubation im Hypoxie-Inkubator mit 3% O₂ und b) einer zellinduzierten, perizellulären Hypoxie durch Auswählen einer BVUA von 1,0 ml/cm². Für eine mögliche therapeutische Anwendung dieser Erkenntnisse sind diese Ergebnisse vielversprechend, da auf diese Weise der kostspielige und aufwändige Gebrauch von Hypoxie-Inkubatoren möglicherweise umgangen werden kann. Die VEGF-Konzentration von Frischplasma wurde als Negativkontrolle mit untersucht: die VEGF-Konzentrationen unter Hypoxie waren etwa 8-fach höher als in Frischplasma. Um den Vergleich der anti-angiogenetischen Faktorenbildung unter zelleigener bzw. extern-kontrollierter Hypoxie aufzuzeigen, wurde zusätzlich Tsp-1 aus den Zellüberständen nach 5 Tagen bestimmt. Auch hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen zellinduzierter und extern-kontrollierter Hypoxie. Die Tsp-1-Konzentration in Frischplasma war etwa doppelt so hoch wie unter Hypoxie. Diese Ergebnisse weisen korrelierend zur VEGF-Produktion auf eine Hochregulierung der Angiogenese unter einer hypoxischen Umgebung hin.

Zu Beginn wurde bereits kurz ein neues System von Hadjipanayi et al. vorgestellt, um die Heilung chronischer Wunden zu verbessern [63]. Periphere Blutzellen, die kostengünstig und einfach vom Patienten durch eine venöse Blutentnahme entnommen werden können, dienen hierbei als

„Lieferanten“ für Angiogenesefaktoren. Die pro-angiogenetischen Faktoren werden unter einer zellinduzierten, kurzzeitigen Hypoxie gebildet. Mittels einem eigens dafür hergestellten Bioreaktor [63] ist die Erzeugung und Applikation von Angiogenesefaktoren zur Stimulation chronischer, nicht heilender Wunden möglich.

Ein technisches Problem in der Umsetzung dieser Idee war die Tatsache, dass zur Herstellung eines hypoxischen Milieus ein Hypoxie-Inkubator benötigt wird. Durch unsere Versuche gelang es zu belegen, dass eine perizelluläre Hypoxie auch durch die Zellen selbst durch eine gezielte Auswahl ihrer Dichte hervorgerufen werden kann.

5.3 Überblick und mögliche therapeutische Anwendungen einer hypoxischen Präkonditionierung

Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, ausgedehnte klinische Studien durch Anwenden unserer Erkenntnisse durchzuführen, soll im Folgenden ein Überblick zur aktuellen Entwicklung auf diesem Gebiet aufgezeigt werden.

Es wurde bereits erwähnt, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark oder Fettgewebe [42] physiologisch einem hypoxischen Microenvironment [64] ausgesetzt sind, aber dass die MSC's in Laboruntersuchungen unter weitaus höheren, atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen (21% O₂) inkubiert werden. Beegle et al. verdeutlichen, dass die therapeutische Applikation mesenchymaler Stammzellen meist in einem hypoxischen Milieu erfolgt [64]. Daher ist die Zellreaktion der MSC's auf verschiedene Hypoxiegrade von erheblicher Bedeutung. Beegle et al. konnten zeigen, dass eine hypoxische Präkonditionierung (1% O₂) von 48 Stunden Dauer zu einem verlängerten Zellüberleben nach intramuskulärer Zellinjektion in immundefiziente Mäuse im Vergleich zu normoxischer Inkubation führte [64]. Somit haben die Erkenntnisse über die Zellviabilität unter Hypoxie erheblichen Einfluss auf therapeutische Anwendungen der Stammzellen.

Zahlreiche Studien befassen sich mit dem protektiven Potential einer hypoxischen Präkonditionierung. Bouroujerdi et. al. konnten aufzeigen, dass eine milde Hypoxie von 12 – 13% O₂ zu einer verbesserten Vaskularisierung im Gehirn von Mäusen führte [65]. Da viele neurologische Erkrankungen auf einer dysfunktionalen Durchblutung beruhen, wie beispielsweise beim ischämischen Schlaganfall, der multiplen Sklerose oder bei der vaskulären Demenz, lohnt es sich, neue Therapieansätze zu verfolgen, die die Gewebsperfusion verbessern. Eine milde hypoxische Präkonditionierung soll als neuroprotektiver Ansatz zu einer signifikanten Verminderung von Spätschäden führen [66]. Dieser Mechanismus existiert bereits natürlicherweise in Form der transienten Ischämischen Attacke (TIA): diese führt an sich

zu keiner strukturellen neuronalen Schädigung, führt jedoch zu einem Schutz vor einem möglichen nachfolgenden Schlaganfall [66]. Eine andere Gruppe stellte fest, dass es nach einer zerebralen Ischämie zu einer durch kurzzeitige Hypoxie induzierten VEGF-Expression im Grenzgebiet zum Infarkt und konsekutiv zur Gefäßneubildung kommt [67].

Ischämische Schäden am Myokard stellen angesichts der hohen Morbidität und Mortalität in westlichen Industrienationen ein globales Problem dar. Aktuell gibt es Versuche für eine Stammzelltherapie am Herzen, um die Neoangiogenese und die Durchblutung des minderperfundierten Myokards zu fördern. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen, die vor ihrer Transplantation in das Myokard hypoxisch präkonditioniert wurden, zu einem kleineren Infarktareal führten und die kardiale Pumpfunktion verbesserten [68]. Hu et. al. konnten in einer Studie nachweisen, dass eine hypoxische Präkonditionierung mesenchymaler Stammzellen ihr Regenerationspotenzial nach einer Transplantation in geschädigtes Myokard signifikant erhöht [69]. Zudem führt die hypoxische Präkonditionierung zu einer verminderten Apoptose der implantierten Zellen sowie zu einer vermehrten Angiogenese [69]. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich in einer Studie von Sasaki et. al.: die Gruppe untersuchte im Tiermodell Mäuse, die entweder ein hypoxisches Luftgemisch oder ein Luftgemisch, welches atmosphärischen Raumbedingungen entsprach, vier Stunden lang inhalierten [70]. Nach dem Setzen des Myokardinfarkts wiesen die hypoxisch präkonditionierten Mäuse signifikant höhere VEGF-Konzentrationen, sowie eine erhöhte Kapillardichte im Myokard und eine verminderte Zellapoptose-Rate auf.

In einer anderen Studie setzten Kubo et. al. periphere mononukleäre Blutzellen im Tiermodell aus Mäusen für 24 h einer starken Hypoxie (2% O₂), sowie einer Temperatur von 33°C aus und implantierten die Zellen anschließend in minderperfundiertes Muskelgewebe der unteren Extremität [71]. Im Vergleich zu normoxisch kultivierten Zellen führte die Implantation der hypoxisch präkonditionierten Zellen zu einer erhöhten Expression zytoprotektiver Gene im Zielgewebe, zu einer erhöhten Toleranz gegenüber

oxidativem Stress, sowie zu einer erhöhten Gefäßdichte und einer verbesserten Perfusion des Muskelgewebes.

Die Applikationswege für mesenchymale Stammzellen, sowie deren Migration zum Ort der Gewebsschädigung konnten in verschiedenen Studien gezeigt werden. Sowohl bei einer systemischen, also intravenösen oder intraarteriellen Injektion von Stammzellen, als auch bei einer lokalen Zellapplikation in das Gewebe, konnte eine Akkumulation der Stammzellen am Ort der Organschädigung [72] nachgewiesen werden. Die Stammzellen reagieren auf lokal ausgeschüttete Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren zum Zeitpunkt der Organschädigung und können durch das Endothel zum verwundeten Gewebe hin migrieren [72]. Die MSC's aktivieren vermehrt Selektine und Integrine und können auf diese Weise mit dem Endothel interagieren. Intravenös verabreichte BBMSC's bei Ratten mit Myokardinfarkt konnten in der Infarktregion nachgewiesen werden und die ventrikuläre Funktion verbessern [73]. Die Stammzellen konnten sowohl mithilfe verschiedener Marker, wie beispielsweise fluoreszierenden Proteinen oder Markergenen, als auch immunhistochemisch im Zielgewebe nachgewiesen werden [73].

Die Idee der hypoxischen Präkonditionierung kommt auch bei weiteren Zellarten zum Einsatz. Hadjipanayi et al. beschreiben, dass hypoxische Umgebungsbedingungen auf Dauer eine verminderte Fähigkeit der Zellen zur Produktion von Angiogenesefaktoren zur Folge hat [34]. Laut Hadjipanayi et al. scheinen sich die Zellen an die Hypoxie zu gewöhnen und stellen somit die Hypoxie-induzierte Kaskade zur Bildung von Angiogenesefaktoren ein. Dies hat zur Folge, dass weniger Kapillaren und weniger Blutgefäße entstehen. Um diesen Teufelskreis zu durchbrechen, und dem durch Ischämie geschädigten Gewebe die fehlenden Angiogenesefaktoren zuführen zu können, zeigen Hadjipanayi et al. eine mögliche Lösung auf. Durch hypoxisches Präkonditionieren peripherer Blutzellen werden diese durch Aktivierung von HIF-1 α zur Produktion von Angiogenesefaktoren, allen voran VEGF, angeregt [34]. Die Gruppe von Schilling et al. stellen ein neues System zur lokalen Applikation der aus peripherem hypoxisch präkonditioniertem Blutzellen gewonnenen Angiogenesefaktoren vor [74, 75].

So sehr diese Studienergebnisse für den Einsatz pro-angiogenetischer Faktoren in der modernen Therapie ischämischer Läsionen sprechen, gibt es doch einige Aspekte, die gegen diese therapeutische Option sprechen. Schultz et. al. haben in einer Studie mit Patienten, die an einer Koronarstenose litten, und jeweils Kollateralgefäße bzw. keine Kollateralen in der Koronarangiographie zeigten, durchgeführt [76]. Die Patienten wiesen jeweils unterschiedliche VEGF-Konzentrationen nach der gleichen hypoxischen Exposition auf. Diejenigen Patienten mit 2 oder mehr Kollateralgefäßen wiesen deutlich erhöhte VEGF-Level nach hypoxischer Inkubation auf als jene, die weniger oder keine Kollateralgefäße besaßen [76]. Diese interindividuelle Heterogenität in der VEGF-Produktion nach einem hypoxischen Reiz stellt nur eine der zukünftigen Fragestellungen dar, die es zu klären gilt.

Weiterhin unklar bleibt, wie sich Geschlecht, Alter, Ko-Morbiditäten, genetische und epigenetische Mechanismen auf die VEGF-Produktion auswirken. Die Anwendung neuer Therapiekonzepte im klinischen Alltag zur Verbesserung der Angiogenese bleibt weiterhin Gegenstand aktueller Untersuchungen.

6 Zusammenfassung

Die Anpassung von physikalischen Umgebungsparametern von Zellen stellt eine effektive Methode dar, um das Zellüberleben und die Zellfunktion maßgeblich zu verbessern.

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass nicht nur durch eine Hypoxie (3% O₂), sondern auch durch die Auswahl einer niedrigen Temperatur (30,0°C – 33,7°C) die Viabilität und Funktionalität von mesenchymalen Stammzellen signifikant verbessert werden kann. Durch diese einfachen Maßnahmen konnte ein deutlicher, positiver Einfluss auf das Zellüberleben über 7 Tage hinweg erzielt werden. Es wurde auch deutlich, dass die Dauer der Exposition maßgebliche Auswirkungen auf die Vitalität der MSC's hatte.

Als eine mögliche Anwendung unserer Ergebnisse wurde beispielweise die hypoxische Präkonditionierung oder ein mildes Kühlen von Zellen vor ihrer Transplantation aufgezeigt.

Es bleibt jedoch weiterhin in zukünftigen Studien zu untersuchen, wie sich die hieraus gewonnenen Erkenntnisse in vivo am Patienten auswirken, und ob eine signifikante Verbesserung der Wundheilung im lebenden Organismus durch die genannten Maßnahmen erreicht werden kann.

Bei der Untersuchung peripherer Blutzellen, von denen vor allem die peripheren mononukleären Zellen (PMNBCs) zu nennen sind, hat sich gezeigt, dass eine selbst induzierte, ohne Verwendung eines externen Hypoxie-Inkubators erzeugte Hypoxie durch ein gezieltes Auswählen der BVUA $\geq 0,75$ ml/cm² hergestellt werden kann (siehe Abbildung 14). Dabei unterscheidet sich die Menge an gebildeten Angiogenesefaktoren, entsprechend VEGF in unserer Versuchsreihe, nicht signifikant von der Menge, die unter einer extern-kontrollierten Hypoxie erzeugt wird.

Als Beispiel für eine mögliche Anwendung im klinischen Alltag zur Verbesserung der Wundheilung wurde die Applikation von Angiogenesefaktoren aus hypoxisch präkonditionierten peripheren Blutzellen diskutiert.

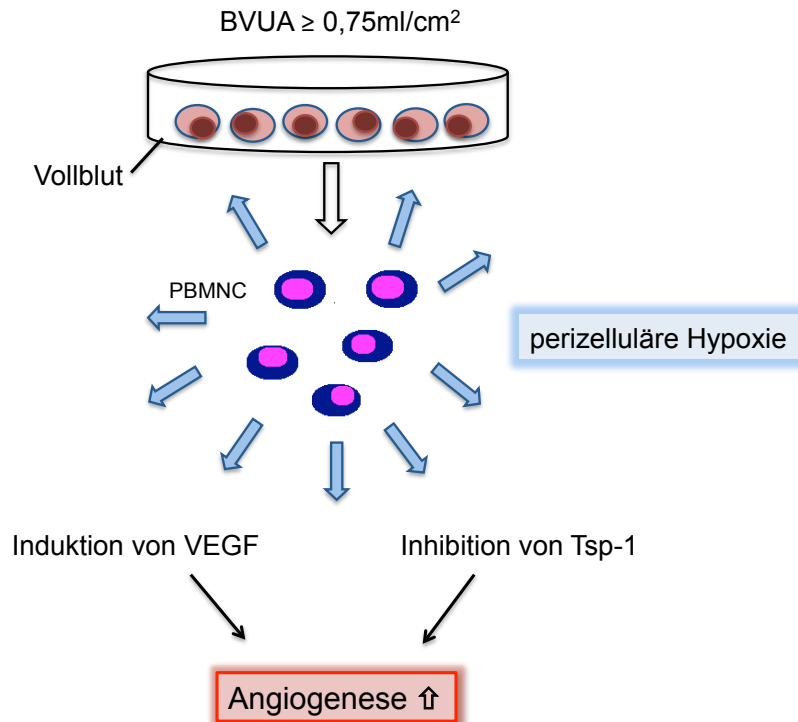


Abbildung 14: Schematische Darstellung für die VEGF-Produktion durch hypoxisch präkonditionierte periphere Blutzellen bei einer BVUA $\geq 0,75 \text{ ml/cm}^2$.

Durch das Auswählen einer ausreichend hohen Zelldichte konnte eine perizelluläre Hypoxie $<1\% \text{ O}_2$ über 7 Tage hinweg entstehen. Die Bildung von Angiogenesefaktoren war bei hypoxisch präkonditionierten Zellen signifikant höher: Die VEGF-Plasma-Level nach 7 Tagen hypoxischer Kultur bei entsprechend hoher BVUA waren signifikant höher verglichen mit niedrigerer BVUA. Die Bildung des anti-angiogenetischen Faktors Tsp-1 nahm unter Hypoxie signifikant verglichen zur Ausgangskonzentration ab.

7 Literaturverzeichnis

1. Jackson, W.M., Nesti, L.J., and Tuan, R.S.: *Concise review: Clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells*. Stem Cells Transl Med, 2012. 1(1): p. 44-50.
2. Reinke, J.M., and Sorg, H.: *Wound repair and regeneration*. Eur Surg Res, 2012. 49(1): p. 35-43.
3. Witte, M.B., and Barbul, A.: *General principles of wound healing*. Surg Clin North Am, 1997. 77(3): p. 509-28.
4. Goldman, R.: *Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future*. Adv Skin Wound Care, 2004. 17(1): p. 24-35.
5. Cross, K.J., and Mustoe, T.A.: *Growth factors in wound healing*. Surg Clin North Am, 2003. 83(3): p. 531-45, vi.
6. Singer, A.J., and Clark, R.A.: *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. 341(10): p. 738-46.
7. Ueno, C., Hunt, T.K., and Hopf, H.W.: *Using physiology to improve surgical wound outcomes*. Plast Reconstr Surg, 2006. 117(7 Suppl): p. 59S-71S.
8. Broughton, G. 2nd, Janis, J.E., and Attinger, C.E.: *The basic science of wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2006. 117(7 Suppl): p. 12S-34S.
9. Leibovich, S.J., and Ross, R.: *The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum*. Am J Pathol, 1975. 78(1): p. 71-100.
10. Broughton, G. 2nd, Janis, J.E., and Attinger, C.E.: *Wound healing: an overview*. Plast Reconstr Surg, 2006. 117(7 Suppl): p. 1e-S-32e-S.
11. Park, J.E., and Barbul, A.: *Understanding the role of immune regulation in wound healing*. Am J Surg, 2004. 187(5A): p. 11S-16S.
12. Diegelmann, R.F., and Evans, M.C.: *Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing*. Front Biosci, 2004. 9: p. 283-9.
13. Martin, P., and Leibovich, S.J.: *Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly*. Trends Cell Biol, 2005. 15(11): p. 599-607.

14. Mast, B.A., and Schultz, G.S.: *Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds*. Wound Repair Regen, 1996. 4(4): p. 411-20.
15. Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Altmann, B.W., Deuel, T.F., and Thomason, A.: *Role of platelet-derived growth factor in wound healing*. J Cell Biochem, 1991. 45(4): p. 319-26.
16. Montesano, R. and Orci, L.: *Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(13): p. 4894-7.
17. Hinz, B.: *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair*. J Invest Dermatol, 2007. 127(3): p. 526-37.
18. Ehrlich, H.P., and Hunt, T.K.: *Collagen Organization Critical Role in Wound Contraction*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2012. 1(1): p. 3-9.
19. Janis, J.E., and Harrison, B.: *Wound healing: part I. Basic science*. Plast Reconstr Surg, 2014. 133(2): p. 199e-207e.
20. Inoue, M., Kratz, G., Haegerstrand, A., and Ståhle-Bäckdahl, M.: *Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after acute injury in human skin, persists during healing, and stops at re-epithelialization*. J Invest Dermatol, 1995. 104(4): p. 479-83.
21. Bowler, P.G.: *Wound pathophysiology, infection and therapeutic options*. Ann Med, 2002. 34(6): p. 419-27.
22. Jones, S.G., Edwards, R., and Thomas, D.W.: *Inflammation and wound healing: the role of bacteria in the immuno-regulation of wound healing*. Int J Low Extrem Wounds, 2004. 3(4): p. 201-8.
23. Mustoe, T.A., O'Shaughnessy, K., and Kloeters, O.: *Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis*. Plast Reconstr Surg, 2006. 117(7 Suppl): p. 35S-41S.
24. Medina, A., Scott, P.G., Ghahary A., and Tredget, E.E.: *Pathophysiology of chronic nonhealing wounds*. J Burn Care Rehabil, 2005. 26(4): p. 306-19.
25. Edwards, R., and Harding, K.G.: *Bacteria and wound healing*. Curr Opin Infect Dis, 2004. 17(2): p. 91-6.

26. Robson, M.C.: *Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria*. Surg Clin North Am, 1997. 77(3): p. 637-50.
27. Sitkovsky, M., and Lukashev, D.: *Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(9): p. 712-21.
28. Jonsson, K., Jensen, J.A., Goodson, W.H. 3rd, Scheuenstuhl, H., West, J., Hopf, H.W., and Hunt, T.K.: *Tissue oxygenation, anemia, and perfusion in relation to wound healing in surgical patients*. Ann Surg, 1991. 214(5): p. 605-13.
29. Robson, M.C., Dubay, D.A., Wang, X., and Franz, M.G.: *Effect of cytokine growth factors on the prevention of acute wound failure*. Wound Repair Regen, 2004. 12(1): p. 38-43.
30. Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J.: *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. Nat Med, 2003. 9(6): p. 677-84.
31. Tian, H., McKnight, S.L., and Russell, D.W.: *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells*. Genes Dev, 1997. 11(1): p. 72-82.
32. Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J.: *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. 9(6): p. 669-76.
33. Namiki, A., Brogi, E., Kearney, M., Kim, E.A., Wu, T., Couffinhal, T., Varticovski, L., and Isner, J.M.: *Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells*. J Biol Chem, 1995. 270(52): p. 31189-95.
34. Hadjipanayi, E., and Schilling, A.F.: *Hypoxia-based strategies for angiogenic induction: the dawn of a new era for ischemia therapy and tissue regeneration*. Organogenesis, 2013. 9(4): p. 261-72.
35. Byrne, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., and Harmey, J.H.: *Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)*. J Cell Mol Med, 2005. 9(4): p. 777-94.
36. Hassan, W.U., Greiser, U., and Wang, W: *Role of adipose-derived stem cells in wound healing*. Wound Repair Regen, 2014. 22(3): p. 313-25.
37. Valorani, M.G., Montelatici, E., Germani, A., Biddle, A., D'Alessandro, D., Strollo, R., Patrizi, M.P., Lazzari, L., Nye, E., Otto, W.R., Pozzilli, P.,

- and Alison, M.R.: *Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials*. Cell Prolif, 2012. 45(3): p. 225-38.
38. Hass, R., and Otte, A.: *Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment*. Cell Commun Signal, 2012. 10(1): p. 26.
39. Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., and Shimizu, H.: *Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type*. J Immunol, 2008. 180(4): p. 2581-7.
40. Rodriguez-Menocal, L., Salgado, M., Ford, D., and Van Badiavas, E.: *Stimulation of skin and wound fibroblast migration by mesenchymal stem cells derived from normal donors and chronic wound patients*. Stem Cells Transl Med, 2012. 1(3): p. 221-9.
41. Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitingger, S., Kloss, F., Gully, C., Gassner, R., and Lepperdinger, G.: *Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan*. Aging Cell, 2007. 6(6): p. 745-57.
42. Satija, N.K., Singh, V.K., Verma, Y.K., Gupta, P., Sharma, S., Afrin, F., Sharma, M., Sharma, P., Tripathi, R.P., and Gurudutta, G.U.: *Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine*. J Cell Mol Med, 2009. 13(11-12): p. 4385-402.
43. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., and Ringdén, O.: *HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells*. Exp Hematol, 2003. 31(10): p. 890-6.
44. Liu, Y., and Ma, T.: *Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application*. Biotechnol Prog, 2015. 31(2): p. 468-81.
45. Liechty, K.W., MacKenzie, T.C., Shaaban, A.F., Radu, A., Moseley, A.M., Deans, R., Marshak, D.R., and Flake, A.W.: *Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific*

- differentiation after in utero transplantation in sheep*. Nat Med, 2000. 6(11): p. 1282-6.
46. Lazarus, H.M., Koc, O.N., Devine, S.M., Curtin, P., Maziarz, R.T., Holland, H.K., Shpall, E.J., McCarthy, P., Atkinson, K., Cooper, B.W., Gerson, S.L., Laughlin, M.J., Loberiza, F.R. Jr., Moseley, A.B., and Bacigalupo, A.: *Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. 11(5): p. 389-98.
47. Fotia, C., Massa, A., Boriani, F., Baldini, N., and Granchi, D.: *Prolonged exposure to hypoxic milieu improves the osteogenic potential of adipose derived stem cells*. J Cell Biochem, 2015. 116(7): p. 1442-53.
48. Haque, N., Rahman, M.T., Abu Kasim, N.H., and Alabsi, A.M.: *Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy*. ScientificWorldJournal, 2013. 2013: p. 632972.
49. Leroux, L., Descamps, B., Tojais, N.F., Séguy, B., Oses, P., Moreau, C., Daret, D., Ivanovic, Z., Boiron, J.M., Lamazière, J.M., Dufourcq, P., Couffinhal, T., and Duplâa, C.: *Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway*. Mol Ther, 2010. 18(8): p. 1545-52.
50. Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., and Nolte, J.A.: *Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2008. 26(8): p. 2173-82.
51. Xu, X., Cowley, S., Flaim, C.J., James, W., Seymour, L., and Cui, Z.: *The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells*. Biotechnol Prog, 2010. 26(3): p. 827-37.
52. Xu, X., Liu, Y., Cui, Z., Wei, Y., and Zhang, L.: *Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation*. J Biotechnol, 2012. 162(2-3): p. 224-31.

53. Beere, H.M.: *"The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 13): p. 2641-51.
54. Alekseenko, L.L., Zemelko, V.I., Zenin, V.V., Pugovkina, N.A., Kozhukharova, I.V., Kovaleva, Z.V., Grinchuk, T.M., Fridlyanskaya, I.I., and Nikolsky, N.N.: *Heat shock induces apoptosis in human embryonic stem cells but a premature senescence phenotype in their differentiated progeny*. Cell Cycle, 2012. 11(17): p. 3260-9.
55. Reissis, Y., García-Gareta, E., Korda, M., Blunn, G.W., and Hua, J.: *The effect of temperature on the viability of human mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2013. 4(6): p. 139.
56. Hales, J.R., and Sakurada, S.: *Heat tolerance. A role for fever?* Ann N Y Acad Sci, 1998. 856: p. 188-205.
57. Kluger, M.J., Kozak, W., Conn, C.A., Leon, L.R., and Soszynski, D.: *Role of fever in disease*. Ann N Y Acad Sci, 1998. 856: p. 224-33.
58. Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., Felix, R., and Riess, H.: *The cellular and molecular basis of hyperthermia*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. 43(1): p. 33-56.
59. Forristal, C.E., Christensen, D.R., Chinnery, F.E., Petruzzelli, R., Parry, K.L., Sanchez-Elsner, T., and Houghton, F.D.: *Environmental oxygen tension regulates the energy metabolism and self-renewal of human embryonic stem cells*. PLoS One, 2013. 8(5): p. e62507.
60. Chen, C.T., Shih, Y.R., Kuo, T.K., Lee, O.K., and Wei, Y.H.: *Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2008. 26(4): p. 960-8.
61. Rajpurohit, R., Koch, C.J., Tao, Z., Teixeira, C.M., and Shapiro, I.M.: *Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism*. J Cell Physiol, 1996. 168(2): p. 424-32.
62. Chen, H., Herndon, M.E., and Lawler, J.: *The cell biology of thrombospondin-1*. Matrix Biol, 2000. 19(7): p. 597-614.
63. Hadjipanayi, E., Bauer, A.T., Moog, P., Salgin, B., Kuekrek, H., Fersch, B., Hopfner, U., Meissner, T., Schlüter, A., Ninkovic, M., Machens, H.G., and Schilling, A.F.: *Cell-free carrier system for localized delivery*

- of peripheral blood cell-derived engineered factor signaling: towards development of a one-step device for autologous angiogenic therapy.* J Control Release, 2013. 169(1-2): p. 91-102.
64. Beegle, J., Lakatos, K., Kalomoiris, S., Stewart, H., Isseroff, R.R., Nolte, J.A., and Fierro, F.A.: *Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo.* Stem Cells, 2015. 33(6): p. 1818-28.
65. Boroujerdi, A., and Milner, R.: *Defining the critical hypoxic threshold that promotes vascular remodeling in the brain.* Exp Neurol, 2015. 263: p. 132-40.
66. Dirnagl, U., Simon, R.P., and Hallenbeck, J.M.: *Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection.* Trends Neurosci, 2003. **26**(5): p. 248-54.
67. Marti, H.J., Bernaudin, M., Bellail, A., Schoch, H., Euler, M., Petit, E., and Risau, W.: *Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia.* Am J Pathol, 2000. 156(3): p. 965-76.
68. Der Sarkissian, S., Lévesque, T., and Noiseux, N.: *Optimizing stem cells for cardiac repair: Current status and new frontiers in regenerative cardiology.* World J Stem Cells, 2017. 9(1): p. 9-25.
69. Hu, X., Yu, S.P., Fraser, J.L., Lu, Z., Ogle, M.E., Wang, J.A., and Wei, L.: *Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2008. 135(4): p. 799-808.
70. Sasaki, H., Fukuda, S., Otani, H., Zhu, L., Yamaura, G., Engelman, R.M., Das, D.K., and Maulik, N.: *Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction.* J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(3): p. 335-48.
71. Kubo, M., Li, T.S., Suzuki, R., Shirasawa, B., Morikage, N., Ohshima, M., Qin, S.L., and Hamano, K.: *Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(2): p. H590-5.

72. Kang, S.K., Shin, I.S., Ko, M.S., Jo, J.Y., and Ra, J.C.: *Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy*. Stem Cells Int, 2012. 2012: p. 342968.
73. Saito, T., Kuang, J.Q., Bittira, B., Al-Khaldi, A., and Chiu, R.C.: *Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells*. Ann Thorac Surg, 2002. 74(1): p. 19-24; discussion 24.
74. Hadjipanayi, E., Cheema, U., Hopfner, U., Bauer, A., Machens, H.G., and Schilling, A.F.: *Injectable system for spatio-temporally controlled delivery of hypoxia-induced angiogenic signalling*. J Control Release, 2012. 161(3): p. 852-60.
75. Hadjipanayi, E., Cheema, U., Mudera, V., Deng, D., Liu, W., and Brown, R.A.: *First implantable device for hypoxia-mediated angiogenic induction*. J Control Release, 2011. **153**(3): p. 217-24.
76. Schultz, A., Lavie, L., Hochberg, I., Beyar, R., Stone, T., Skorecki, K., Lavie, P., Roguin, A., and Levy, A.P.: *Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation*. Circulation, 1999. 100(5): p. 547-52.

8 Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz besonders herzlich bei Herrn Prof. Dr. A. F. Schilling für das Auswählen dieses äußerst interessanten und aktuellen Forschungsthemas, die uneingeschränkte Unterstützung bei der Umsetzung der Experimente und die intensive Betreuung bei der gesamten Arbeit in jeglicher Hinsicht bedanken. Für seine Geduld, seine Motivation und seine wertvollen Ratschläge während der gesamten Entwicklung dieser Arbeit bin ich sehr dankbar. Ich hätte mir keine bessere Betreuung und Koordination meiner Dissertation vorstellen können.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. E. Hadjipanayi, für die tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung der komplexen Versuche sowie die tägliche intensive Zusammenarbeit und die geistreichen Besprechungen bedanken. Sein Engagement bezüglich dieser Arbeit haben mein Wissen und mein Können maßgeblich gefördert und stark erweitert.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Mitarbeitern Labors für experimentelle plastische Chirurgie. Frau U. Hopfner und Frau M. Kirsch standen mir bei allen Experimenten freundlich, kompetent und hilfsbereit zur Seite und haben mich sehr unterstützt.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Frau Zara Jerbashyan und Herrn Dr. Razmik Mirzoyan, für ihre liebevolle Unterstützung, ihren unentwegten Rückhalt und für ihren stetigen Zuspruch herzlich bedanken. Ohne ihren Halt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

9 Anlagen

Publikationen:

Ektoras Hadjipanayi, Peer-Hendrik Kuhn, Philipp Moog , Anna-Theresa Bauer, Haydar Kuekrek, Lilit Mirzoyan, Anja Hummel, Katharina Kirchhoff, Burak Salgin, Sarah Isenburg, Ulf Dornseifer, Milomir Ninkovic, Hans-Günther Machens, Arndt F. Schilling. *The Fibrin Matrix Regulates Angiogenic Responses within the Hemostatic Microenvironment through Biochemical Control*. PLoS One. 2015; 10(8): e0135618.

Vorträge:

08.10. – 10.10.2015 bei den 19. Chirurgischen Forschungstagen in Würzburg
Vortrag zum Thema „*Zell-induzierte Hypoxie initiiert die Produktion von angiogenetischen Faktoren in peripheren Blutzellen*“

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

München, den 29.01.2019

Lilit Mirzoyan