

**Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der
Medizinischen Fakultät**

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

**Die Interaktion von mikrovaskulären Endothelzellen und adipösen
Stammzellen in vitro vor dem Hintergrund der Weichgewebeheilung**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

Vorgelegt von:

Sophie Eugenie Viktoria Bachmann

Geboren am 18. September 1993

in Püttlingen

Dekan: Prof. Dr. Michael Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Oberringer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Henning Madry

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2024

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	I
II	Abkürzungsverzeichnis.....	4
1	Zusammenfassung.....	1
	Summary.....	4
2	Einleitung.....	7
2.1	Der Weichgewebeschaaden	7
2.2	Physiologie der Wundheilung.....	8
2.3	Pathophysiologie der Wundheilung	16
2.4	Etablierte Behandlungskonzepte chronischer Wunden	18
2.5	Neue Therapieoptionen.....	20
2.6	Fragestellungen	24
3	Material und Methoden.....	26
3.1	Zellkultivierung.....	26
3.1.1	Anlegen der „Master-Zellbanken“ und Kryokonservierung	27
3.1.2	Kultivierung der HDMEC	27
3.1.3	Kultivierung der ADSC	29
3.1.4	Co-Kultivierung.....	30
3.2	Modifizierter “Co-Culture Scratch Wound Migration Assay”	30
3.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	33
3.3.1	Verwendete Antikörper.....	33
3.3.2	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung.....	34
3.4	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	35
3.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	39
3.5.1	Prinzip des ELISA	39
3.5.2	Durchführung	40
3.6	Statistische Auswertung.....	41

3.7	Übersicht Geräte, Zellen, Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	41
4	Ergebnisse	44
4.1	Proliferation - Zelldichte	44
4.1.1	Mono-Kultur: HDMEC.....	44
4.1.2	Mono-Kultur: ADSC.....	45
4.1.3	Co-Kultur.....	46
4.2	Proliferation - Zellzyklus	49
4.2.1	Mono-Kultur: HDMEC.....	49
4.2.2	Mono-Kultur: ADSC.....	50
4.2.3	Co-Kultur.....	50
4.3	Apoptose.....	52
4.3.1	Mono-Kultur: HDMEC.....	53
4.3.2	Mono-Kultur: ADSC.....	53
4.3.3	Co-Kultur.....	54
4.4	Migration.....	56
4.4.1	Mono-Kultur: HDMEC.....	56
4.4.2	Mono-Kultur: ADSC.....	57
4.4.3	Co-Kultur.....	58
4.5	Differenzierung der ADSC zu einer myofibroblastoiden Zelle	59
4.5.1	Mono-Kultur: ADSC.....	59
4.5.2	Co-Kultur.....	60
4.6	Zytokin-Bestimmung	62
4.6.1	Interleukin-6	62
4.6.2	Interleukin-8	65
4.6.3	Monocyte Chemoattractant Protein-1	68
4.6.4	Vascular Endothelial Growth Factor	70
5	Diskussion	73
5.1	Methodik	73

5.2	Ergebnisse	76
6	Literaturverzeichnis.....	85
6.1	Originalliteratur	85
6.2	Zusätzliche Dokumente.....	107
7	Anhang.....	108
7.1	Publikationen	108
7.2	Danksagung.....	109
8	Lebenslauf	110

II Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
α-SMA	α-smooth muscle actin
ADSC	Adipose Derived Stem Cell (Adipöse Stammzelle)
ADSC-BM	ADSC-Basalmedium
ANOVA	Analysis of Variance
AK	Antikörper
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMSC	Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cell (Knochenmarksstammzelle)
BSA	Bovine serum albumine
CCSWMA	Co-culture scratch wound migration assay
CD	Cluster of Differentiation
CK	Co-Kultur
CKM	Co-Kultur-Medium
CO ₂	Kohlendioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGM	Endothelial Growth Medium
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESC	Embryonale Stammzelle
EZM	Extrazelluläre Matrix
FF	Färbefeld
GaM	Goat-Anti-Mouse
GaR	Goat-anti-Rabbit
GF	Gesichtsfeld
H	Hypoxie
h	Stunden
H/R	Hypoxie gefolgt von Reoxygenierung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBOT	Hyperbare Sauerstofftherapie
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzelle
HIF	Hypoxia-inducible factor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IL-1	Interleukin-1
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
iPSC	induzierte pluripotente Stammzelle

KCl	Kaliumchlorid
KM	Konditioniertes Medium
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MK	Mono-Kultur
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
pg	Pikogramm
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MZB	Master-Zellbank
OT	Objekträger
P	Passage
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	PBS-Tween
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunden
sd	Standardabweichung (Standard Deviation)
SASP	Senescence Associated Secretory Phenotype
SVF	Stromale Vaskuläre Fraktion
TE	Tissue Engineering
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF- α	Tumor Necrosis-Factor- α
U	Umdrehungen
VAC	Vacuum-assisted closure
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	Von-Willebrand-Faktor

1 Zusammenfassung

Die zunehmende Alterung der Gesellschaft führt weltweit zu einer steigenden Inzidenz chronischer Wunden und chronischer Weichgewebeschäden. Diese sind besonders häufig mit Erkrankungen wie chronisch venöser Insuffizienz, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Diabetes Mellitus sowie mit Immobilität assoziiert. Bei solchen chronischen Wunden bzw. Weichgewebeschäden läuft die Gewebeheilung gestört ab. Normalerweise heilt eine Wunde in 4 sich überlappenden Phasen ab, beginnend mit der Hämostase, der sich die Inflammationsphase anschließt. Diese geht in die Proliferationsphase über, welche schließlich in der Phase des Remodellings endet. Nicht heilende Wunden sind besonders durch eine verlängerte Inflammationsphase charakterisiert. Solche Wunden sind oftmals hypoxisch und es kommt zu einer gestörten bzw. verzögerten Angiogenese.

Es existieren zahlreiche etablierte Behandlungskonzepte chronischer Wunden, welche jedoch nicht immer zu einer erfolgreichen Heilung führen. Aktuell werden, als neue Therapiemodalität chronischer Wunden, unter anderem zellbasierte Therapien erforscht. Hierfür eignen sich mitunter mesenchymale Stammzellen (MSC), da sie in verschiedene mesenchymale Zellen differenzieren können und über für die Wundheilung förderliche parakrine Eigenschaften verfügen. Zu diesen MSC gehört auch die adipöse Stammzelle (ADSC). Aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit, der relativ einfachen Isolierung, der Fähigkeit, in einen myofibroblastoiden Zelltypen zu differenzieren und ihren besonderen antiinflammatorischen und angiogenen Eigenschaften werden ADSC in In-vitro-Versuchen, Tierversuchen, präklinischen und klinischen Studien zur Verwendung für die Therapie chronischer Wunden und Weichgewebeschäden untersucht.

Mikrovaskuläre Endothelzellen sind für die Re-Etablierung der Sauerstoffversorgung des geschädigten Gewebes essentiell. Allerdings existieren bis dato wenige Arbeiten, die sich im Detail mit der direkten Interaktion zwischen adipösen Stammzellen und mikrovaskulären Endothelzellen beschäftigen. Um die Interaktion beider Zelltypen im Rahmen der Weichgewebereparatur zu untersuchen, wurde der „Co-Culture Scratch Wound Migration Assay“ (CCSWMA) herangezogen. Auf der Basis des Assays wurden die Auswirkungen der Co-Kultivierung (CK) von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und ADSC auf die Parameter Proliferation (Zelldichte und Zellzyklusphase), Apoptose, Migration (Verschluss der In-vitro-Wunde), Differenzierung der adipösen Stammzelle zu einer myofibroblastoiden Zelle und Zytokinausschüttung (Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) untersucht. Diese Parameter wurden sowohl unter dem Einfluss von Hypoxie als auch von Hypoxie gefolgt von Reoxygenierung erhoben und mit der jeweiligen normoxischen Kontrolle

verglichen. Neben der Co-Kultivierung beider Zelltypen erfolgte auch die Anlage von Monokulturen (MK), die analog kultiviert und ausgewertet wurden.

Bezüglich der Proliferation wurden HDMEC durch die Präsenz von ADSC stärker beeinflusst als umgekehrt. Während HDMEC in MK unter normoxischen Bedingungen ihre Zelldichte im Zeitverlauf signifikant erhöhen konnten, war dies in CK mit ADSC nicht möglich. Auch in Bezug auf den Zellzyklus zeigte sich ein hemmender Effekt der ADSC auf HDMEC: Während der Anteil sich außerhalb der G₀-Phase des Zellzyklus befindlicher, Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC in MK zwischen 41-59% lag, lag er in CK zwischen 15-37%. ADSC zeigten sowohl in MK als auch in CK eine deutliche Erhöhung ihrer Zelldichte im Zeitverlauf unter normoxischen Bedingungen. Im Gegensatz zu HDMEC konnten ADSC in MK auch unter dem Einfluss von Hypoxie proliferieren, eine Erhöhung der Zelldichte nach Reoxygenierung war sowohl in CK als auch MK erkennbar. Bezüglich des Anteils Ki-67/MIB-1-positiver ADSC, der in MK und CK unter allen Bedingungen ähnlich war, lässt sich schließen, dass HDMEC die Proliferation von ADSC nicht beeinflussen. ADSC zeigten in MK und CK einen deutlich erhöhten Anteil apoptotischer Zellen nach Hypoxie bzw. folgender Reoxygenierung, während der Anteil apoptotischer HDMEC stets auf einem niedrigen Niveau blieb.

HDMEC migrierten in MK unter normoxischen Bedingungen nur verzögert. In MK konnten ADSC sowohl unter Normoxie als auch nach Reoxygenierung signifikant migrieren, nicht jedoch unter hypoxischen Bedingungen. Allerdings kam es in CK bereits unter hypoxischen Bedingungen zu einer signifikanten Migration, welche in Bezug auf die In-vivo-Situation die Fähigkeit der ADSC darstellen könnte, in das sich bildende Granulationsgewebe zu migrieren.

Die myofibroblastoide Differenzierung der ADSC war sowohl in MK als auch in CK anfangs am stärksten ausgeprägt. In MK kam es zu einer konstanten Abnahme unter Normoxie, während Hypoxie bzw. Reoxygenierung zu einer Erhöhung im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe führten. Dieses Verhalten war in CK nicht nachweisbar. Damit scheinen HDMEC die durch Hypoxie ausgelöste myofibroblastoide Differenzierung der ADSC eher zu hemmen.

In Bezug auf die Freisetzung von IL-6 scheint die CK von ADSC und HDMEC zu einem Anstieg insbesondere unter hypoxischen Bedingungen und nach Reoxygenierung zu führen, welcher in diesem Ausmaß nicht in den beiden MK feststellbar war. HDMEC-MK zeigten die mit Abstand stärkste IL-8-Sekretion. Durch die CK mit ADSC kam es zu einer starken Dämpfung der IL-8-Freisetzung, möglicherweise hemmen ADSC also die IL-8-Sekretion von HDMEC. Ebenso war die Konzentration von MCP-1 in HDMEC-MK im Vergleich zur ADSC-MK und CK am höchsten. Hier zeigte sich zunächst eine Reduktion der Freisetzung unter hypoxischen Bedingungen, gefolgt von einem späten Anstieg ohne Veränderung durch den Einfluss von Reoxygenierung. In ADSC-MK zeigten sich weitgehend konstante MCP-1-Werte. In CK zeigte

sich erneut der Abfall der MCP-1-Freisetzung unter hypoxischen Bedingungen mit einem späten Anstieg ohne Auswirkung der unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen. Insgesamt zeigte sich in CK eine moderate MCP-1-Freisetzung, verglichen mit der HDMEC-MK, sodass auch hier die Co-Kultivierung beider Zelltypen auf eine antiinflammatorische Wirkung der ADSC hinweist. In ADSC-MK zeigte sich ein Anstieg der Freisetzung von VEGF unter Hypoxie und nach Reoxygenierung. In CK konnte VEGF besonders unter dem Einfluss von Hypoxie bzw. Reoxygenierung nachgewiesen werden.

Auf der Basis dieses Modells wird durch ADSC insgesamt ein angiogenes und antiinflammatorisches Milieu geschaffen, was insbesondere unter Hypoxie und Reoxygenierung deutlich wird und sich dort u.a. anhand der gehemmten Freisetzung von IL-8 und der vermehrten Freisetzung von VEGF zeigt. Die Übertragung der Ergebnisse auf die humane Wundheilung und speziell auf chronische Wunden mit den dafür typischen hypoxischen Verhältnissen legt demnach eine Regulierung der HDMEC durch ADSC nahe. Ein daraus resultierendes angiogenes und antiinflammatorisches Milieu könnte die Wundheilung positiv beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Kultivierung beider Zelltypen auf der Basis des CCSWMA möglich ist und hierdurch Rückschlüsse auf die In-vivo-Situation der Wundheilung möglich sind. Eine Erweiterung des CCSWMA in späteren Arbeiten durch Hinzunahme von Auswertungsparametern ist in Abhängigkeit von der zu beantwortenden Fragestellung denkbar.

Summary

The constantly increasing age of the population is associated with an increase in the incidence of chronic wounds and chronic soft tissue lesions. Accompanying comorbidities are often chronic venous insufficiency, peripheral artery disease, diabetes mellitus and immobility. The wound healing cascade is disturbed in such chronic wounds. Normally, wound healing is accomplished through 4 overlapping stages, the first being haemostasis, which is followed by the inflammatory phase. The latter passes into the proliferative phase, which is finalized by the remodelling phase. Non-healing wounds are usually characterized by a prolonged inflammatory phase. Furthermore, these wounds are often hypoxic and show impaired angiogenesis.

There are many well-established treatment options for chronic wounds, which however sometimes fail to promote wound healing. With respect to a new therapy option, research has recently focused on cell-based therapy. Mesenchymal stem cells (MSC) seem to fit well for this purpose, due to their differentiation potential into other mesenchymal cells and their paracrine properties, which are beneficial for the wound environment. Adipose derived stem cells (ADSC) belong to the group of MSC. Because of their good availability, the relatively easy isolation procedure, their ability to differentiate into a myofibroblastic cell type and their anti-inflammatory and angiogenic properties, ADSC are investigated in in-vitro-trials, animal studies, preclinical and clinical trials with respect to the treatment of chronic wounds and soft tissue defects.

Microvascular endothelial cells are essential for the reestablishment of oxygen supply within damaged tissues. However, there are only a few studies investigating the direct interaction of ADSC and human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) in detail. Therefore, the "Co-culture Scratch Wound Migration Assay" (CCSWMA) was used to study the interaction of both cell types against the background of soft tissue repair. Using this assay, the impact of co-culturing both cell types regarding the parameters proliferation (cell density and cell cycle phase), apoptosis, migration (closure of an in-vitro-wound), differentiation of ADSC into a myofibroblastic cell type and cytokine release (Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and Vascular endothelial growth factor (VEGF)) were studied. Data were collected subsequent to hypoxic culture and hypoxia followed by reoxygenation and they were compared to the matching control groups undergoing normoxic culture. In addition to co-cultures (CK), mono-cultures (MK) of both cell types were also analyzed following the same culture and evaluation protocols.

Regarding their proliferative capacities, HDMEC seemed to be more strongly influenced by the presence of ADSC, than vice versa. While HDMEC could significantly increase their cell number during normoxic culture over time in MK, this was not the case in CK with ADSC. The

dampening effect of ADSC on HDMEC proliferation was also visible during cell cycle analysis. While the rate of HDMEC out of the G₀-phase, which stained positive for Ki-67/MIB-1 ranged between 41-59% in MK, the rate in CK ranged between 15-37%. ADSC were able to significantly increase their cell number both in MK and CK under normoxic conditions. In addition, ADSC showed a significant increase in cell number in MK under hypoxic conditions and after reoxygenation in MK and CK. Considering the rate of Ki-67/MIB-1-positive ADSC, which was similar in MK and CK under all conditions, it seems that HDMEC do not influence the proliferation of ADSC. ADSC showed a higher rate of apoptotic cells after hypoxia and following reoxygenation, both in MK and CK, while the rate of apoptotic HDMEC was always very low.

HDMEC showed a delayed migration under normoxic conditions in MK. In MK, ADSC showed significant migration under normoxic conditions and after reoxygenation, while there was no significant migration under hypoxic conditions. However, a significant decrease in the width of the in-vitro-wound was noted in CK under hypoxic conditions. With respect to the in-vivo-situation, this points to the ability of ADSC to migrate into an emerging granulation tissue.

Myofibroblastic differentiation of ADSC was strongest at the early point in time, both in MK and in CK. In MK, there was a constant decrease in the rate of differentiated ADSC under normoxic conditions, while hypoxia and reoxygenation, respectively, led to an increase, in comparison to the control group. This increase was not noted among ADSC in CK. HDMEC seem to inhibit myofibroblastic differentiation triggered by hypoxia.

Regarding the release of IL-6, co-culturing ADSC and HDMEC seemed to cause an increase under hypoxic conditions and after reoxygenation, which was not present in both MK. IL-8-secretion was highest among HDMEC-MK. Co-culturing of HDMEC with ADSC led to a strong decrease of the IL-8-release, a dampening effect likely effected by ADSC. Similarly, HDMEC-MK showed the highest MCP-1-secretion when compared to ADSC-MK and CK. A reduction was noted under hypoxic conditions, followed by a late significant increase in the release of MCP-1, which was not affected by reoxygenation. ADSC-MK released a constant amount of MCP-1 under all conditions. In CK, a late increase of the MCP-1-secretion, which was not affected by reoxygenation, was noted. All in all, there was a moderate MCP-1-secretion in CK when compared to HDMEC-MK, which hints towards anti-inflammatory properties of ADSC. ADSC-MK showed a significant increase of the VEGF-release under hypoxia and after reoxygenation. Primarily under these conditions, the release of VEGF was detectable in CK.

Based on this model, ADSC create an angiogenic and anti-inflammatory milieu, which is more pronounced under hypoxia and reoxygenation by the decreased secretion of IL-8 and the increased release of VEGF. Applied to the in-vivo-situation of human wound healing and especially chronic wounds with their hypoxic conditions, these results show a regulation of HDMEC

through ADSC. A resulting angiogenic and anti-inflammatory milieu may positively affect wound healing.

The results indicate that both cell types can be co-cultured using the CCSWMA, allowing for new insights into the in-vivo-situation of wound healing. Conclusions regarding wound healing can be drawn. In the future, the assay is expandable by adding further analytical parameters, depending on the questions to be answered.

2 Einleitung

Aktuell leben wir in einer immer älter werdenden Gesellschaft (Prince et al., 2015). Die fortschreitende Überalterung der Gesellschaft geht mit der Zunahme der Inzidenz chronischer Erkrankungen wie Diabetes Mellitus (Kalra & Sharma, 2018) und kardiovaskulären Erkrankungen einher (Prince et al., 2015). Daten des Statistischen Bundesamts haben gezeigt, dass der Anteil der über 65-Jährigen in Deutschland, welcher im Jahr 1960 noch bei 12% lag, innerhalb von 61 Jahren im Jahr 2021 auf 22% angestiegen ist; der Anteil der über 80-Jährigen stieg von 2% auf 7%. Die hier erstellte Prognose für das Jahr 2060 geht davon aus, dass innerhalb der nächsten 59 Jahre die Überalterung der Gesellschaft zunehmen und der Anteil der über 65- bzw. über 80-Jährigen auf 30% bzw. 11% der Bevölkerung ansteigen wird (Bund-Länder Demografie Portal, <https://www.demografie-portal.de/DE/Fakten/aeltere-bevoelkerung.html>, abgerufen 02.05.2023).

Das Risiko eines Menschen, einmal in seinem Leben eine chronische Wunde zu erleiden, liegt bei 1-2% (Falanga et al., 2022). In den westlichen Ländern liegt die Inzidenz chronischer Wunden bei den über 80-Jährigen bei etwa 4-5%, damit sind in Deutschland jährliche Behandlungskosten von etwa 1 Milliarde bis 1,5 Milliarden Euro assoziiert (Tilgen & Eming, 2007). Das Auftreten chronischer Wunden ist mit einigen chronischen Erkrankungen vergesellschaftet, deren Inzidenz im Alter zunimmt (Wicke et al., 2009). Hierzu zählen unter anderem periphere arterielle Verschlusskrankheit, chronisch venöse Insuffizienz, Diabetes Mellitus sowie neurologische Erkrankungen wie Apoplex mit der daraus resultierenden Immobilität (Wicke et al., 2009; Falanga et al., 2022). Insgesamt ist die Rate des Wundverschlusses nach Wundheilungsstörung bei den über 70-Jährigen um 25% geringer als bei den Jüngeren (Wicke et al., 2009).

Aufgrund dieser hohen Inzidenz und den damit verbundenen Kosten werden neue Therapieoptionen erprobt, um die Heilung chronischer Wunden zu verbessern (Falanga et al., 2022).

2.1 Der Weichgewebeschaden

Weichgewebe ist definiert als nicht mineralisiertes Binde- und Stützgewebe, welches andere Organe umgibt (Chittajallu et al., 2022). Zum Weichgewebe zählen unter anderem Haut, Sehnen, Fettgewebe, Bänder und Muskeln. Weichgewebe bestehen aus Zellen, Elastin und der extrazellulären Matrix (EZM) (Chittajallu et al., 2022). Letztere besteht neben

unterschiedlichen Kollagenfibrillen aus Proteoglykanen, Laminin, Integrinen, Tenascin und Fibronectin (Karamanos et al., 2021; Bosman & Stamenkovic, 2003).

Eine Wunde kann unter anderem allgemein als eine Störung der normalen anatomischen Struktur und deren Funktion definiert werden (Lazarus, 1994). Sie entsteht durch pathologische extrinsische, aber auch intrinsische Zustände, wenn die Belastbarkeit des jeweiligen Gewebes überschritten wird (Chittajallu et al., 2022). Unter einem Weichgewebeschaden wird explizit eine Läsion des Weichgewebes, z. B. der Haut, Muskeln, des Fettgewebes oder der Gefäße verstanden (Lazarus, 1994; Chittajallu et al., 2022).

Akute Weichgewebeschäden können auf vielfältige Art und Weise entstehen; beispielsweise durch (chirurgische) Inzision bzw. scharfes Trauma, thermische Verletzung, Verätzung oder Strom, durch stumpfes Trauma sowie als Schusswunde (Kumar & Leaper, 2005; Percival, 2002). Unabhängig vom Entstehungsmechanismus kann der Weichgewebeschaden auch anhand seiner Morphologie beispielsweise als oberflächlich, tief, mit begleitendem Decollement oder als ulzerierend beschrieben werden (Kumar & Leaper, 2005). Zusätzlich können akute Weichgewebeschäden auch anhand ihres Kontaminationsgrads beurteilt werden (Kumar & Leaper, 2005).

Die zeitliche Grenze, ab wann eine Wunde als nicht heilend bzw. chronisch eingestuft wird, wird häufig nach 3 Monaten gezogen (Las Heras et al., 2020). Allerdings ist dies keine feste Grenze, es werden auch Parameter wie Alter, Komorbiditäten und Art der Verletzung betrachtet (Nwomeh et al., 1998).

Die Wundheilung erfolgt normalerweise in einer geordneten Reihenfolge sich überlappender Phasen (Monaco & Lawrence, 2003), welche im anschließenden Abschnitt beschrieben werden. Diese im Rahmen der physiologischen Gewebereparatur ablaufenden Prozesse sind bei chronischen Wunden gestört: Diese sind vor allem durch eine deutlich verlängerte Inflamationsphase charakterisiert (Enoch & Price, 2004).

2.2 Physiologie der Wundheilung

Im Körper existieren zwei unterschiedliche Mechanismen der Gewebeheilung: Die Regeneration und die Reparatur (Garrett, 1998). Die Regeneration bezeichnet eine Restitutio ad integrum und ist nur wenigen Organen, wie der Leber, vorbehalten. Andere Gewebe, wie beispielsweise Weichgewebe, heilen durch Reparatur. Der entstehende Defekt wird mit neuem Gewebe aufgefüllt und es entsteht eine Narbe (Garrett, 1998).

Wunden können in Abhängigkeit von ihrer Ausdehnung bzw. ihres Entstehungsmechanismus durch primäre oder sekundäre Wundheilung abheilen: Unter der primären Wundheilung versteht man, dass die Wundränder mit direktem Kontakt zueinander heilen, beispielsweise nach einer Hautnaht (Beldon, 2010). Dieser Vorgang ist jedoch nur nicht kontaminierten Wunden mit glattem Wundrand vorbehalten, wie beispielsweise nach einem aseptischen operativen Eingriff. Diese Wunde heilt unter geringerer Narbenbildung (Enoch & Leaper, 2005). Die sekundäre Wundheilung ist allen anderen Wunden vorbehalten, unter anderem großen Defekten, die nicht durch eine Naht zu verschließen sind (Enoch & Leaper, 2005) oder chronischen Ulzera (Zitelli, 1984). Hier heilt der Defekt durch Bildung von Granulationsgewebe und Kontraktion, es bildet sich in der Regel eine größere Narbe (Enoch & Leaper, 2005).

Die physiologische Weichgewebeheilung kann in 4 sich überlappende Phasen eingeteilt werden: Hämostase, Inflammationsphase, Proliferationsphase und Remodelling (Singh et al., 2017; Diegelmann & Evans, 2004). Dies ist eine geläufige, jedoch nicht die einzige Einteilung.

Zusammenfassend kommt es nach Traumatisierung des Gewebes durch Vasokonstriktion (Beldon, 2010) und Plättchenaggregation zur Blutstillung (Childs & Murthy, 2017). Es schließt sich die Inflammationsphase an, welche besonders der Abwehr von Pathogenen sowie dem Abbau nekrotischen Gewebes dient (Martin, 1997). Die Proliferationsphase beinhaltet die Neubildung von Granulationsgewebe sowie die Reepithelialisierung zur Wiederherstellung der Barrierefunktion (Prasetyono, 2009). Granulationsgewebe besteht neben Fibroblasten und der von ihnen neu gebildeten EZM (Velnar et al., 2009) aus Granulozyten, Makrophagen (Landén et al., 2016) und Gefäßen, welche im Rahmen der Angiogenese entstehen, um die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff zu gewährleisten (Rodrigues et al., 2019). In der letzten Phase der Wundheilung, dem Remodelling, kommt es zur Reifung des Gewebes (Prasetyono, 2009). Dieser Prozess dauert bis zu 2 Jahre an (Singh et al., 2017), das Endergebnis ist die ausgereifte Narbe (Prasetyono, 2009).

Zur besseren Einordnung der Fragestellungen dieser Arbeit werden im Folgenden die Prozesse der einzelnen Phasen detaillierter beschrieben.

Hämostase

Nach einer Gewebeverletzung schließt sich unmittelbar die Phase der Hämostase mit dem Ziel der Blutstillung und damit der Sicherung der Vitalfunktionen an (Singh et al., 2017). Diese Phase beginnt mit der Traumatisierung und dauert für etwa 4-6 Tage an (Broughton et al., 2006).

Nach einer Gefäßverletzung kommt es durch einen neuronalen Reflex zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen der Arteriolen (Velnar et al., 2009). Hierdurch kommt es jedoch rasch zur Gewebehypoxie und Azidose, was letztlich zur Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität führt (Singh et al., 2017). Durch die Gewebe- und Gefäßverletzung kommen die Thrombozyten mit subendotheliale Kollagen in Kontakt, was die Gerinnungskaskade aktiviert (Witte & Barbul, 1997). Es bildet sich ein Fibrinthrombus, bestehend aus Fibronektin, Thrombin, Thrombozyten und Kollagen (Broughton et al., 2006). Der Thrombus führt nicht nur zur Blutstillung, er bildet auch die Matrix für die später einwandernden Zellen. Die aktivierten Thrombozyten sezernieren vermehrt Mediatoren durch Entleerung ihrer α -Granula (Nurden et al., 2008), auch innerhalb des Thrombus, wodurch dieser ein Zytokin- und Wachstumsfaktorreiches Milieu schafft, was die Grundlage für die Wundheilung darstellt (Li et al., 2007).

Zytokine sind eine Gruppe von Proteinen, die Immunregulation, Zellmigration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose durch Interaktion mit den jeweiligen Rezeptoren beeinflussen (Nathan & Sporn, 1991; Toews, 2001). Zu den Zytokinen gehören die Interferone, Interleukine und die Tumor Nekrose Faktoren. Eine weitere Untergruppe der Zytokine stellen die Wachstumsfaktoren dar (Silva & Lobo, 2019). Während Zytokine, auch im Rahmen der Wundheilung, vorwiegend bei immunologischen und inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen, stimulieren Wachstumsfaktoren mehr die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellen (Silva & Lobo, 2019).

Zu den wichtigsten von Thrombozyten aus deren α -Granula sezernierten Mediatoren gehören unter anderem Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Epidermal Growth Factor (EGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) (Nurden et al., 2008; Singh et al., 2017; Velnar et al., 2009).

Aufgrund der Relevanz für diese Arbeit wird an dieser Stelle nur VEGF gesondert erläutert. VEGF ist ein wichtiger Faktor im Rahmen der Angiogenese, der Gefäßneubildung. Endothelzellen werden durch VEGF zur Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) angeregt, welche unter anderem die Basalmembran der Gefäße degradieren (Bao et al., 2009). Dies erleichtert die Migration der Endothelzellen, gleichzeitig wirkt VEGF proliferationssteigernd auf sie. Damit steigert VEGF die Bildung neuer Kapillaren und fördert deren Anschluss an das bestehende Gefäßnetz (Bao et al., 2009).

Durch die im Rahmen der akuten Gewebetraumatisierung verletzte Zellmembran wird Arachidonsäure frei, aus der als Derivate Prostaglandine und Leukotriene entstehen. Diese Substanzen wirken proinflammatorisch und chemotaktisch auf Leukozyten, was den Übergang zur überlappend beginnenden Inflammationsphase markiert (Singh et al., 2017).

Inflammationsphase

Die sich der Hämostase anschließende Inflammationsphase kann in eine frühe und in eine späte Inflammationsphase unterteilt werden (Velnar et al., 2009; Enoch & Leaper, 2005).

Etwa 24-48 h nach Trauma kommt es zur Migration von neutrophilen Granulozyten in das Wundgebiet (Velnar et al., 2009; Enoch & Leaper, 2005). Dabei wirken vor allem TGF- β (Young & McNaught, 2011), PDGF (Pierce et al., 1991) und Interleukin-8 (IL-8) chemotaktisch auf Neutrophile (Harada et al., 1994). Insbesondere IL-8 fördert die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten (Harada et al., 1994). IL-8 wird im Rahmen der Entzündungsreaktion unter anderem von Endothelzellen und Monozyten gebildet, kann aber auch von Fibroblasten, T-Lymphozyten, Makrophagen, Hepatozyten und Tumorzellen gebildet werden (Russo et al., 2014). Neben der chemotaktischen Wirkung auf Neutrophile induziert IL-8 deren Degranulation und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Mukaida et al., 1998).

Die Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht in dieser Phase der Wundheilung in der Phagozytose von Bakterien, Fremdmaterial und nekrotischem Gewebe (Singer & Clark, 1999). Hierzu kommt es nach Aktivierung der Neutrophilen zu deren Degranulation (Wilgus et al., 2013); die Granula enthalten unter anderem antimikrobiell wirkenden Enzyme sowie Serinproteasen und MMP (Wilgus et al., 2013; Yager & Nwomeh, 1999). Ebenso sind neutrophile Granulozyten in der Lage, ROS zu produzieren, die ebenfalls im Rahmen der Pathogenabwehr und im Abbau von EZM eine essentielle Rolle spielen (Schreml et al., 2010). Nachdem die Neutrophilen ihre Funktion erfüllt haben, kommt es zu deren Apoptose, anschließend werden sie entweder mit dem Wundschorf aus dem Gewebe ausgeschieden oder sie werden durch Makrophagen phagozytiert (Su & Richmond, 2015).

Die späte Inflammationsphase wird von Makrophagen dominiert (Enoch & Leaper, 2005), diese migrieren nach etwa 48-72 h zum Gewebeschaden (Young & McNaught, 2011). Die Zytokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (Yadav et al., 2010), PDGF, TGF- β sowie Abbauprodukte der EZM wirken chemotaktisch auf im Blut zirkulierende Monozyten (Kirsner & Eaglestein, 1993), welche dann ins Gewebe migrieren und hier zu Makrophagen differenzieren (Kirsner & Eaglestein, 1993; Singer & Clark, 1999). Makrophagen führen zunächst die Inflammationsreaktion fort, sind aber im Verlauf auch an deren Resolution sowie der Initiierung der Bildung von Granulationsgewebe beteiligt (Boniakowski et al., 2017).

Die aktivierten Makrophagen sezernieren die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) (Goldman, 2004). IL-6 führt zur Sekretion von MCP-1 sowie IL-6 aus Endothelzellen, was weiter chemotaktisch auf Monozyten wirkt (Johnson et al., 2020).

Neben Endothelzellen bilden auch Monozyten, Makrophagen und andere Zellen MCP-1 (Singh et al., 2021). Ähnlich der Wirkung von IL-8 auf neutrophile Granulozyten wirkt MCP-1 nicht nur chemotaktisch auf Monozyten, es fördert auch deren Bildung von ROS und lysozymalen Enzymen sowie deren Produktion von IL-1 und IL-6 (Mukaida et al., 1998).

Makrophagen sind an der Phagozytose von verbleibenden Mikroorganismen beteiligt. Weiterhin sezernieren sie vermehrt PDGF, TNF- α und TGF- β (Singer & Clark, 1999). Durch die Produktion von MMP sind Makrophagen am Abbau nekrotischen Gewebes beteiligt (Elkington et al., 2009). PDGF (Pierce et al., 1991) und TGF- β wirken chemotaktisch auf Fibroblasten, was zur Bildung von Granulationsgewebe beiträgt (Pakyari et al., 2013).

IL-6 erfüllt im Rahmen der Inflammationsreaktion unterschiedliche Funktionen: Zum einen induziert es die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren in Makrophagen und Endothelzellen und regt Endothelzellen zur Bildung von MCP-1 an, was die Migration von Monozyten stimuliert und damit zunächst die Inflammationsreaktion fördert (Johnson et al., 2020). Zum anderen fördert es aber auch die Differenzierung von T-Lymphozyten in T_H2-Lymphozyten, welche unter anderem Interleukin-4 (IL-4) produzieren, was die proinflammatorischen Eigenschaften der Makrophagen hemmt und deren antiinflammatorische Eigenschaften stimuliert und so unter anderem die Bildung des Granulationsgewebes fördert (Johnson et al., 2020). Außerdem fördert IL-6 im In-vitro-Modell die endotheliale Permeabilität (Maruo et al., 1992).

Zuletzt beginnt die Migration von Lymphozyten ins Wundbett. Lymphozyten spielen vorwiegend eine regulatorische Rolle (Hart, 2002).

Die Inflammationsphase geht überlappend in die Proliferationsphase über (Beldon, 2010). Mit der Beseitigung der Pathogene und des nekrotischen Gewebes endet die Inflammationsphase (Singh et al., 2017).

Proliferationsphase

Während der Proliferationsphase kommt es zur Gewebereparatur durch Narbenbildung unter Ausbildung von Granulationsgewebe und einer bedeckenden Epithelschicht (Hinz, 2016). Granulationsgewebe ist ein zunächst zell- und gefäßreiches Gewebe, bestehend aus Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten und einsprossenden Gefäßen (Landén et al., 2016), sowie aus der von Fibroblasten gebildeten EZM (Xue & Jackson, 2015). Die Proliferationsphase beginnt ungefähr am vierten Tag nach Trauma und dauert bis etwa zum 14. Tag an (Broughton et al., 2006).

Bereits im Rahmen der Inflammationsphase wird die spätere Bildung von Granulationsgewebe und die Reepithelialisierung angeregt. Das von Thrombozyten und Makrophagen sezernierte PDGF wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten (Pierce et al., 1991). IL-1 und TNF- α , welche ebenfalls von Makrophagen gebildet werden, führen zur KGF-Sekretion durch Fibroblasten (Goldman, 2004), was die Differenzierung und Migration von Keratinozyten fördert (Pastar et al., 2014). Die Sekretion von IL-1 und TNF- α wird durch IL-6 getriggert, was sowohl an der Initiierung als auch am Abklingen der Entzündungsreaktion beteiligt ist (Johnson et al., 2020) und von einigen Zelltypen wie Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen (Goldman, 2004) und Leukozyten sezerniert werden kann (Nishimoto & Kishimoto, 2006). IL-6 scheint im Rahmen der Wundheilung essentiell zu sein, da die Hemmung von IL-6 im Tierversuch zu einem deutlich verlangsamten Wundverschluss mit Hemmung der Reepithelialisierung und Angiogenese führt (Lin et al., 2003).

Für die Wiederherstellung der Epidermis während der Proliferationsphase ist die Migration und Proliferation der Keratinozyten essentiell (Pastar et al., 2014). Das stimulierende EGF wird sowohl durch Thrombozyten und Makrophagen, als auch durch epidermale Zellen selbst gebildet (Schultz et al., 1991). Die Migration der Keratinozyten beginnt zunächst an den Wundrändern und schreitet Richtung Zentrum fort (Singh et al., 2017). Sobald die Wunde vollständig von einer Epithelschicht bedeckt ist, bildet sich die Basalmembran aus und die Keratinozyten stellen ihre Zell-Zell- und Zell-Basalmembran-Kontakte wieder her (Rousselle et al., 2019).

Die sich im Rahmen der Hämostase und der Inflammationsphase gebildete provisorische Fibrinmatrix wird im Zuge der Proliferationsphase sukzessive durch Granulationsgewebe ersetzt (Landén et al., 2016). Durch die mit der Gewebeverletzung einhergehende akute Hypoxie wird die Migration und Proliferation von Fibroblasten sowie deren Kollagenbildung durch Freisetzung von TGF- β aus Thrombozyten, epidermalen Zellen und Fibroblasten stimuliert (Rodriguez et al., 2008). Daneben wirkt auch PDGF chemotaktisch und proliferationssteigernd auf Fibroblasten (Landén et al., 2016). Die migrierenden Fibroblasten sezernieren, stimuliert durch TGF- β , MMP, mit denen sie die provisorische Matrix abbauen (Baum & Arpey, 2005). Um die provisorische Matrix zu ersetzen, sezernieren sie EZM-Bestandteile wie Kollagen, was durch PDGF, TGF- β und EGF initiiert wird (Baum & Arpey, 2005; Gill & Parks, 2008).

Der Einfluss von TGF- β führt zur Differenzierung einiger Fibroblasten zu Myofibroblasten (Darby et al., 2014). Diese sind charakterisiert durch die Expression von α -smooth muscle actin (α -SMA) (Cherng et al., 2008), ebenso sind sie kontraktile (Darby et al., 2014). α -SMA ist die von Zellen der glatten Muskulatur, aktivierten Fibroblasten (Cherng et al., 2008) und Perizyten (in vitro) (Alarcon-Martinez et al., 2018) exprimierte Aktin-Isoform (Cherng et al., 2008). Myofibroblasten sind eine Subpopulation von Fibroblasten, die Ähnlichkeiten zu glatten Muskelzellen aufweisen und unter anderem bei der Kontraktion von Wunden eine maßgebliche

Rolle spielen (Gabbiani, 1992). Myofibroblasten sezernieren auch EZM-Proteine (Klingberg et al., 2013) und führen zum EZM-Remodelling (Hinz, 2010). Auch die in dieser Arbeit untersuchten adipösen Stammzellen (adipose derived stem cells, ADSC) sind in der Lage, in vitro α -SMA zu exprimieren und damit einen myofibroblastoiden Phänotyp anzunehmen (Desai et al., 2014).

Für die Bildung von Granulationsgewebe ist auch die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen essentiell (Li et al., 2003). Im Rahmen der frühen Phase der Wundheilung kommt es allerdings durch die Gefäßverletzung zu einer gestörten Sauerstofflieferung und durch den erhöhten Sauerstoffbedarf der nun infiltrierenden Zellen (Ruthenberg et al., 2014) zu einer Gewebehypoxie mit Sauerstoffpartialdrücken von 0-10 mmHg im Zentrum der Wunde (Rodriguez et al., 2008). Die weitere Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff ist abhängig von Sauerstoffdiffusion aus umliegenden intakten Gefäßen (Rodriguez et al., 2008).

Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu einer verstärkten Transkription von Hypoxia-Inducible Factor (HIF) (Shu et al., 2019): Dieser Transkriptionsfaktor reguliert Gene, die unter anderem Proliferation, Migration, anaeroben Stoffwechsel, Angiogenese und Erythropoese, beeinflussen (Darby & Hewitson, 2016; Shu et al., 2019). Somit kommt es zu einer raschen zellulären Adaption an die hypoxischen Sauerstoffbedingungen (Sen, 2009). Durch die Erhöhung der Transkription von HIF und der damit verbundenen Freisetzung der entsprechenden Proteine, vor allem von VEGF, kommt es zur Initiierung der Angiogenese (Ahluwalia & Tarnawski, 2012) und damit zur Förderung der Migration und Proliferation von Endothelzellen. Dies bewirkt die Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung des verletzten Gewebes über neue Gefäße (Gerhardt, 2008). Die vermehrte Expression von HIF führt auch zur Transkription der entsprechenden Rezeptoren für VEGF auf Endothelzellen (Darby & Hewitson, 2016). Im Rahmen der durch VEGF getriggerten endothelialen Migration bilden sich die neuen Kapillaren als eine Art von Sprossen bereits existierender Kapillaren aus (Eichmann & Simons, 2012).

Endothelzellen lassen sich anhand verschiedener Oberflächenmarker charakterisieren. Zu den typischen endothelialen Markern gehört unter anderem der Von-Willebrand-Faktor (vWF) (Ribatti et al., 2020), ein Glykoprotein, welches unter anderem im Rahmen der Blutgerinnungskaskade nach Endothelverletzung die Adhäsion von Thrombozyten und subendotheliale Bindegewebe vermittelt (Hassan et al., 2012). Ein weiterer endothelialer Marker ist CD31 (Cluster of differentiation 31) (Rakocevic et al., 2017). Daneben exprimieren Endothelzellen typischerweise CD34 und CD105 (Ribatti et al., 2020). Endothelzellen bilden in Gefäßen die innerste, einschichtige Zellschicht namens Intima (Thorin, 1998). Das Endothel der Mikrovaskulatur wird von Perizyten umgeben (Bergers & Song, 2005; Hirschi & D'Amore, 1996), während das größerer Gefäße von mehreren Schichten glatter Muskelzellen umhüllt ist (Bergers & Song, 2005). Außerhalb der Wundheilung befindet sich das Endothel in einem „Ruhezustand“ und

es findet keine Proliferation statt (Carmeliet & Jain, 2011). Nach einer Gewebeverletzung ist jedoch die begleitende Gefäßneubildung essentiell für die Versorgung des sich neu bildenden Gewebes mit Sauerstoff (Li et al., 2003). Nach einer Verletzung kommt es durch die Hypoxie sowie durch die begleitende Sekretion proangiogener Faktoren wie VEGF zur Aktivierung der ruhenden Endothelzellen (Demidova-Rice, Durham, et al., 2012). Dadurch lösen sie ihre Zell-Zell-Kontakte auf (Carmeliet & Jain, 2011), die Perizyten lösen sich ab und es kommt zu einer enzymatischen Degradierung der Basalmembran (Johnson & Wilgus, 2014). Weiterhin bauen Endothelzellen selbst EZM ab, um ihre Migration und Proliferation und damit die Kapillaraussprossung zu ermöglichen, welche in Richtung eines proangiogenen Stimulus wie VEGF erfolgt (Demidova-Rice et al., 2012; Johnson & Wilgus, 2014). Mit Abschluss der Angiogenese kommt es zu einer Rückkehr in den „ruhenden“ Zustand, die Basalmembran und Zell-Zell-Kontakte werden reetabliert (Demidova-Rice, Durham, et al., 2012) und Perizyten bedecken die neu gebildeten Kapillaren (Johnson & Wilgus, 2014). Dabei wird nur ein Teil der gebildeten Kapillaren von einer Perizyten-schicht umhüllt, welche sie vor dem Einfluss antiangiogener Faktoren schützt, die im Zuge der Reifung der Narbe die Gefäßdichte vermindern (DiPietro, 2016). Auch führt der „Entzug“ stimulierender Faktoren wie VEGF zur Apoptose der ungeschützten Endothelzellen (Korn & Augustin, 2015).

Damit sind Endothelzellen wesentlich an der für die Weichteilheilung wichtigen Angiogenese beteiligt (Tonnesen et al., 2000). Dies wird u.a. auch dadurch verdeutlicht, dass eine gestörte Angiogenese wie beispielsweise im Rahmen des Diabetes Mellitus mit einer verzögerten Wundheilung assoziiert ist (Okonkwo & DiPietro, 2017).

Remodelling

Die Phase des Remodellings beginnt überlappend mit der Proliferationsphase und kann bis zu 2 Jahre andauern (Singh et al., 2017). Etwa 3 Wochen nach Trauma hat sich die maximale Kollagensynthese eingestellt, dennoch liegt die Festigkeit der Wunde nur bei etwa 20% der maximal zu erreichenden Stärke (Baum & Arpey, 2005). Die Kollagenfibrillen, die zunächst unorganisiert abgelagert wurden (Velnar et al., 2009), werden im Rahmen dieser Phase der Wundheilung miteinander verknüpft (Clark, 1993; Velnar et al., 2009). Myofibroblasten sind an diesem als EZM-Remodelling bezeichneten Prozess beteiligt (Hinz & Gabbiani, 2003).

Mit Reifung und Zunahme des Kollagengehalts der Wunde nimmt die Zelldichte ab; ein Großteil der gebildeten Gefäße bildet sich zurück und der überwiegende Anteil der Fibroblasten und Endothelzellen unterliegt einer koordinierten Apoptose (Greenhalgh, 1998). Es bildet sich eine weitgehend avaskuläre und azelluläre Narbe mit hohem Kollagengehalt (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019; Greenhalgh, 1998). Durch die sich einstellende Verknüpfung der

EZM und durch die Anordnung der Kollagenfibrillen erreicht die Narbe nach etwa 6 Wochen nach Trauma etwa 80-90% der zu erwartenden Festigkeit. Selbst nach Abschluss des Remodellings kann die ursprüngliche Festigkeit des Gewebes nicht hergestellt werden (Baum & Arpey, 2005; Rivera & Spencer, 2007).

2.3 Pathophysiologie der Wundheilung

Wie bereits zuvor beschrieben, können unterschiedliche Grunderkrankungen am Entstehen einer nicht heilenden Wunde beteiligt sein: Hierbei handelt es sich meist um Wunden auf dem Boden einer Ischämie im Rahmen der arteriellen Verschlusskrankheit (Enoch & Price, 2004), einer chronisch venösen Insuffizienz, einer diabetischen Mikroangiopathie oder Neuropathie sowie einer erhöhten mechanischen Belastung wie beim Dekubitalulkus (Riedel et al., 2008). Auch kann es nach einer akuten Wunde, wie nach Trauma oder chirurgischem Eingriff, zur Chronifizierung kommen, beispielsweise durch bakterielle Infektion (Robson, 1997).

Trotz unterschiedlicher Pathogenese ist bei diesen Wunden die oben beschriebene Abfolge der Phasen der physiologischen Wundheilung gestört und es kommt insbesondere zu einer deutlichen Verlängerung der Inflammationsphase (Frykberg & Banks, 2015).

Diese verlängerte Inflammationsphase spiegelt sich darin wider, dass sich in chronischen Wunden vermehrt erhöhte Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen, hauptsächlich sezerniert durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen (Raziyeva et al., 2021), sowie Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) finden (Frykberg & Banks, 2015). Außerdem werden in chronischen Wunden mitunter vermehrt alternde bzw. seneszente Zellen festgestellt (Frykberg & Banks, 2015). Ebenso können Hypoxie und bakterielle Infektion zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beitragen (Zhao et al., 2016).

In nicht bzw. verzögert heilenden Wunden ist häufig der durch Makrophagen im Rahmen der normalen Wundheilung gesteuerte Abbau der neutrophilen Granulozyten beeinträchtigt (Raziyeva et al., 2021). Außerdem kommt es durch ständige inflammatorische Stimuli zu einer kontinuierlichen Infiltration von neutrophilen Granulozyten (Zhao et al., 2016). Dies führt zu einer Veränderung des Mikromilieus mit einer Zunahme an proinflammatorischen Zytokinen und einer Verringerung der Wachstumsfaktoren (Mustoe et al., 2006). Die vermehrte Freisetzung von IL-8 führt ebenfalls zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion, da es sowohl chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt, als auch die Komplementkaskade aktivieren kann (Ellis et al., 2018).

Im Rahmen der akuten bzw. physiologischen Wundheilung wurden unterschiedliche Populationen von Makrophagen beschrieben. Zunächst treten Makrophagen mit proinflammatorischen Eigenschaften auf, welche zunächst vor allem Bakterien, Fremdkörper sowie die geschädigte EZM abbauen (Krzyszczuk et al., 2018). Bei chronischen Wunden kann es zu einer Persistenz des proinflammatorischen Makrophagen-Subtyps kommen (Krzyszczuk et al., 2018).

Aufgrund der im Zuge der persistierenden Entzündungsphase vermehrt vorhandenen Neutrophilen und Makrophagen kommt es zur vermehrten Bildung und Freisetzung von ROS (Dissemond et al., 2002). Die Überproduktion an ROS führt zu pathologischen gewebeschädigenden Effekten durch Veränderung oder Abbau der EZM-Proteine und zur oxidativen Schädigung der Lipidmembranen und der DNS (Desoxyribonukleinsäure) (Dunnill et al., 2017; Schreml et al., 2010).

Bakterielle Infektionen führen ebenfalls zu einer deutlichen Verlängerung der Inflammationsphase, da hierdurch permanent Leukozyten zum Wundbett hin migrieren und dort proinflammatorische Zytokine und ROS freisetzen (Zhao et al., 2016). Ebenso wirken bakterielle Toxine selbst gewebeschädigend (Demidova-Rice et al., 2012).

Ebenso kann mechanischer Stress durch repetitive Gewebeverletzung an der verlängerten Inflammationsphase und damit an der Pathogenese chronischer Wunden beteiligt sein (Hart, 2002).

Bei einem physiologisch heilenden, akuten Weichgewebeschaden beginnt die Gefäßneubildung nach etwa 3-5 Tagen durch Aussprossung aus vorbestehenden Kapillaren in das sich bildende Granulationsgewebe (Johnson & Wilgus, 2014). Durch die in chronischen Wunden herrschende Hypoxie kann es zur vermehrten Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und Proteasen (Zhao et al., 2016) sowie zum Zelltod (Pan et al., 2018) kommen. Darüber hinaus hemmt chronische Hypoxie *in vitro* unter anderem die Proliferation von Fibroblasten sowie deren TGF- β - und Kollagensynthese (Siddiqui et al., 1996). Die chronische Hypoxie kann weiterhin zur vermehrten Transkription von Genen profibrotischer Wachstumsfaktoren führen, was bei der Entstehung und dem Progress fibrotischer Pathologien eine Rolle spielen kann (Darby & Hewitson, 2016). Neben der Hypoxie als solcher kann aber auch eine rasche Freigabe der Sauerstoffzufuhr, insbesondere bei mehreren Zyklen aus Ischämie und Reperfusion zu chronischen Wunden führen (Mustoe et al., 2006).

Seneszenz, auch Zellalterung genannt, ist ein Teil der normalen Gewebemöostase und damit ein physiologischer Prozess (Herranz & Gil, 2018). Zelluläre Seneszenz kann auf dem Boden von DNS-Schäden entstehen, beispielsweise durch oxidativen Stress oder Telomerverkürzung (Herranz & Gil, 2018). Der mit der Seneszenz einhergehende Zellzyklusarrest ist ein wichtiger Mechanismus der Tumorsuppression, da so verhindert wird, dass Zellen mit

bestehenden DNS-Schäden sich teilen (Rhinn et al., 2019). Senescente Zellen sind durch ein typisches, verändertes Sekretom, genannt SASP (Senescence associated secretory phenotype) charakterisiert, unter anderem bestehend aus proinflammatorischen Zytokinen und MMP (Herranz & Gil, 2018). Die Akkumulation solcher Zellen ist mit dem Auftreten verschiedener altersabhängiger Krankheiten assoziiert (Salama et al., 2014). Das veränderte Sekretom seneszenten Zellen kann zur Gewebeschädigung beitragen (Wang & Shi, 2020). Weshalb es zur Persistenz seneszenten Zellen in chronischen Wunden kommt, ist noch nicht abschließend geklärt (Wei et al., 2022).

Insgesamt betrachtet können demnach chronische Wunden auf vielfältige Art und Weise entstehen. Mit den weiter unten beschriebenen ADSC wird eine zellbasierte Therapiestrategie angestrebt, die das veränderte proinflammatorische Milieu zugunsten einer Heilung förderlichen modulieren soll (Zou et al., 2021).

2.4 Etablierte Behandlungskonzepte chronischer Wunden

Die Prinzipien der Versorgung chronischer Wunden und Weichgewebeschäden ähneln denen akuter Wunden: Bei akuten Wunden kann in ausgewählten Fällen, etwa im Fall einer nicht kontaminierten Schnittwunde, der primäre Wundverschluss erfolgen (Baczako et al., 2019). Die Therapie komplexer akuter Wunden beinhaltet die Wundreinigung, das Debridement sowie eine Verbandstherapie zur Polsterung und Schaffung eines optimalen Milieus (Baczako et al., 2019; Ramasastry, 2005).

Die Therapie chronischer Wunden und Weichgewebeschäden sollte anhand von Leitlinien erfolgen. Neben der Wundreinigung und dem chirurgischen und nicht chirurgischen Debridement beinhaltet die Lokalthherapie chronischer Wunden unter anderem die Verwendung verschiedener Wundaufgaben sowie weitere Zusatzmaßnahmen (AWMF S3-Leitlinie: „Lokalthherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronisch venöse Insuffizienz“; <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/091-001>; abgerufen 03.05.2023). Bei tieferen Wunden, etwa mit freiliegendem Knochen, werden ggf. operative Verfahren zur Haut- und Weichteilrekonstruktion notwendig, etwa durch eine Hauttransplantation (AWMF S1-Leitlinie: „Querschnittsspezifische Dekubitusbehandlung und -prävention“; <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/179-008>, abgerufen 03.05.2023, Johnston et al., 2016)). Weiterhin sollten die Behandlungskonzepte leitliniengerecht in Abhängigkeit des Heilungsverlaufs und des Wundstatus, sowie den möglichen Komorbiditäten angepasst werden (AWMF S3-Leitlinie: Lokalthherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den

Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronisch venöse Insuffizienz, <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/091-001>; abgerufen 03.05.2023). Die im Folgenden dargestellten Verfahren zeigen eine Auswahl der gängigen, in den krankheits- und wundspezifischen Leitlinien enthaltenen Therapieoptionen.

Aktuelle Therapieoptionen der chronischen Wunden (Jones et al., 2018; Powers et al., 2016) wie auch der akuten Wunden und Weichteilschäden (Baczako et al., 2019; Ramasastry, 2005) basieren auf Kombinationen des chirurgischen und nicht chirurgischen Debridements (Powers et al., 2016) sowie auf der Verwendung von Wundauflagen (Jones et al., 2018; Baczako et al., 2019; Ramasastry, 2005). Neben der eigentlichen Wundtherapie sollte bei jeder chronischen Wunde das Grundleiden in Betracht gezogen werden, da sich hieraus auch weitere Therapieempfehlungen ergeben (Eriksson et al., 2022; Powers et al., 2016). Das Debridement dient der Entfernung nekrotischen und avitalen Gewebes, damit es zur Defektheilung durch sekundäre Wundheilung kommen kann (Tsourdi et al., 2013). Das Debridement sollte zu Beginn der Behandlung erfolgen (Dissemond et al., 2014) und kann im Verlauf, je nach Bedarf, wiederholt werden (Cardinal et al., 2009). Diese Behandlungsmethode kann sowohl chirurgisch (Tsourdi et al., 2013) als auch auf anderem Weg, beispielsweise durch einen Wasserstrahl, durch vorsichtiges Reiben mit Kompressen (Eriksson et al., 2022) oder physikalisch durch Ultraschall und Laser (Dissemond et al., 2014) sowie biologisch durch Verwendung medizinischer Larven, welche u. a. proteolytische Enzyme sezernieren und das nekrotische Gewebe direkt aufnehmen, erfolgen (Turkmen et al., 2010).

Eine weitere Säule, besonders im ambulanten Bereich, ist die Verbandtherapie (Jones et al., 2018). Dabei soll die Wunde im Rahmen jedes Verbandswechsels zunächst gesäubert (debridiert), gespült und desinfiziert werden und anschließend, entsprechend den Bedürfnissen der Wunde, ausreichend feucht gehalten werden, um Infekten und Hautirritationen vorzubeugen (Jones et al., 2018; Powers et al., 2016; Rodeheaver & Ratliff, 1997). Konventionelle Kompressen können als einfache Wundauflage verwendet werden, sind aber mit dem Risiko von Hautschädigungen verbunden (Jones et al., 2018). Daneben können, abhängig vom Status der Wunde, unterschiedliche Materialien zur Schaffung eines mehr oder weniger feuchten Milieus verwendet werden. Zu diesen Materialien gehören beispielsweise Alginat und Hydrokolloide (Dissemond et al., 2014). Außerdem können Wundauflagen mit Zusatz von Kollagen und Cellulose verwendet werden, welche Proteinase im Wundbett binden und dadurch die Heilung chronischer Wunden fördern sollen (Powers et al., 2016).

Zur Infektbehandlung kommt neben der regelmäßigen Wundspülung und -reinigung die Anwendung topischer Antiseptika wie Jodsalbe oder Silberauflagen infrage. Bei invasiven Infektionen sollte begleitend eine antibiogrammgerechte Antibiose etabliert werden (Tsourdi et al., 2013).

Die Vacuum-assisted-closure (VAC)-Therapie kommt auch bei chronischen Wunden zur Anwendung: Indikationen für die VAC-Therapie sind vielfältig und umfassen kontaminierte Wunden (Koehler et al., 2008), diabetische Ulzera, Dekubiti, Verbrennungen, Wunddehiszenzen und die Fixierung von Hauttransplantaten (Agarwal et al., 2019). VAC-Therapie reduziert das Wundödem, das Wundexsudat und die Bakterienlast und fördert die Perfusion und Bildung von Granulationsgewebe (Jones et al., 2018) sowie die Angiogenese (Agarwal et al., 2019), wodurch die Grundlage für die sekundäre Wundheilung geschaffen werden kann (Koehler et al., 2008).

Gelegentlich, insbesondere wenn Knochen oder Sehnen freiliegen und die Wunde nicht durch Weichgewebe gedeckt werden kann, ist eine Hauttransplantation nötig (Johnston et al., 2016). Komplikationen von Transplantaten sind unter anderem, je nach Technik und Art des Transplants, das Auftreten von Kontrakturen und Diffusionsstörungen durch Flüssigkeitsretention im Wundbett mit folgendem Transplantatversagen, sowie Ischämie durch Kompression des Gefäßstiels (Rivera & Spencer, 2007).

Eine weitere, heutzutage durchgeführte, Behandlungsmöglichkeit ist die hyperbare Sauerstofftherapie (HBOT, Hyperbaric oxygen therapy). Hierzu wird eine Sauerstoffkammer verwendet, in der der Patient einer hohen Sauerstoffkonzentration ausgesetzt ist (Lam et al., 2017). Die HBOT wird bei hypoxischen Wunden, besonders bei diabetischen und gefäßassoziierten Wunden verwendet, da sie die dort herrschende Sauerstoffsättigung erhöhen soll (Kranke et al., 2015). Durch die Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks im Blut kommt es zu einem Sauerstoffgradient mit hohem Sauerstoffgehalt in der Wundperipherie und niedrigem Sauerstoffgehalt im Wundzentrum, was die Gefäßneubildung fördern kann (Lam et al., 2017).

Trotz der bisher guten Behandlungsmöglichkeiten chronischer Wunden gibt es weiterhin Wunden mit ausbleibender oder unzureichender Heilungstendenz, weshalb neue Therapieoptionen nötig sind, um die Lebensqualität der Betroffenen weiter zu verbessern.

2.5 Neue Therapieoptionen

Aufgrund ihrer besonderen, der Geweberegeneration förderlichen Eigenschaften, werden Stammzellen zur Behandlung chronischer Wunden untersucht und in Studien erprobt (Wu et al., 2023). Durch ihre parakrinen Eigenschaften können sie unter anderem die Angiogenese positiv beeinflussen und in verschiedene Zelltypen differenzieren (Wu et al., 2023). Zur Therapie chronischer Wunden kommen sowohl embryonale Stammzellen (ESC), induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) und mesenchymale Stammzellen (MSC) in Frage (Duscher et al., 2016). MSC sind Stammzellen, die unter anderem aus dem Knochenmark, der Plazenta, der

Synovia und dem Fettgewebe isoliert werden können (Huang et al., 2020). MSC sind multipotent, das heißt, sie können generell in verschiedene mesenchymale Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten, Fettzellen und Muskelzellen differenzieren (Guillamat-Prats, 2021). Weiterhin ähneln sie phänotypisch den Fibroblasten (Soundararajan & Kannan, 2018).

Eine aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit, ihrer vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten sowie ihrer parakrinen Eigenschaften für die Verwendung zur Behandlung chronischer Wunden besonders im Fokus stehende MSC ist die ADSC (Hassan et al., 2014). Es wird angenommen, dass ADSC physiologischerweise nach einer Weichteilverletzung aus dem subkutanen Fettgewebe in die Wunde migrieren und dort zur Wundheilung beitragen können (Mazini et al., 2020, Mazini et al., 2021). ADSC sind Teil der stromalen vaskulären Fraktion (SVF) des Fettgewebes (Baer, 2014). Die SVF beinhaltet eine heterogene Zellpopulation bestehend aus endothelialen Vorläuferzellen, Perizyten, Immunzellen und ADSC (Nguyen et al., 2016). Der Anteil der ADSC in der SVF liegt bei etwa 2% und ist damit deutlich höher als der der BMSC (Bone Marrow-MS), deren Anteil im Knochenmark nur etwa 0,002% der gesamten Zellpopulation ausmacht (Mazini et al., 2019). Die Entnahme von Knochenmark ist mit einer höheren Morbidität im Bereich der Entnahmestelle verbunden (Mazini et al., 2019). Im Gegensatz dazu wird die Isolation der ADSC aus dem subkutanen Fettgewebe durch Fettabsaugung relativ gut toleriert (Baer, 2014).

ADSC exprimieren typischerweise die Oberflächenmarker CD73, CD90, CD105 (Baer, 2014), daneben auch CD13, CD29 und CD44 (Hassan et al., 2014). ADSC werden als negativ für die Oberflächenmarker CD14, CD31 und CD45 charakterisiert (Hassan et al., 2014). Ebenso können ADSC, wie MSC allgemein, *in vitro* in mesenchymale Zellen wie Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren (Naderi et al., 2017). Darüber hinaus haben ADSC einen fibroblastenähnlichen Phänotyp (Hassan et al., 2014). *In vitro* ist auch eine Differenzierung zu einem myofibroblastoiden Phänotyp möglich (Desai et al., 2014). Das Sekretom von ADSC beinhaltet *in vitro* neben angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF, weitere, der Wundheilung förderliche Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- β und PDGF (Kapur & Katz, 2013; Kim et al., 2009). Außerdem besitzen ADSC immunmodulierende und antiinflammatorische Eigenschaften (Mazini et al., 2019). ADSC sind in der Lage, *in vitro* unter hypoxischen Bedingungen zu proliferieren (Yamamoto et al., 2013). Weiterhin fördert Hypoxie *in vitro* die Sekretion angiogener Wachstumsfaktoren von ADSC (Efimenko et al., 2010). Dies könnte im Rahmen der Wundbehandlung nützlich sein, da Hypoxie ein Charakteristikum chronischer Wunden ist (Atkin, 2019).

In einem von Naderi et al. 2017 veröffentlichten Review werden einige Studien, sowohl am Menschen als auch im Tiermodell, vorgestellt, in denen ADSC die Wundheilung positiv beeinflussten (Naderi et al., 2017). Unter anderem bezieht sich die Verbesserung der Wundheilung

auf die Förderung der Angiogenese und der Kollagensynthese (Naderi et al., 2017). In einem von Holm et al. 2018 veröffentlichten Review werden klinische Studien betrachtet, in denen ADSC zur Behandlung chronischer Ulzera unterschiedlicher Genese angewendet werden. Laut Schlussfolgerungen der klinischen Studien scheinen ADSC sicher in der Anwendung zu sein und die Heilung chronischer Ulzera positiv beeinflussen zu können (Holm et al., 2018). Im Tierversuch verbessern ADSC die Wundheilung nach Verbrennungen (Franck et al., 2019). Mesenchymale Stammzellen im Allgemeinen sind in Deutschland bisher nur für einige wenige Indikationen zugelassen. Zum Beispiel wird das auf allogenen MSC aus dem Knochenmark basierte Präparat Obnitix® zur Behandlung des therapierefraktären Graft-Versus-Host-Syndroms verwendet (Paul-Ehrlich-Institut, <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/atmp/tep/tep-node.html>, abgerufen 03.05.2023; Gelbe Liste, <https://www.gelbe-liste.de/neue-medikamente/obnitix>, abgerufen 03.05.2023; Medac, <https://www.medac.de/news/detailview/news/pressemitteilung-31/>, abgerufen 23.11.2023). Ein weiteres Beispiel ist das Präparat Alofisel® zur Behandlung komplexer perianaler Fisteln bei Morbus Crohn (Paul-Ehrlich-Institut, https://www.pei.de/SharedDocs/schulungsmaterial/Alofisel-Schulungsmaterial-Aerzte_Version-1.0_Anwendungsanleitung.pdf?__blob=publicationFile&v=3, abgerufen 23.11.2023), welches auf expandierten adipösen Stammzellen basiert (Takeda; <https://www.takeda-gastroenterologie.de/perianale-fisteln-bei-mc/therapie/anwendung-von-alofisel>, abgerufen 23.11.2023).

Es stehen mehrere Modalitäten zur Applikation von ADSC (und anderen Stammzellen) und deren Sekretom zur Verfügung. ADSC können selbst für die Unterstützung der Wundheilung genutzt werden (Hassan et al., 2014). Dabei werden im Besonderen die direkten Zell-Zell-Kontakte zwischen ADSC und anderen Zellen sowie die Fähigkeit der ADSC zur Differenzierung ausgenutzt (Hassan et al., 2014).

Im Rahmen der zellfreien Therapie werden nicht die ADSC selbst, sondern deren Sekretom als Therapeutikum genutzt (Cai et al., 2020). Das konditionierte Medium (KM) der ADSC wird aus dem Zellkulturüberstand (ZKÜ) der Kultur von ADSC gewonnen und enthält unter anderem Zytokine, extrazelluläre Vesikel, DNS und Ribonukleinsäure (RNS) (Cai et al., 2020). Ebenso können extrazelluläre Vesikel für die zellfreie Therapie genutzt werden (Wong et al., 2019). Extrazelluläre Vesikel werden von einigen Zelltypen sezerniert und können je nach Größe in Mikrovesikel, Exosomen (Wong et al., 2019) sowie Apoptotosekörperchen (Battistelli & Falciari, 2020) unterschieden werden. Sie sind von einer Plasmamembran umgeben und enthalten unter anderem Lipide, Proteine und mRNS (Wong et al., 2019). Sowohl das KM von ADSC (Cai et al., 2020) als auch deren extrazelluläre Vesikel werden vor dem Hintergrund der Wundheilung erforscht (Jia et al., 2023).

Das interdisziplinäre Feld des Tissue Engineerings (TE) hat das Ziel, Gewebe- und Organersatz zu entwickeln, um damit Gewebe- und Organfunktion zu erhalten, zu verbessern oder wieder herzustellen (Langer & Vacanti, 1993). TE basiert auf 3 Säulen, welche als „Triade“ des TE definiert ist: Sie besteht aus einer Matrix in Form eines porösen Scaffolds, in die Zellen und Wachstumsfaktoren eingebettet sind (Akter, 2016). Auch ADSC werden vor dem Hintergrund der Wundheilung in TE-Konstrukten erforscht (Huayllani et al., 2020).

Die o.g. Modalitäten werden sowohl in In-vitro-Versuchen als auch im Tiermodell und in klinischen Studien am Menschen erprobt. Beispielsweise konnte im In-vitro-Modell gezeigt werden, dass die direkte Co-Kultivierung von ADSC mit Endothelzellen zur Bildung von Gefäßnetzwerken aus Endothel mit vermehrter Expression von CD31 und α -SMA-exprimierenden ADSC führt, welche möglicherweise eine gefäßstabilisierende Rolle haben (Merfeld-Clauss et al., 2010). Im In-vitro-Versuch förderte ADSC-KM parakrin durch VEGF die Migration von Endothelzellen und könnte auf diesem Wege die Angiogenese verbessern (Chen et al., 2020). Die Expression von HLA-DR liegt bei undifferenzierten ADSC in vitro bei unter 1% (Guo et al., 2018). Daher könnten sie sich für die allogene Verwendung eignen (Mazini et al., 2019).

Im Rattenmodell fördern ADSC, eingebracht in ein Kollagenhydrogel, die Wundkontraktion und Wundheilung sowie die Gefäßbildung (Abbasi et al., 2023). In einer weiteren Studie an der Ratte verbessern ADSC sowohl nach Transplantation in eine ischämische Extremität als auch nach Injektion von KM die Gefäßneubildung (Madonna et al., 2014). Im Tierversuch (Ratte) fördern ADSC, eingebracht in TE-Scaffolds, die Wundheilung bei Diabetes Mellitus (Wu et al., 2018). Nach Transplantation von ADSC in einen ischämischen Weichgewebedefekt im Kaninchenmodell proliferieren sie dort und bilden Granulationsgewebe (Steinberg et al., 2012).

Ebenso könnte Hypoxie die angiogenen Eigenschaften von ADSC verbessern, da eine hypoxische Vorbehandlung der ADSC im diabetischen Mausmodell die Expression von VEGF erhöht und die Wundheilung fördert (Wang et al., 2021). ADSC können in vitro auch unter hypoxischen Bedingungen proliferieren und das nach hypoxischer Kultur erhaltene KM von ADSC fördert in vitro die Kollagensynthese von Fibroblasten, was auch zu einer Verbesserung der Wundheilung beitragen könnte (Lee et al., 2009). ADSC scheinen der in chronischen Wunden herrschenden Entzündungsreaktion in vivo am Menschen durch Hemmung des Einstroms polymorphkerniger Leukozyten nach Transplantation ins Wundgebiet entgegen zu wirken (Dung et al., 2021).

Auf Basis der aktuellen Ergebnisse scheinen ADSC ein großes Potential als neue Therapiemodalität zur Verbesserung der Wundheilung und Weichgewebereparatur zu haben. Allerdings sind viele Aspekte der direkten und indirekten Zell-Zell-Interaktionen mit anderen Zellen, vor dem Hintergrund der Wundheilung, noch nicht ausreichend beleuchtet. Daher soll diese Arbeit

insbesondere die Interaktion der ADSC mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC), einem essentiellen Zelltyp für die Wiederherstellung der Mikrovaskulatur im Rahmen der Wundheilung, näher betrachten. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der wechselseitigen Beeinflussung der Migration und Proliferation beider Zelltypen sowie der Sekretion von angiogenen und inflammatorischen Zytokinen unter dem Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen.

2.6 Fragestellungen

In dieser Arbeit wurde die Co-Kultivierung von HDMEC und ADSC im In-vitro-Wundheilungsmodell mit besonderem Fokus auf die Angiogenese gewählt. Endothelzellen spielen sowohl bei der Wiederherstellung der Gefäßversorgung und damit der Sauerstoffversorgung des Gewebes (Eichmann & Simons, 2012; Ridiandries et al., 2018), als auch aufgrund der Interaktion mit Leukozyten, und anderen residenten Zellen eine tragende Rolle (Lingen, 2001) im Rahmen der akuten Wundheilung oder der chronischen Wunde (Ridiandries et al., 2018). ADSC wurde bereits im Rahmen präklinischer und klinischer Studien eine für die Weichteilheilung positive Rolle zugesprochen (Hamada et al., 2019; Masłowski et al., 2020). Im In-Vitro- und Tierversuch scheinen ADSC sowohl durch direkte Zell-Zell-Interaktionen (Merfeld-Clauss et al., 2010; Steinberg et al., 2012) als auch durch ihre parakrinen Eigenschaften die Wundheilung positiv beeinflussen, insbesondere im Hinblick auf den Einfluss der ADSC auf das Zytokin-Milieu (Kapur & Katz, 2013). Durch die Differenzierung von ADSC in vitro in eine α -SMA-positive Zelle beteiligen sie sich in vitro an der physiologischerweise im Rahmen der Wundheilung auftretenden Wundkontraktion (Desai et al., 2014; Kakudo et al., 2012). Außerdem können sie möglicherweise so die neu gebildeten Gefäße stabilisieren (Rohringer et al., 2014).

Um die Interaktion von HDMEC und ADSC im Detail zu untersuchen, wurden die ADSC in den in Abschnitt 3.2 ausführlicher beschriebenen CCSWMA (Oberringer et al., 2007) integriert. Im 2D-Modell wird in dieser Arbeit die wechselseitige Beeinflussung von HDMEC und ADSC, speziell im Hinblick auf die Inflammations- und Proliferationsphase der Weichgewebe-Reparatur, untersucht. Analytische Parameter der Studie waren neben der Zell-Proliferation, -Migration und -Differenzierung und der Apoptose auch die Ausschüttung der spezifischen Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1 und VEGF aufgrund ihrer inflammatorischen und angiogenen Wirkung. Sauerstoffmangel ist ein Charakteristikum sowohl der akuten als auch der chronischen Wunde. Da die Sauerstoffversorgung in der Weichgewebereparatur einen der wichtigsten regulativen

Parameter darstellt, wurde im Modell der Einfluss von Hypoxie (H) und Hypoxie mit folgender Reoxygenierung (H/R) untersucht.

Durch diese Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Ist eine Co-Kultivierung von HDMEC und ADSC im Rahmen des CCSWMA möglich und wenn ja, inwiefern lassen sich die Ergebnisse auf die In-vivo-Situation der Weichgewebereparatur übertragen?

Kann ein charakteristischer Einfluss eines Zelltyps auf den jeweils anderen in Co-Kultur herausgearbeitet werden?

Moduliert Hypoxie bzw. Hypoxie mit nachfolgender Reoxygenierung die Zellantwort in Bezug auf die Auswerteparameter Proliferation, Differenzierung von ADSC, Migration und Zytokinausschüttung von HDMEC und ADSC?

Welche Erkenntnisse liefert das Modell zum weiteren Verständnis der Beteiligung der ADSC bei der Weichgewebereparatur, insbesondere im Hinblick auf Angiogenese und Inflammation?

3 Material und Methoden

Angaben zu den in dieser Arbeit verwendeten Zellen, Geräten, Arbeits- und Verbrauchsmaterialien können dem Abschnitt 3.7 entnommen werden.

3.1 Zellkultivierung

Bei beiden in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen handelt es sich um kommerziell erhältliche Zellen. Die verwendeten HDMEC sind laut Herstellerangaben positiv für vWF und CD31 und negativ für α -SMA. Die verwendeten ADSC sind laut Angaben des Herstellers zu mindestens 90% positiv für die Oberflächenmarker CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 und zu maximal 5% positiv für die Oberflächenmarker CD14, CD31, CD45.

Im Rahmen der Versuche wurden jeweils $n=6$ HDMEC-Mono-Kulturen (MK), ADSC-MK und Co-Kulturen (CK) aus beiden Zelltypen ($n=18$) angelegt und analysiert. Die ADSC befanden sich hier in Passage (P) 5, die HDMEC in P6.

In dieser Arbeit, die auf dem CCSWMA (Oberringer et al., 2007) basiert, wurden die verschiedenen Zellkulturen unter unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen kultiviert.

Die Zellkulturarbeiten sowie das Ansetzen des Zellkulturmediums fand unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank statt. Jede Kultur führte pro Versuchsdurchgang zu fünf Objektträgern (OT), sodass am Ende 90 OT ausgewertet wurden. Die Zellkultivierungsphase eines Versuchs erfolgte jeweils über eine Periode von zwei Wochen. In der ersten Versuchswoche erfolgte die Expansion beider Zelltypen. In der folgenden Woche wurden die OT-Kulturen mit einer zuvor festgelegten gewünschten Ansatzzelldichte von 180 Zellen/mm² angesetzt. Tabelle 1 gibt das Zeitschema der Kultivierung, sowie die gewählte Präparateterminologie wieder.

Tabelle 1: Chronologische Abfolge der Versuchsdurchführung und Präparateterminologie: 0 h N: Fixierung der Zellen nach Scratching; 18 h N: Fixierung der Zellen nach 18 h Normoxie; 18 h H: Fixierung der Zellen nach 18 h Hypoxie; 42 h N: Fixierung der Zellen nach 42 h Normoxie; 42 h H/R Fixierung der Zellen nach 18 h Hypoxie gefolgt von 24 h Reoxygenierung

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Woche 1	Ansetzen ADSC aus Master-Zellbank (MZB)	Mediumwechsel ADSC			Ansetzen HDMEC aus MZB
Woche 2	Mediumswechsel ADSC und HDMEC	Unterkultivierung auf OT: Ansetzen der HDMEC-MK, ADSC-MK, CK 24 h normoxische Kultur	„Scratching“ Lagerung des ZKÜ und Fixierung 0 h N Start: 18 h Hypoxie	Lagerung des ZKÜ und Fixierung 18 h N und 18 h H Start: 24 h Reoxygenierung	Lagerung des ZKÜ und Fixierung 42 h N und 42 h H/R

3.1.1 Anlegen der „Master-Zellbanken“ und Kryokonservierung

Aus den gelieferten und kryokonservierten ADSC (P1) und HDMEC (P2) wurde vonseiten des Labors eine Master-Zellbank (MZB) angelegt. Beide Zelltypen wurden nach Lieferung wie unten beschrieben expandiert und unterkultiviert und anschließend in P3 (ADSC) und P4 (HDMEC) in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierbei handelte es sich um identische Kryokulturen von jeweils einem Spender mit identischen und reproduzierbaren Eigenschaften.

3.1.2 Kultivierung der HDMEC

Die Expansion der HDMEC für die Experimente erfolgte in Endothelzell-Medium (EGM, Endothelial Growth Medium). Das Medium wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und gelagert, jedoch wurde auf Zugabe von Antibiotika verzichtet. Die Expansion der HDMEC begann in der Regel am fünften Tag der ersten Versuchswoche, da die HDMEC im Vergleich zu den ADSC eine geringere Zeit zur Expansion benötigten (siehe Tabelle 1). Die Expansion erfolgte in einem Inkubator unter Standardbedingungen bei einer Temperatur von 37 Grad °C, 5% Kohlendioxid (CO₂) und 95% Luftfeuchtigkeit.

Zur Vorbereitung der Expansion wurden 30 min vor Anlegen der Zellkultur aus einer Kryokultur zwei T-75-Kulturflaschen mit jeweils 9,5 Milliliter (ml) EGM gefüllt und für eine halbe Stunde in einem Inkubator unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Entnahme eines Kryoröhrchens aus der MZB wurde dieses vorsichtig in einem Wasserbad erwärmt und zusammen mit den zuvor vorbereiteten T-75-Kulturflaschen unter eine Sicherheitswerkbank transferiert. Hier wurde mit einer Pasteur-Pipette die Zellsuspension (1 ml) des Kryoröhrchen entnommen und gleichmäßig auf beide T-75-Kulturflaschen aufgeteilt. Die Zellen wurden anschließend in einen Inkubator überführt und dort unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 72 h, also an Tag 1 der zweiten Versuchswoche erfolgte ein Mediumwechsel mit jeweils 10 ml frischem EGM, zuvor erfolgte die phasenkontrastmikroskopische Beurteilung der Kulturen hinsichtlich ihrer Vitalität (Mitosen und apoptotische Zellen) und der Morphologie der Zellen.

An Tag 2 der zweiten Versuchswoche erfolgte die Anlage der OT-Kulturen auf zuvor vorbehandelten OT. Das Protokoll der Vorbehandlung der OT begann damit, dass die OT in eine Glasschaukel gelegt wurden, welche in ein Becherglas gegeben wurde. In dieses Becherglas wurde nun Leitungswasser und Spülmittel eingefüllt und das Becherglas wurde bis zum Folgetag stehen gelassen. Dann erfolgte über 2 h die Wässerung unter fließendem Leitungswasser. Im Anschluss wurden die mit den OT bestückten Glasschaukeln 1 h in 1%-iger Salzsäure-Lösung eingelegt. Hiernach schloss sich eine weitere Wässerung über 1 h an. Danach wurden die OT über 1 h in 1%-ige Natriumhydroxid-Lösung eingelegt und es wurde abschließend für 2 h gewässert. Daraufhin wurden die OT mit destilliertem Wasser und im Anschluss mit 96 %-igem Ethanol gespült. Die OT wurden anschließend in Glasschaukeln mit Alufolie umschlossen und bei 200° C über 2 h sterilisiert.

Mit den auf diese Weise vorbehandelten OT erfolgte nun das Ansetzen der Kulturen. Unter der Sterilbank wurden pro Kultur fünf OT auf zwei Quadriperm-Schalen verteilt. Eine Quadriperm wurde dabei mit drei OT für die spätere normoxische Kultivierung bestückt, die andere mit zwei OT für die spätere hypoxische Kultivierung.

Auf der Unterseite der OT wurde auf Höhe des inneren und äußeren Drittels mit einem Diamantenschreiber eine Markierung für die Anlage der In-vitro-Wunde gesetzt, diese Markierung wurde mit einem schwarzen Stift zur Orientierung auch auf der Quadriperm nachgezeichnet. Außerdem wurde jedes Fach der Quadriperm mit dem späteren Präparatenamen beschriftet. Zunächst wurde das Kulturmedium der HDMEC verworfen, Mediumreste wurden durch dreifaches Spülen mit sterilem Phosphate Buffered Saline (PBS) entfernt. Zur Ablösung der Zellen von der Kulturflasche wurden im nächsten Schritt 5 ml auf 37° C erwärmtes Trypsin hinzugegeben und die mit dem Trypsin versetzten Zellen wurden 2 min inkubiert. Danach wurde die T-75-Kulturflasche vorsichtig beklopft, um die Zellen aus dem Zellverbund abzulösen. Die Kontrolle des Ablösens der Zellen von der Oberfläche erfolgte phasenkontrastmikroskopisch.

Danach erfolgte die Zugabe einer äquivalenten Menge an EGM zur Inaktivierung des Trypsins und der Transfer der Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen.

Die Zellsuspension wurde mit 1000 Umdrehungen (U)/min über drei Minuten zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde unter Schonung des Pellets entfernt. Die nach OT-Kultur entstehenden HDMEC-MK wurden, wie auch die ADSC-MK und CK, in Co-Kultur-Medium (CKM), bestehend aus EGM und ADSC-Basal-Medium (ADSC-BM) im Verhältnis 1:1, angesetzt. Das Pellet wurde nachfolgend in 3 ml CKM resuspendiert. Die Zelldichte der Suspension wurde nach Zellzahlbestimmung mittels Casy™ berechnet, um die benötigte Menge an Zellsuspension zu bestimmen, die für die gewünschte Ansatzzellendichte von 180 Zellen/mm² nötig war. Anschließend wurde die so bestimmte Menge in 25 ml CKM resuspendiert. Auf jeden OT wurden jeweils 5 ml Zellsuspension aufgetragen. Anschließend erfolgte der Transfer der OT-Kulturen in den Inkubator, wo sie über 24 h unter Standardbedingungen kultiviert wurden.

3.1.3 Kultivierung der ADSC

Die ADSC wurden im zugehörigen Medium ADSC-BM kultiviert. Das Medium wurde nach Herstellerangaben, jedoch ohne Zugabe von Antibiotika, angesetzt und gelagert.

Die Expansion der ADSC begann am ersten Tag der ersten Versuchswoche (siehe Tabelle 1). Vor Entnahme der Zellen aus der MZB wurde eine T-25-Kulturflasche pro Kryokultur mit 4 ml ADSC-BM befüllt und 30 Minuten in einen Inkubator unter Standardbedingungen gegeben. Die ADSC wurden vorsichtig im Wasserbad erwärmt und zusammen mit der T-25-Kulturflasche unter eine Sicherheitswerkbank transferiert. Mit einer Pasteur-Pipette wurde die Zellsuspension (1 ml) aufgenommen und in die T-25-Kulturflasche gegeben. Danach wurde die Kultur in den Inkubator gelegt und 24 h inkubiert. Am zweiten Tag der ersten Versuchswoche erfolgte, nach mikroskopischer Begutachtung, ein Mediumwechsel mit 5 ml frischem ADSC-BM.

Am fünften Tag der ersten Versuchswoche erfolgte eine Unterkultivierung der ADSC von einer T-25-Kulturflasche auf zwei T-75-Kulturflaschen. Hierzu wurde zunächst der Mediumüberstand verworfen. Mediumreste wurden durch mehrfaches Waschen mit PBS entfernt. Um die Zellen von der Kulturflasche zu lösen, wurden 3 ml auf 37° C erwärmtes Trypsin hinzugefügt und für 2 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die durch Beklopfen der Kulturflasche ausgelöste Ablösung der Zellen wurde im Anschluss phasenkontrastmikroskopisch kontrolliert. Zur Inaktivierung des Trypsins erfolgte dann die Zugabe einer äquivalenten Menge ADSC-BM. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und bei 1250 U/min für 5 min zentrifugiert. Währenddessen wurden die T-75-Kulturflaschen vorbereitet und mit frischem ADSC-BM befüllt. Nach der Zentrifugation erfolgte das vorsichtige Abpipettieren des

Mediumüberstands. Das Pellet wurde nun in 3 ml frischem ADSC-BM resuspendiert und die Zellsuspension wurde auf die 2 zuvor vorbereiteten T-75-Kulturflaschen verteilt.

Am ersten Tag der zweiten Versuchswoche erfolgte der Mediumwechsel mit je 10 ml frischem ADSC-BM pro T-75-Kulturflasche.

Am zweiten Tag der zweiten Versuchswoche wurden auch hier die OT-Kulturen (ADSC-MK) angelegt. Das Vorgehen war dabei analog zu dem der Anlage der HDMEC-MK. Zunächst wurden die OT und die Quadriperm-Schalen vorbereitet. Dann erfolgte eine Unterkultivierung auf OT. Um die für die Ansatzzelldichte von 180 Zellen/mm² benötigte Menge an Zellsuspension zu ermitteln, erfolgte eine Messung der Zelldichte mittels CASY™. Anschließend wurden die OT-Kulturen so angelegt, dass sich in jedem Fach der Quadriperm-Schale 5 ml Zellsuspension befanden. Die Anlage der ADSC-MK erfolgte in CKM. Nach Fertigstellung der Unterkultivierung folgte die 24-stündige Inkubation unter Standardbedingungen.

3.1.4 Co-Kultivierung

An Tag zwei der zweiten Versuchswoche erfolgte die Anlage der CK als OT-Kulturen (siehe Tabelle 1). Die CK bestand aus zuvor expandierten ADSC und HDMEC. Zunächst wurden die OT wie oben beschrieben vorbereitet. Auch die Unterkultivierung der Zellen zur Anlage der OT-Kulturen erfolgte analog zu dem bei HDMEC-MK und ADSC-MK beschriebenen Vorgehen (siehe Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3) Die CK wurde ebenfalls in CKM angesetzt. Mittels CASY™ erfolgte die Berechnung der Menge an Zellsuspension, die nötig war, um die CK mit jeweils 90 ADSC/mm² und 90 HDMEC/mm² anzusetzen. Jedes Fach der Quadriperm wurde mit 5 ml Zellsuspension befüllt. Im Anschluss erfolgte auch hier die 24-stündige Inkubation unter Standardbedingungen.

3.2 Modifizierter “Co-Culture Scratch Wound Migration Assay”

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Versuchsmodell basiert auf dem „co-culture scratch wound migration assay“ (CCSWMA). Initial wurde er zur Co-Kultivierung von Fibroblasten und Endothelzellen in Kombination mit einer In-vitro-Wunde entwickelt (Oberringer et al., 2007). Hierbei wurden die Kulturen hinsichtlich ihrer Migrations- und Proliferationsaktivität sowie der myofibroblastoiden Differenzierung der Fibroblasten untersucht. Auch im Rahmen dieses

ursprünglichen Setups wurden die Kulturen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (Oberringer et al., 2007), da diese sowohl im Rahmen akuter als auch chronischer Wunden vorkommen.

Das im Rahmen dieser Arbeit modifiziert verwendete Modell wurde speziell etabliert, um die zellulären Interaktionen innerhalb von Co-Kulturen, besonders im Hinblick auf Migration, Differenzierung, Proliferation und Zytokinausschüttung zu untersuchen. Im Rahmen des Assays werden Rückschlüsse auf das Verhalten der Zellen in der CK sowie in der MK möglich. Insgesamt handelt es sich hier um einen zweidimensionalen In-vitro-Wundheilungsassay, in dem die verwendeten Kulturen im Hinblick auf oben genannte Parameter unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen kultiviert werden (Oberringer et al., 2007). In der hier durchgeführten Arbeit wurde ein Teil der OT-Kulturen kontinuierlich in einem Brutschrank unter Standardbedingungen (5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die übrigen OT-Kulturen wurden zunächst über 18 Stunden in einem Inkubator bei 37°C unter hypoxischen Bedingungen in einer abgedichteten, feuchten Kammer mit einer Gasmischung, bestehend aus 95% Stickstoff und 5% CO₂ kultiviert. Unter diesen Bedingungen betrug bei einem Durchfluss von 1 l/min die gemessene Sauerstoffsättigung <5 mmHg (Oberringer et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit stellt die Hypoxie einerseits die im Rahmen der physiologisch heilenden Wunde die mit der Gewebeerletzung zu Beginn auftretende akute Hypoxie dar. Andererseits wird durch die hypoxische Kultivierung auch die in chronischen Wunden herrschende chronische Hypoxie simuliert. Die Reoxygenierung stellt die im Verlauf der Heilung neu etablierte Sauerstoffversorgung des heilenden Gewebes dar.

Nach Anlage der OT-Kulturen erfolgte nach der initialen 24-stündigen Kultivierung unter Standardbedingungen das weitere Prozedere nach einem festen Schema (siehe Tabelle 1). Der dritte Tag der zweiten Versuchswoche markierte den „Start“ des Versuchs. Zunächst erfolgte das „Scratching“, also das Setzen der In-vitro-Wunden durch mechanisches Ablösen der Zellen auf Höhe der zuvor auf den OT markierten Stellen. Hierfür wurde mit einer Pipettenspitze mit 1000 µl Messvolumen im Verlauf der Markierung auf dem Glas vom oberen zum unteren Rand des OT entlang gefahren.

Beim 0 h N-Präparat erfolgte anschließend die Entnahme von 4 x 500 µl ZKÜ, dieser wurde in 4 Eppendorfgefäßen bei -80° C für die spätere Verwendung asserviert. Daraufhin erfolgte die Fixierung von 0 h N. Für die Fixierung wurden zunächst drei Waschschrte in jeweils 5 ml PBS durchgeführt. Zur Erhöhung der Zell- und Kernpermeabilität für die spätere Immunfärbung erfolgte der „Hypotonie“-Schritt durch Inkubation mit Kaliumchlorid (KCl; 0,05 mol/l) bei 37° C über 5 min. Um die Zellen zu fixieren wurde der OT für 10 min in eine Küvette mit Methanol (-20° C) eingestellt. Anschließend erfolgte, nach Lufttrocknung, die Eindeckung des OT mit PBS/Glycerin (1:9). Die Lagerung erfolgte bis zur Immunfärbung bei -20° C.

Die übrigen OT-Kulturen wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Zwei Kulturen wurden während der folgenden 18 h im Inkubator unter Standardbedingungen inkubiert, die übrigen beiden Kulturen wurden in der feuchten Kammer über 18 h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert.

Nach Ende der 18 h erfolgte am vierten Tag der zweiten Versuchswoche die Entnahme von jeweils 4 x 500 µl ZKÜ bei jeweils einer Kultur, welche unter Standardbedingungen (18 h N) bzw. unter hypoxischen Bedingungen (18 h H) kultiviert wurde. Beide OT-Kulturen wurden wie oben beschrieben fixiert und gelagert.

Anschließend wurden die verbleibenden OT-Kulturen bis zum fünften Tag der zweiten Versuchswoche über 24 h unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Nach Entnahme und Kryokonservierung von jeweils 4 x 500 µl ZKÜ erfolgte die Fixierung und Lagerung beider OT wie oben beschrieben. Eine Kultur wurde also über 42 h unter normoxischen Bedingungen kultiviert (42 h N) und eine Kultur über 18 h unter Hypoxie und 24 h Normoxie (42 h H/R). Abbildung 1 zeigt typische HDMEC-MK, ADSC-MK und CK sowie eine typische In-vitro-Wunde vor vor Fixierung.

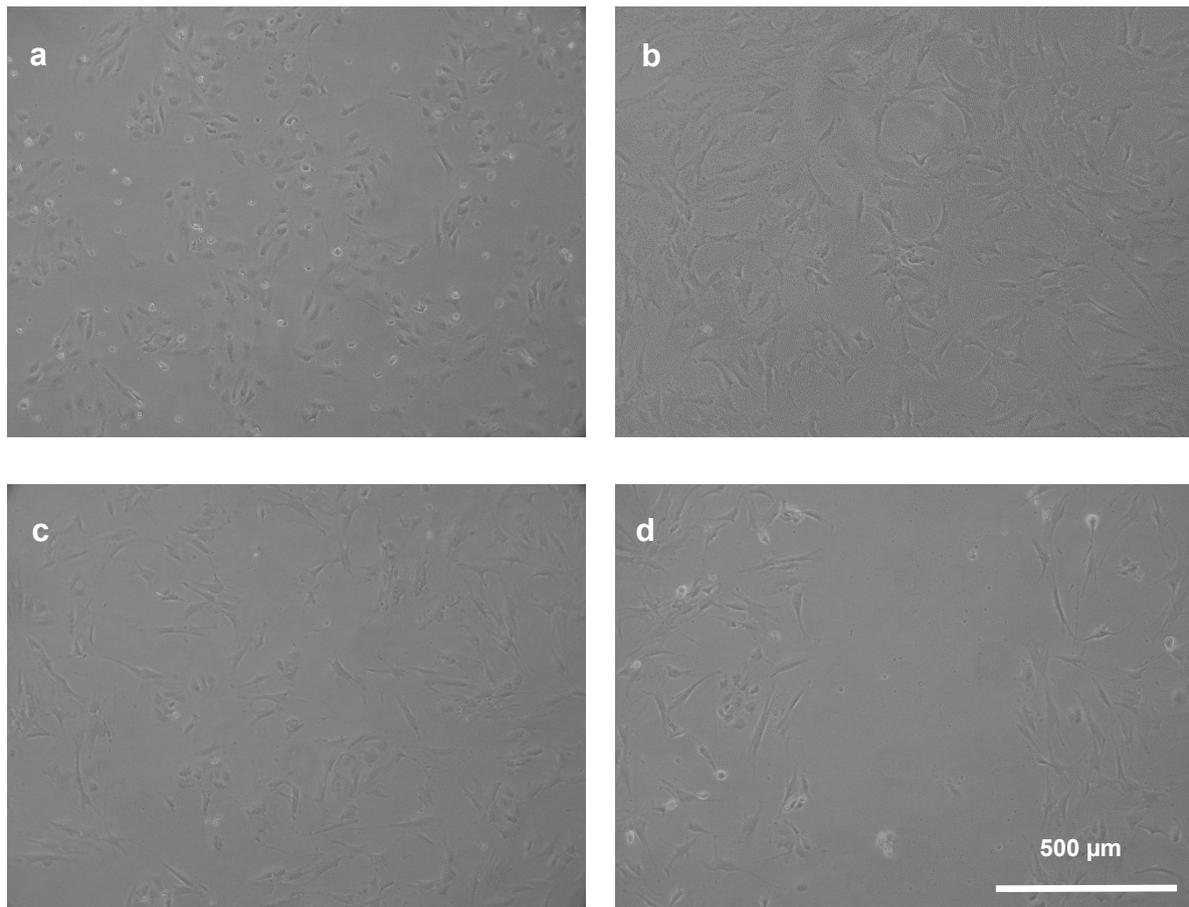


Abbildung 1 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von typischen HDMEC-MK (a), ADSC-MK (b), CK (c) und dem Bereich einer In-vitro-Wunde (d).

3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine weit verbreitete Methode zur Visualisierung und damit zum Nachweis unterschiedlicher Antigene. Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung beruht auf der Verwendung von gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten Antikörpern (AK). Hierzu gibt es zwei Varianten zur Visualisierung des Antigens: Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung ist der fluoreszierende Farbstoff bereits an den Primärantikörper konjugiert. Bei der indirekten Methode wird zunächst ein gegen das Antigen gerichteter Primärantikörper aufgetragen, anschließend wird das Antigen durch einen gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, dargestellt (Im et al., 2019).

3.3.1 Verwendete Antikörper

Zur Unterscheidung zwischen ADSC und HDMEC wurde ein Antigen gewählt, welches als endothelialer Marker fungiert. In dieser Arbeit wurde hierfür vWF verwendet. vWF ist ein Glykoprotein, welches im Rahmen der Blutgerinnung die Adhäsion von Thrombozyten an das subendotheliale Bindegewebe vermittelt (Sadler, 1998). Neben Endothelzellen sind auch Megakaryozyten in der Lage, vWF zu exprimieren (Sadler, 1998). Hier wurde als Primärantikörper ein vWF-Antikörper aus dem Kaninchen genutzt.

Im Rahmen der Wundheilung differenzieren aktivierte Fibroblasten zu α -SMA-exprimierenden, kontraktilen Myofibroblasten (Cherng et al., 2008; Hinz, 2016). Zur Darstellung von α -SMA-exprimierenden ADSC (Myo-ADSC) wurde ein gegen α -SMA gerichteter Antikörper verwendet. Bei diesem Primärantikörper handelt es sich um einen Antikörper aus der Maus.

Ki-67/MIB-1 ist ein nukleäres Protein (Gerdes et al., 1983). Es wird exprimiert von Zellen außerhalb der G0-Phase, also in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus (Scholzen & Gerdes, 2000). Daher kann Ki-67/MIB-1 als Proliferationsmarker genutzt werden (Gerdes et al., 1983; Guillaud et al., 1991). In dieser Arbeit wurde ein muriner, gegen Ki-67/MIB-1 gerichteter Antikörper verwendet. Als Sekundärantikörper wurden Goat-anti-Rabbit (GaR)-Cy3 und Goat-Anti-Mouse (GaM)-Alexa 488 gewählt. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde der sich an die DNS anlagernde Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) verwendet, der im Eindeckmedium Antifade enthalten ist.

3.3.2 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfärbung erfolgte nach einem standardisierten Protokoll, zur Optimierung des Resultats wurde während der Immunfluoreszenzfärbung abgedunkelt gearbeitet und die Antikörperlösungen wurden zusätzlich vor Licht geschützt gelagert. Diese wurden im Vorfeld der Immunfärbung in der jeweiligen Verdünnung in PBS/0,1% BSA (Bovines Serumalbumin) angesetzt. Unmittelbar vor Beginn der Immunfärbung wurde der Waschpuffer PBS-T aus PBS, 0,5% Tween 20 und destilliertem Wasser angesetzt. Vorbereitend wurden 3 Küvetten für die durchzuführenden Waschschriffe und eine feuchte Kammer bereitgestellt.

Die OT-Kulturen wurden aus der Lagerung entnommen und die Deckgläser wurden entfernt. Es erfolgte der erste Waschschriff, pro Waschschriff wurden die OT für je drei mal fünf Minuten in mit PBS-T befüllte Küvetten gegeben. Danach wurde der erste Antikörper (anti-vWF) auf den gesamten OT aufgetragen und es wurde erneut ein Deckglas aufgelegt. Daraufhin erfolgte die 30-minütige Inkubation in einer feuchten Kammer. Die folgenden Inkubationsschritte erfolgten immer analog, vor der Inkubation wurden Deckgläser auf den OT gelegt und nach der Inkubation wieder entfernt. Nach Ende der Inkubation schloss sich ein erneuter Waschschriff an. Dann erfolgte die Inkubation mit dem ersten Sekundäantikörper GaR-Cy3.

Im nächsten Schriff wurde der OT in zwei Färbefelder aufgeteilt: Auf das linke Färbefeld (FF 1) wurde der Antikörper gegen α -SMA aufgetragen, auf das rechte (FF 2) der Antikörper gegen Ki-67/MIB-1 (Abbildung 2). Nach erneuter Inkubation und Waschschriff wurde der zweite Sekundäantikörper GaM-Alexa-488 auf den gesamten Objektträger aufgetragen und erneut inkubiert, gefolgt von einem weiteren Waschschriff.

Danach wurden die OT für jeweils drei Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe (70, 80 und 96 vol%) gegeben und anschließend luftgetrocknet.

Als letzter Schriff folgte die Applikation von Antifade-DAPI zur Färbung der Zellkerne und Stabilisierung der Färbung. Nach dem Eindecken erfolgte die Lagerung der fertigen Präparate bis zur Auswertung bei +4°C.

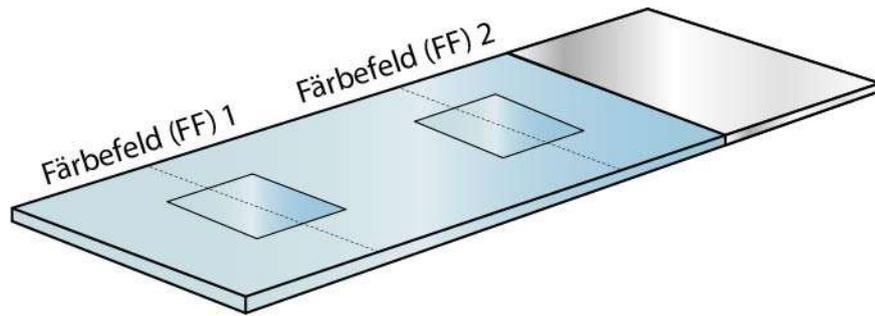


Abbildung 2: Aufteilung der OT in Färbefelder (FF) im Rahmen der Immunfärbung. Der gegen vWF gerichtete AK (sowie der erste Sekundär-AK) wurde auf den gesamten OT aufgetragen. Der AK gegen α -SMA wurde auf das FF 1 aufgetragen, simultan der gegen Ki-67/MIB-1 auf FF 2. Der zweite Sekundär-AK sowie im Anschluss Antifade-DAPI wurden auf den gesamten OT aufgetragen. Die durchgezogenen Linien markieren die Lage der In-vitro-Wunden.

3.4 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Anhand der immungefärbten Präparate (n=90) erfolgte fluoreszenzmikroskopisch die Bestimmung der Parameter Proliferation (in Bezug auf Entwicklung der Zellzahl und des Zellzyklus), Apoptose, Migration und Differenzierung der ADSC in α -SMA-positive Myo-ADSC. In der CK wurde die Auswertung von Proliferation und Apoptose in Bezug auf die jeweilige Zellpopulation durchgeführt. Die Präparate wurden vor der Auswertung verblindet.

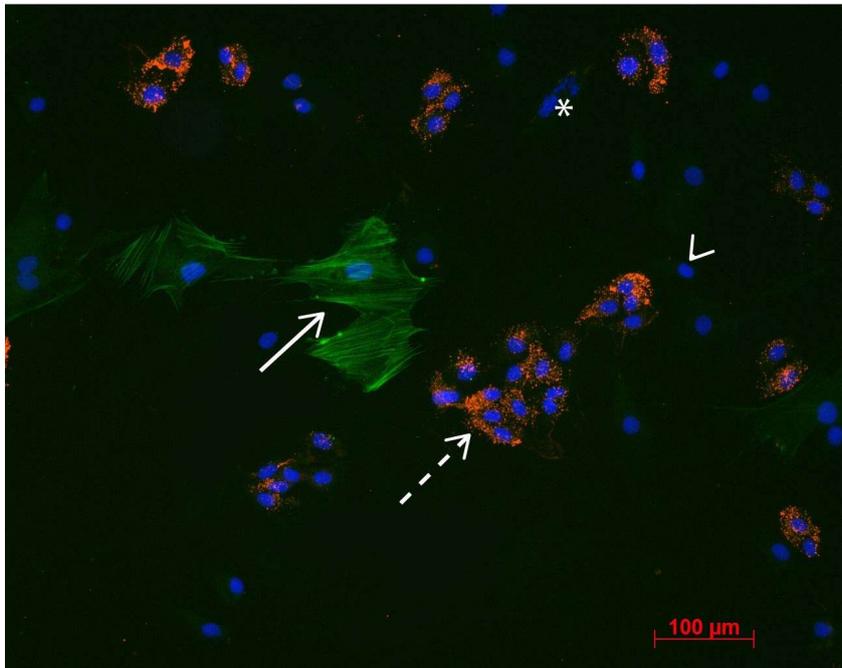


Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer CK; durchgezogener Pfeil: Myofibroblastoid differenzierte ADSC (grünes Signal, α -SMA/Alexa-488); unterbrochener Pfeil: HDMEC (in Gruppen), rotes Signal, vWF/Cy3); Pfeilspitze: nicht differenzierte ADSC (nur blauer Zellkern, DAPI) *: apoptotische Zelle mit Mikronuklei (nur blauer Zellkern, DAPI).

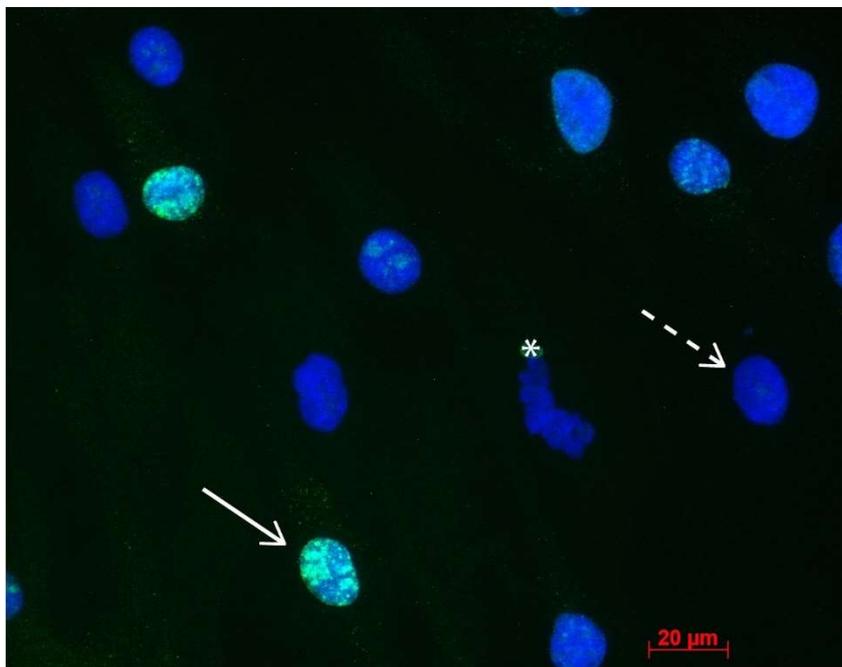


Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer ADSC-MK. Durchgezogener Pfeil: Ki-67/MIB-1-positive, proliferierende ADSC (grünes Signal, Ki-67/MIB-1/Alexa-488); unterbrochener Pfeil: Ki-67/MIB-1-negative, ruhende ADSC (nur blauer Zellkern, DAPI); *: apoptotische ADSC mit beginnendem Kernzerfall (nur blau gefärbter Zellkern, DAPI).

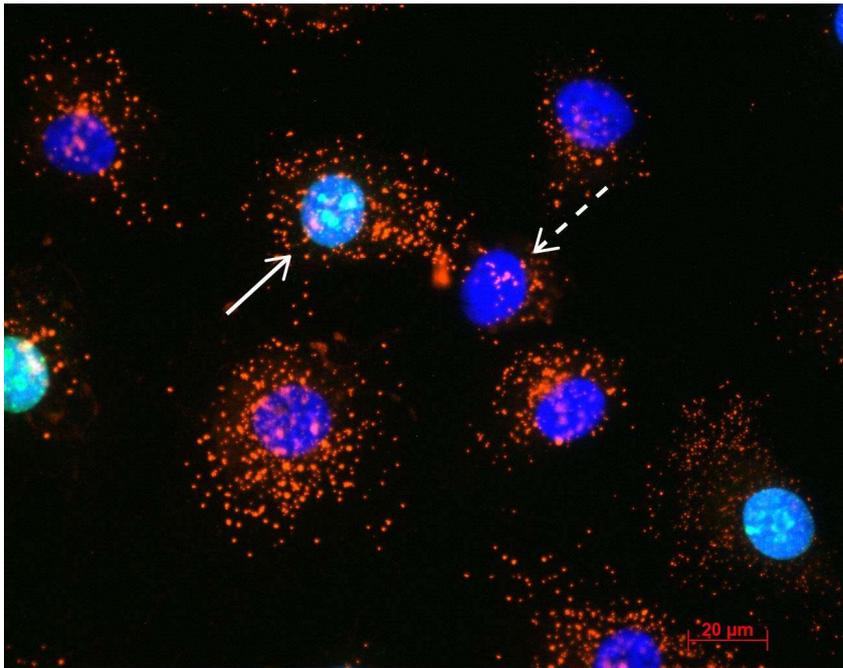


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer HDMEC-MK. Durchgezogener Pfeil: Ki-67/MIB-1-positive, proliferierende HDMEC (grünes Signal, Ki-67/MIB-1/Alexa-488; rotes Signal, vWF/Cy3); unterbrochener Pfeil: Ki-67/MIB-1-negative, ruhende HDMEC (rotes Signal, vWF/Cy3).

Abbildungen 3, 4 und 5 zeigen charakteristische Ausschnitte immungefärbter Präparate, anhand derer die Zugehörigkeit zum jeweiligen Zelltyp, Apoptose, zur Differenzierung der ADSC und zum Zellzyklus ausgewertet wurde. Die Auswertung von Proliferation, Differenzierung der ADSC zu Myo-ADSC und Apoptose erfolgte unter 400-facher Vergrößerung, die Migration wurde unter 50-facher Vergrößerung beurteilt. Die Quantifizierung der Proliferation erfolgte anhand der Zelldichte in Zellen/mm² und anhand des Anteils Ki-67/MIB-1-positiver Zellen. Der prozentuale Anteil Ki-67/MIB-1-positiver Zellen wurde in 20 GF (im FF 2) bestimmt. In CK wurde der dieser Anteil in Bezug auf den jeweiligen Zelltyp bestimmt. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die Zellzahl in 40 Gesichtsfeldern (GF) ermittelt, mithilfe dieses Wertes erfolgte die Berechnung der Zelldichte pro mm². Bei den CK wurde entsprechend die Zellzahl des jeweiligen Zelltyps bestimmt und der prozentuale Anteil an den gesamten Zellen errechnet. Die 40 GF wurden wie folgt ausgezählt: Pro Färbefeld wurden je 5 GF abseits der In-vitro-Wunde und des OT-Rands entlang der auf Abbildung 6 abgebildeten Pfeile an 8 Stellen ausgezählt.

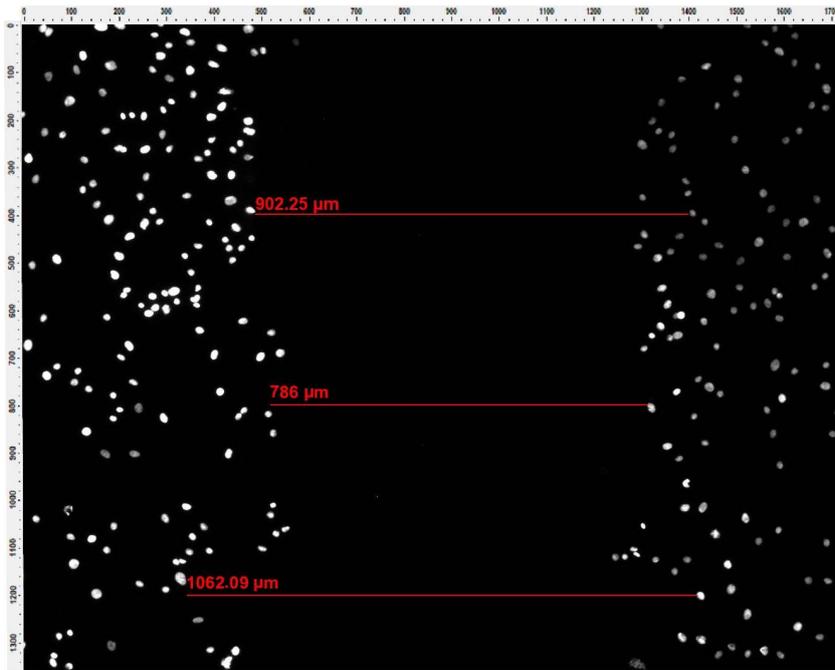


Abbildung 7: Auswertung der Migration anhand des Zellkernabstands mit der AxioVision Software. Die Auswertung der Migration erfolgte entlang der 400 µm-, 800 µm- und 1200-µm-Markierung des Bildes.

3.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit Hilfe des ELISA-Verfahrens wurde die Konzentration der Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1 und VEGF im ZKÜ bestimmt.

3.5.1 Prinzip des ELISA

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ist ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Antigenen, zum Beispiel Zytokinen. Das Prinzip der Antigendetektion beruht auf der Verwendung von gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten Antikörpern. Die Antikörper sind an ein Enzym, typischerweise Alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase, gekoppelt. Dabei wird in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration ein Substrat umgesetzt, wobei ein Farbstoff entsteht. Dieser kann photometrisch gemessen und so die Konzentration des nachzuweisenden Antigens durch Mitführen einer Standardverdünnungsreihe bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde ein sogenannter „Sandwich-ELISA“ verwendet. Bei diesem Verfahren ist ein Fänger-Antikörper an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gekoppelt, der das Antigen in

der Probe spezifisch bindet. Durch Waschen werden störende Substanzen der Probe eliminiert. Ein zweiter, mit einem Enzym gekoppelter Antikörper, wird hinzugefügt, der das Antigen an einem anderen Epitop bindet, es entsteht die Sandwich-Struktur, bei der das Antigen zwischen 2 Antikörpern liegt. Das Enzym setzt das anschließend hinzugefügte Substrat um. Das verwendete Substrat wird in Abhängigkeit des eingesetzten Enzyms gewählt. Dabei entsteht ein photometrisch zu messender Farbstoff (Aydin, 2015; Jordan, 2009).

3.5.2 Durchführung

Die Assays wurden laborseitig durchgeführt. Die Quantifizierung der Zytokine IL-6, IL-8, VEGF und MCP-1 erfolgte aus dem ZKÜ der n=90 Kulturen mit dem jeweils spezifischen Quantikine® ELISA Human Kit. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurden Konzentrationen für die je n=6 HDMEC- und ADSC-MK sowie für die CK ermittelt.

Zur Vorbereitung wurden der Waschpuffer und die Standardverdünnungsreihe nach Angaben des Herstellers hergestellt. Einige Proben wurden mit der entsprechenden Verdünnungslösung so weit verdünnt, dass deren Zytokinkonzentrationen im jeweiligen Messbereich lagen. Die Substratlösung wurde frühestens 15 min vor Zugabe angesetzt. Zunächst wurden das jeweilige Assay-Verdünnungsmittel (IL-6: 100 µl, IL-8: 100 µl, VEGF: 50 µl) in jedes Well der Mikrotiterplatte gegeben. Die zum Teil verdünnten Proben und die Standardverdünnungsreihe wurden jeweils in dem u.g. Volumen in ein Well pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert: IL-6: 100 µl, IL-8: 50 µl, MCP-1: 200 µl, VEGF: 200 µl.

Anschließend wurden die Lösungen aus den Wells entfernt und es erfolgte ein 4-maliges Waschen durch Zugabe von 400 µl Waschpuffer pro Waschschrift. Im nächsten Schritt wurden die konjugierten Antikörper zugegeben, hierbei handelte es sich um gegen das jeweilige Zytokin gerichtete polyklonale Antikörper, die mit Meerrettichperoxidase gekoppelt sind (IL-6-Assay: 200 µl, 2 h Inkubationszeit, IL-8-Assay: 100 µl, 1 h, MCP-1-Assay: 200 µl, 1 h, VEGF-Assay: 200 µl, 2 h). Nach weiteren Waschschriften erfolgte die Zugabe der jeweiligen Substratlösung, bestehend zu gleichen Teilen aus stabilisiertem Wasserstoffperoxid und dem Chromogen Tetramethylbenzidin. Es wurden jeweils 200 µl des Substrats zugefügt. Inkubiert wurde 20 min (IL-6 und VEGF) bzw. 30 min (IL-8 und MCP-1). Die enzymatische Reaktion wurde mittels Stopplösung beendet und die spektroskopische Auswertung mit einem Microplate-Reader schloss sich direkt an. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen, als Referenzwellenlänge wurde 510 nm gewählt. Die Zytokinkonzentrationen wurden unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren mithilfe der Magellan™ Software durch Verwendung einer Kalibrierungskurve ermittelt.

3.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Testung der Parameter Proliferation, Migration, myofibroblastoide Differenzierung, Apoptose und Zytokinsekretion wurde innerhalb beider MK sowie der CK die einzelnen Gruppen, bestehend aus den je n=6 Werten der Versuchswiederholung zum jeweiligen Zeitpunkt bzw. zur jeweiligen Bedingung, verglichen. Entsprechend wurden Unterschiede im Zeitverlauf unter normoxischen Bedingungen, Unterschiede zwischen Hypoxie bzw. Hypoxie und Reoxygenierung und Normoxie sowie im Zeitverlauf zwischen Hypoxie gefolgt von Reoxygenierung betrachtet.

Unterschiede der Gruppen wurden mit Analysis of Variance (ANOVA) und einem post-hoc Test (Student Newman Keuls) untersucht. War keine Normalverteilung vorhanden, wurde stattdessen ein Rangsummentest (ANOVA on ranks) durchgeführt. Wurden zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde ein t-Test bzw. ein Mann-Whitney-Rangsummentest durchgeführt. Unterschiede waren signifikant, wenn der p-Wert <0,05 war. In den folgenden Abbildungen zeigen sich Unterschiede durch den Einfluss von Hypoxie bzw. Hypoxie und Reoxygenierung im Vergleich zur Normoxie mit unterbrochenen Linien. Signifikante Unterschiede im Zeitverlauf werden durch durchgehende Linien dargestellt. Unterschiede der Gruppen 18 h N und 42 h H/R sowie 18 h H und 42 h N wurden zwar getestet, die Ergebnisse wurden aber zur Verbesserung der Übersichtlichkeit nicht in den Abbildungen gezeigt.

3.7 Übersicht Geräte, Zellen, Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Hersteller
Brutschrank Heraeus BBD 6220	Heraeus, Hanau, D
Brutschrank (mit Hypoxiekammer) Heraeus B12	Heraeus, Hanau, D
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge Hermle Z400K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, D
CASY™ Zellzählssystem, Model TT, Serien-Nr. TT-2EC-1196	Schärfesystem GmbH, Reutlingen, D
Wasserbad TWB12	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 Plus mit Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss, Göttingen, D

Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25 mit Digital Still Camera, Model DSC-S75	Carl Zeiss, Göttingen, D Sony, Tokio, JP
Microplate Reader Infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
Reinstwasseranlage Arium 661	Sartorius AG, Göttingen, D
Zellen und Medium	Hersteller
HDMEC-c Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen, Produkt-Nr C-12210	Promocell GmbH, Heidelberg, D
EGM Endothelial Cell Growth Medium MV (Ready-to-use) Produkt-Nr C-22020, Bestehend aus Basal Medium und SupplementMix	Promocell GmbH, Heidelberg, D
hADSC Humane adipöse Stammzellen, Katalog-Nr. PT-5006	Lonza, Basel, CH
Adipose Derived Stem Cells Growth Basal Medium Katalog-Nr. PT-3273 und Supplements ADSC-GM SQ Kit; Katalog-Nr. PT-44503	Lonza, Basel, CH
Materialien Zellkultur	Hersteller
T-25-Kulturflasche: cell culture flask, 50 ml, 25 cm ² , steril, Produkt-Nr. 690175	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
T-75-Kulturflasche: cell culture flask, 200 ml, 75 cm ² , steril, Produkt-Nr. 658175	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
quadriPERM [®] dishes, Produkt-Nr. 96077307	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Objektträger 76x26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Arbeitsutensilien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Reagenzröhrchen 50 ml mit konischem Boden, steril, Produkt-Nr. 227261	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Einmal-Pasteurpipette 3 ml steril, Bestell-Nr. EA66.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Eppendorf Research Pipettenspitzen: 0,5-10 µl 10-100 µl 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Biosphere Filter tips, 1000 µl (Pipettenspitze zum Scratches), Katalog-Nr. 70.762.211	Sarstedt, Nümbrecht, D
Glasküvetten, Katalog-Nr. H 550.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Zentrifugenröhrchen: 14 ml PP-Röhrchen, steril, Katalog-Nr. 187261	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Eppendorfgefäße: Rotilabo-Reaktionsgefäße 1,5 ml; Katalog-Nr. 4182.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Chemikalien	Hersteller
BSA (Bovines Serumalbumin), Verwendung zur Antikörperverdünnung i.R. der Immunfärbung zusammen mit PBS Katalog-Nr. 10 238 040 001	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Ethanol (+1% MEK) vergällt, Bestell-Nr. 702543	Zentrale Beschaffung der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, D
Glycerol, Katalog-Nr. 3783.1 Verwendung zur Eindeckung fixierter, aber noch nicht immungefärbter OT zusammen mit PBS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Methanol, Katalog-Nr. 4637.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
PBS-Tabletten (Phosphate Buffered Saline), Katalog-Nr. BR0014G	Oxoid Limited, Hampshire, GB
Gibco™ Trypsin-EDTA (0,05%), Katalog-Nr. 25300054	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Tween 20, Artikel-Nr. 9127.2 Verwendung als Waschpufferzusatz: „PBS-T“ aus Aqua dest., PBS und Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Immunfärbung	Hersteller
Monoklonaler anti- α -smooth-muscle-actin-Antikörper, Produkt-Nr. A2547	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Polyklonaler Anti-von-Willebrand-Faktor-Antikörper, Produkt-Nr. 12880	Dianova GmbH, Hamburg, D
Monoklonaler Ki-67/MIB-1-Antikörper, Produkt-Nr. M7240	Dako, Glostrup, DK
Polyklonaler Goat-anti-Mouse-Alexa-Flour 488-Antikörper, Produkt-Nr. 115-545-003	Dianova GmbH, Hamburg, D
Polyklonaler Goat-anti-Rabbit-Cy3-Antikörper, Produkt-Nr. 111-166-045	Dianova GmbH, Hamburg, D
VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol), Produkt-Nr. H-1200	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Deckgläser klein, 18x18 mm, Katalog-Nr. 631-1567	VWR international, Darmstadt, D
Deckgläser groß, 24x50 mm, Katalog-Nr. 631-0146	VWR international, Darmstadt, D
ELISA	Hersteller
Quantikine® ELISA Human IL-6 Immunoassay, Katalog-Nr. D6050	R&D systems, Minneapolis, USA
Quantikine® ELISA Human IL-8/CXCL8 Immunoassay, Katalog-Nr. D800C	R&D systems, Minneapolis, USA
Quantikine® ELISA Human CCL2/MCP-1 Immunoassay, Katalog-Nr. DCP00	R&D systems, Minneapolis, USA
Quantikine® ELISA Human VEGF Immunoassay, Katalog-Nr. DVE00	R&D systems, Minneapolis, USA

4 Ergebnisse

4.1 Proliferation - Zelldichte

Zur Bestimmung der Proliferation wurde die Entwicklung der Zelldichte in Zellen/mm² der einzelnen Zelltypen sowohl über die Zeit als auch unter veränderten Sauerstoffbedingungen betrachtet.

4.1.1 Mono-Kultur: HDMEC

Zu Beginn des Experiments (0 h N) zeigten die Endothelzellen in MK eine durchschnittliche Zelldichte von 167 Zellen/mm² (Standardabweichung (sd) 52) bei einer gewünschten Ansatzzellendichte von 180 Zellen/mm² (Abbildung 8). Unter normoxischen Bedingungen konnte die Zelldichte der HDMEC nach 18 h (18 h N) signifikant auf 253 Zellen/mm² (sd 57) und anschließend nach weiteren 24 h weiter signifikant auf 405 Zellen/mm² (sd 204) ansteigen. Insgesamt zeigte sich also eine gute Proliferation der HDMEC unter normoxischen Bedingungen über die Zeit.

Im Vergleich dazu zeigte sich die Zelldichte der HDMEC unter hypoxischen Bedingungen konstant. Nach 18 h H lag die Zellzahl der HDMEC bei durchschnittlich 186 Zellen/mm² (sd 57), es zeigte sich keine signifikante Steigerung der Zelldichte. Auch nach 24-stündiger Reoxygenierung zeigte sich keine signifikante Veränderung der Zelldichte, sie lag bei durchschnittlich 169 Zellen/mm² (sd 39). Nach 18 h N war die Zelldichte der Endothelzellen im Vergleich zu 18 h H signifikant erhöht, auch war die Zelldichte nach 42 h N signifikant höher als nach 42 h H/R. Damit steigerten mono-kultivierte HDMEC nur unter normoxischen, nicht aber unter hypoxischen Bedingungen ihre Zelldichte.

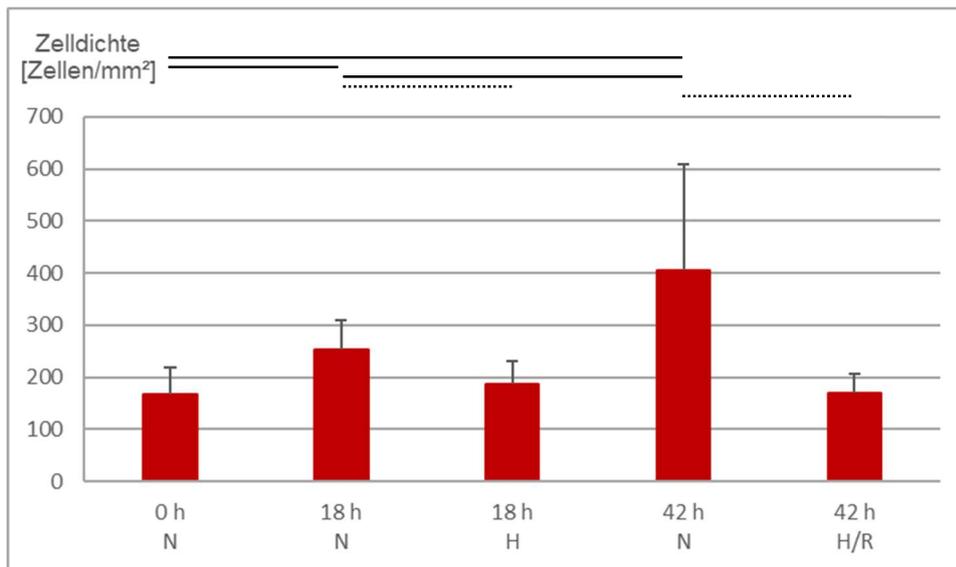


Abbildung 8: Zelldichte der HDMEC in Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h (0 h N), nach 18 h Normoxie (18 h N), nach 18 h Hypoxie (18 h H), nach 42 h Normoxie (42 h N) und nach 18 h Hypoxie mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung (42 h H/R); n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

4.1.2 Mono-Kultur: ADSC

Zu Beginn des Experiments zeigten die mono-kultivierten ADSC eine durchschnittliche Zelldichte von 187 Zellen/mm² (sd 62) (Abbildung 9). Die Zelldichte stieg nach 18 h Normoxie signifikant auf 380 Zellen/mm² (sd 133) sowie nach 42 h Normoxie erneut signifikant auf 777 Zellen/mm² (sd 269) an. Die ADSC konnten also in MK, wie die HDMEC, unter normoxischen Sauerstoffbedingungen ihre Zelldichte steigern.

Bei den mono-kultivierten ADSC zeigte sich nach initialer Hypoxie, im Vergleich zum Ausgangswert an 0 h N, ein signifikanter Anstieg der Zelldichte auf 275 Zellen/mm² (sd 39). Nach Reoxygenierung zeigte sich die Zelldichte mit 332 Zellen/mm² (sd 74) konstant, jedoch war diese zu diesem Zeitpunkt signifikant niedriger als die Zelldichte nach durchgehender Normoxie. Allerdings zeigte sich auch nach 42 h H/R eine signifikante Erhöhung der Zelldichte gegenüber dem Ausgangswert. ADSC konnten in diesem Setup unter H und H/R proliferieren.

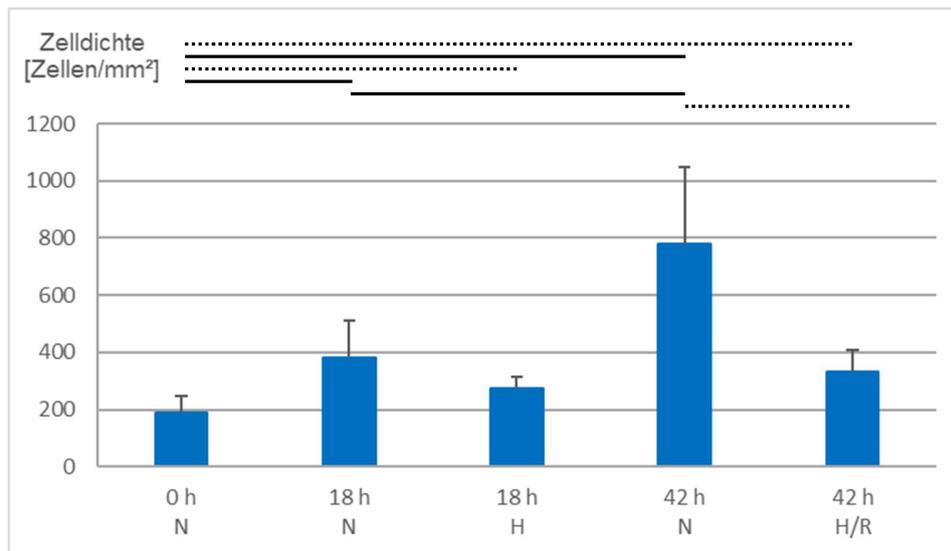


Abbildung 9: Zelldichte der ADSC in Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

4.1.3 Co-Kultur

In der Co-Kultur zeigten die HDMEC anfänglich eine durchschnittliche Zelldichte von 64 Zellen/mm² (sd 19) bei einer gewünschten Ansatzzellendichte von 90 Zellen/mm² an 0 h N (Abbildung 10).

Unter normoxischen Sauerstoffbedingungen zeigten HDMEC in der CK im Gegensatz zum Verhalten in MK eine konstante Zelldichte mit einer geringen Tendenz zur Proliferation. Nach 18 h N lag die Zelldichte bei 78 Zellen/mm² (sd 26), nach 42 h N zeigte sich eine Zelldichte von durchschnittlich 83 Zellen/mm² (sd 30).

Auch unter hypoxischen Bedingungen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Zelldichte der co-kultivierten HDMEC. Nach 18 h H lag die Zelldichte bei 51 Zellen/mm² (sd 16), nach Reoxygenierung lag sie bei 40 Zellen/mm² (sd 11). Nur der Vergleich zwischen 42 h N und 42 h H/R zeigte eine signifikant höhere Zelldichte nach durchgehend normoxischen Bedingungen.

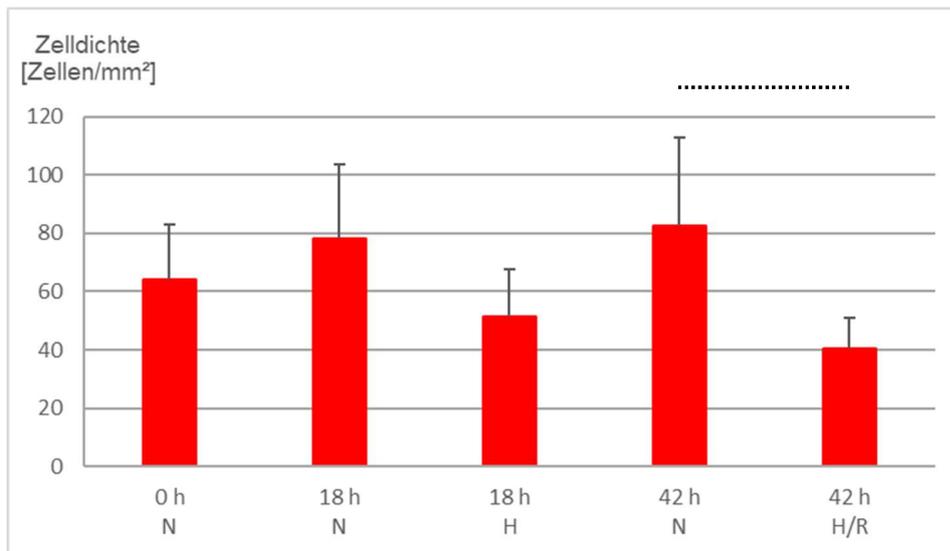


Abbildung 10: Zelldichte der HDMEC in Co-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung, durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen: $p < 0,05$.

ADSC in CK zeigten zu Beginn eine Zelldichte von 76 Zellen/mm² (sd 24). Unter normoxischen Bedingungen entwickelte sich im Zeitverlauf nach 18 h ein signifikanter Anstieg der Zelldichte auf 166 Zellen/mm² (sd 54) bzw. auf 330 Zellen/mm² (sd 75) nach 42 h N (Abbildung 11). Nach initialer Hypoxie lag die Zelldichte der co-kultivierten ADSC bei 110 Zellen/mm² (sd 24), im Vergleich zum Ausgangswert ließ sich nach Hypoxie keine signifikante Veränderung feststellen, allerdings zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen 18 h N und 18 h H.

Nach Reoxygenierung zeigte sich jedoch im Vergleich zu 0 h N eine signifikante Erhöhung der Zelldichte auf 168 Zellen/mm² (sd 26), was auf eine gewisse „Erholung“ durch die Reoxygenierung hinweisen kann. Auch in der CK mit HDMEC zeigten ADSC, wie auch in MK, eine gewisse Proliferationstendenz unter hypoxischen Bedingungen.

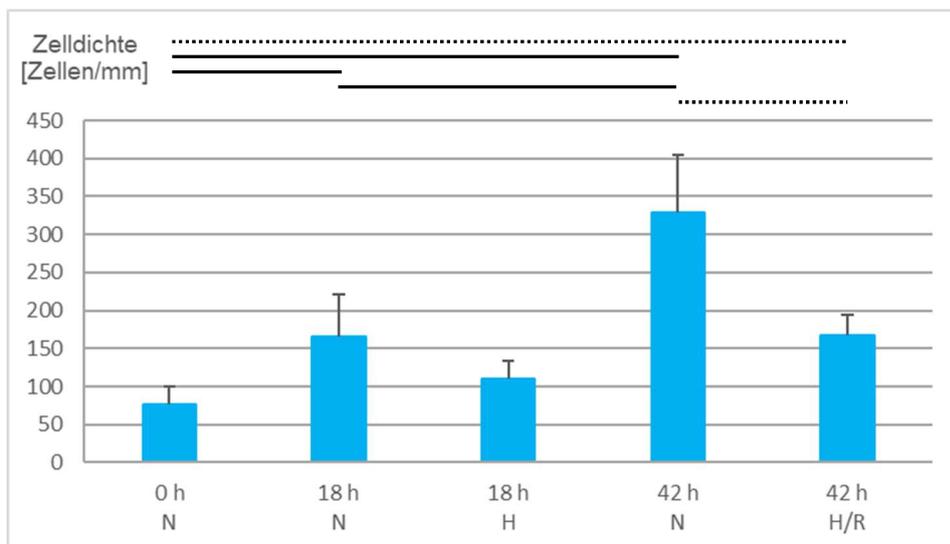


Abbildung 11: Zelldichte der ADSC in Co-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung, durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

Die folgende Abbildung 12 gibt die prozentuale Entwicklung des jeweiligen Zelltyps in der CK zu den unterschiedlichen Bedingungen wieder. Das an 0 h N weitgehend ausgeglichene Verhältnis zwischen HDMEC und ADSC verschiebt sich durch die stagnierende Proliferation der HDMEC zugunsten der ADSC.

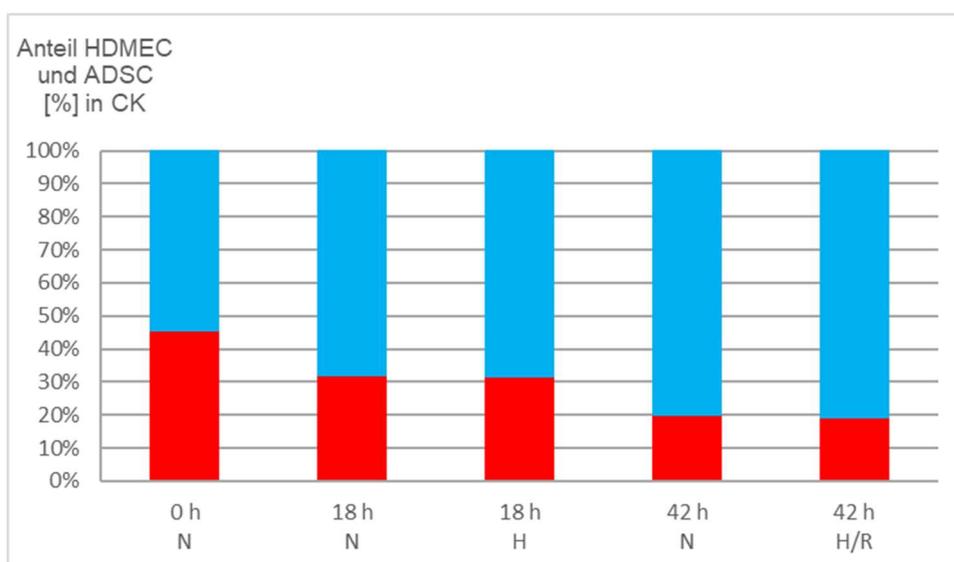


Abbildung 12: Prozentualer Anteil von HDMEC ■ **und ADSC** ■ in Co-Kultur zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6.

4.2 Proliferation - Zellzyklus

Zur Beurteilung der Proliferation anhand der Zellzyklus-Phasen wurde der Anteil der jeweiligen Zelltypen, die sich außerhalb der G0-Phase befanden, anhand der Expression von Ki-67/MIB-1 bestimmt.

4.2.1 Mono-Kultur: HDMEC

Der Anteil Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC in MK zeigte unter allen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 13). Zu Beginn lag der Anteil bei 58,82% (sd 13,16), nach 18 h Normoxie lag er bei 56,56% (sd 14,97) und nach 42 h Normoxie bei 57,90% (sd 9,74). Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich der Anteil der sich außerhalb der G0-Phase befindlichen Zellen bei 49,36% (sd 18,13), nach Reoxygenierung bei 41,15% (sd 13,39). Insgesamt zeigte sich, trotz fehlender signifikanter Unterschiede, ein Trend zu einem geringeren Anteil Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC nach Hypoxie bzw. Hypoxie/Reoxygenierung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Dies spiegelt sich auch in der geringeren Proliferation in Bezug auf die Zelldichte unter Hypoxie und nach Reoxygenierung wider.

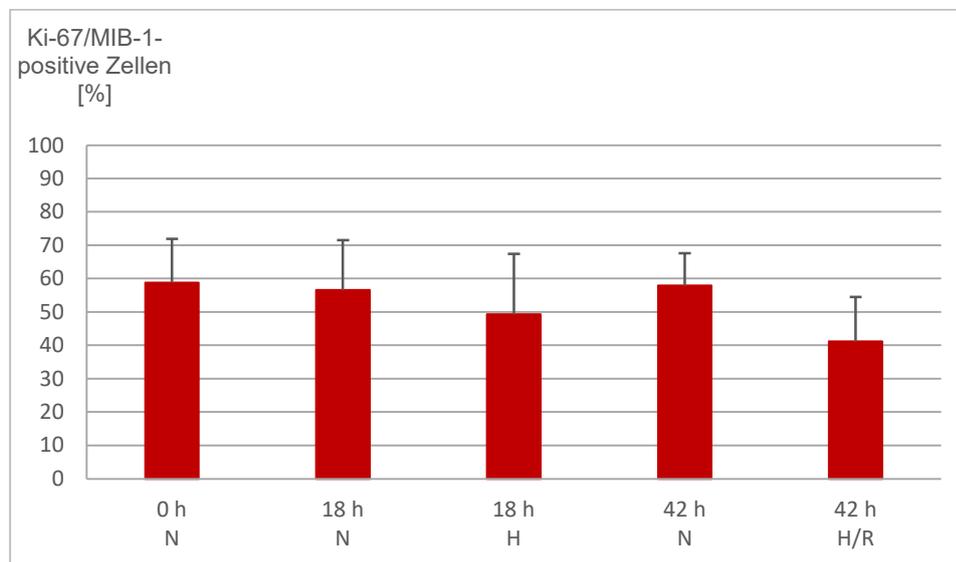


Abbildung 13: Prozentualer Anteil Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC in Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; Mittelwerte mit Standardabweichung, n=5.

4.2.2 Mono-Kultur: ADSC

Der Anteil Ki-67/MIB-1-positiver ADSC in der MK zeigte zu jedem Zeitpunkt unter allen Sauerstoffbedingungen konstant hohe Werte über 70%, verglichen mit der HDMEC-MK, in der der Anteil unter 60% lag (Abbildung 14).

Zu Beginn des Experiments lag der Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven ADSC bei 85,08% (sd 8,67). Unter normoxischen Bedingungen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich des Zellzyklus, nach 18 h N lag der Anteil Ki-67/MIB-1-positiver ADSC bei 90,33% (sd 4,18) und nach 42 h N bei 74,97% (sd 10,12). Dieser Anteil zeigte sich auch unter dem Einfluss der Hypoxie konstant. So lag der Anteil der ADSC außerhalb der G0-Phase nach 18 h H bei 82,80% (sd 9,52) und nach 42 h H/R bei 74,34% (sd 9,99). Da es keine signifikanten Unterschiede zwischen den hypoxischen Gruppen und den jeweiligen Kontrollen gab, lässt sich schließen, dass ADSC in der MK unter hypoxischen Bedingungen proliferieren können, was sich auch anhand deren Verhalten hinsichtlich der Zelldichte zeigt.

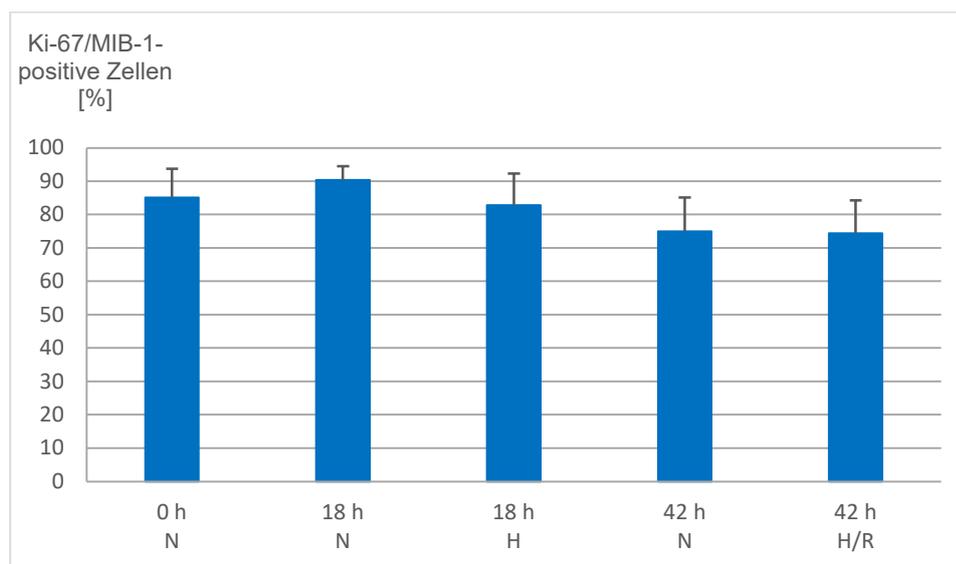


Abbildung 14: Prozentualer Ki-67/MIB-1-positiver ADSC in Mono-Kultur zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; Mittelwerte mit Standardabweichung; n=5.

4.2.3 Co-Kultur

Auch in CK zeigte sich der Anteil Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC größtenteils konstant, beginnend mit 31,75% (sd 9,70) an 0 h N (Abbildung 15). Unter normoxischen Bedingungen zeigte sich ein Anteil Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC von 36,64% (sd 7,18) nach 18 h N bzw. von 24,80% (sd 5,07) nach 42 h N. Nach 18 h H lag der Anteil sich außerhalb der G0-Phase befindlicher HDMEC in CK bei 25,68% (sd 3,19). Im Vergleich zum Ausgangswert zeigte sich

lediglich eine signifikante Abnahme des Anteils Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC nach Reoxygenierung auf 15,06% (sd 6,69).

Im Vergleich mit den mono-kultivierten HDMEC war der Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven HDMEC in der Co-Kultur zu jedem Zeitpunkt des Experimentes signifikant niedriger (Abbildung 17). Insgesamt befinden sich also prozentual mehr HDMEC in der G0-Phase des Zellzyklus, wenn sie sich in CK mit ADSC befinden.

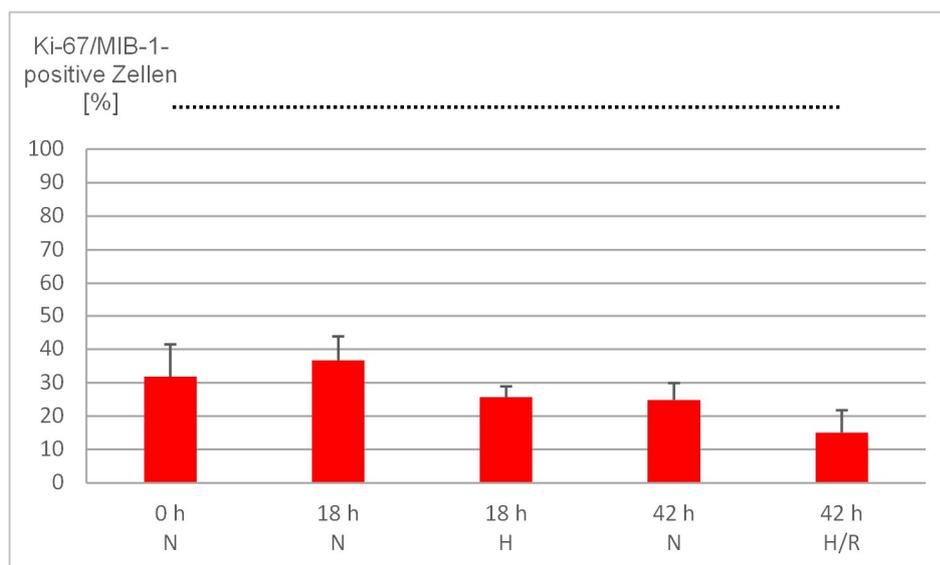


Abbildung 15: Prozentualer Anteil Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC in Co-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=5; Mittelwerte mit Standardabweichung, durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

In der CK zeigten ADSC ein ähnliches Verhalten wie in MK (Abbildung 16). Zu Beginn des Experiments waren 86,48% (sd 6,95) der mit HDMEC co-kultivierten ADSC Ki-67/MIB-1-positiv. Unter normoxischen Bedingungen blieb der Anteil mit 92,36% (sd 2,47) an 18 h N und 84,20% (sd 5,20) an 42 h N unverändert. Auch unter dem Einfluss von Hypoxie sowie nach Reoxygenierung zeigten sich keinerlei signifikante Änderungen bezüglich des Anteils Ki-67/MIB-1-positiver ADSC in CK. An 18 h H lag deren Anteil bei 86,14% (sd 4,53) und an 42 h H/R bei 84,57% (sd 4,85). Analog zur MK sind ADSC auch in CK in der Lage, in diesem Setup unter hypoxischen Bedingungen und nach anschließender Reoxygenierung zu proliferieren, es bestehen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 17). Dies wird ebenfalls im Vergleich mit den Ergebnissen der Zelldichte deutlich, die auf eine gewisse Hypoxietoleranz der ADSC hinweisen.

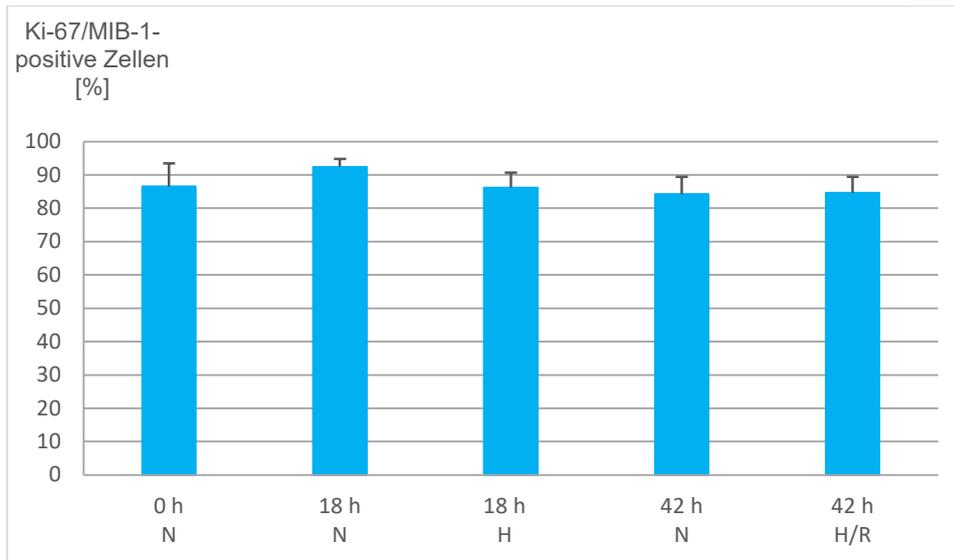


Abbildung 16: Prozentualer Anteil MIB-1/Ki-67-positiver ADSC in Co-Kultur zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=5.

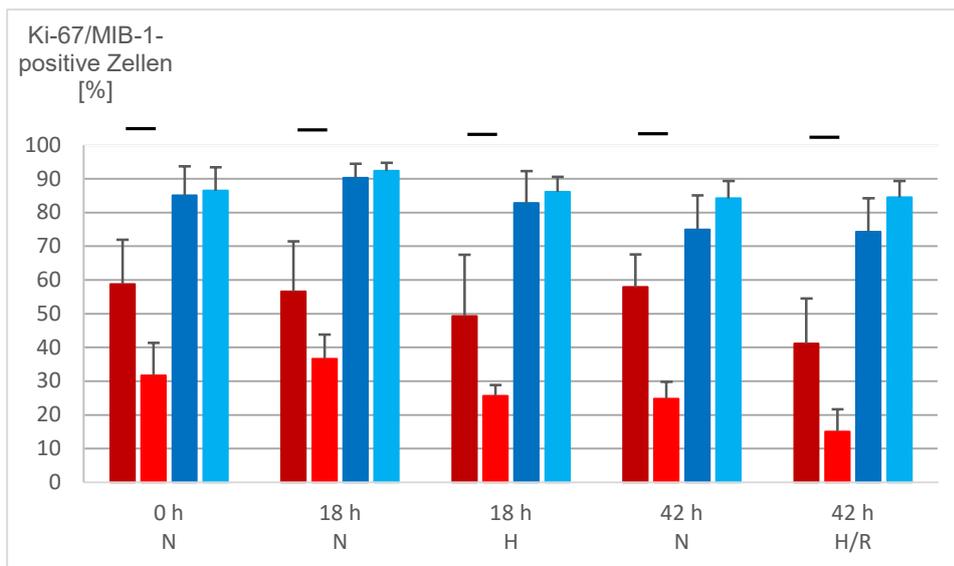


Abbildung 17: Prozentualer Anteil Ki-67/MIB-1-positiver HDMEC in MK, CK, ADSC in MK, CK zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=5; Mittelwerte mit Standardabweichung, durchgezogene Linien: signifikante Veränderung zwischen gleichen Zellen innerhalb MK und CK; $p < 0,05$.

4.3 Apoptose

Zur Bestimmung des Anteils der apoptotischen Zellen an der Gesamtpopulation des jeweiligen Zelltyps wurde der Anteil der Zellen mit Mikronuklei (Ye et al., 2019) oder fragmentiertem

Zellkern als typische Apoptosezeichen (Henry et al., 2013) im Verhältnis zu allen Zellkernen bestimmt, die Angabe erfolgte in Prozent.

4.3.1 Mono-Kultur: HDMEC

In HDMEC-MK zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Anteils apoptotischer Zellen, es konnten nur vereinzelt apoptotische Zellen festgestellt werden (Abbildung 18). Der Anteil lag konstant unter 0,1%.

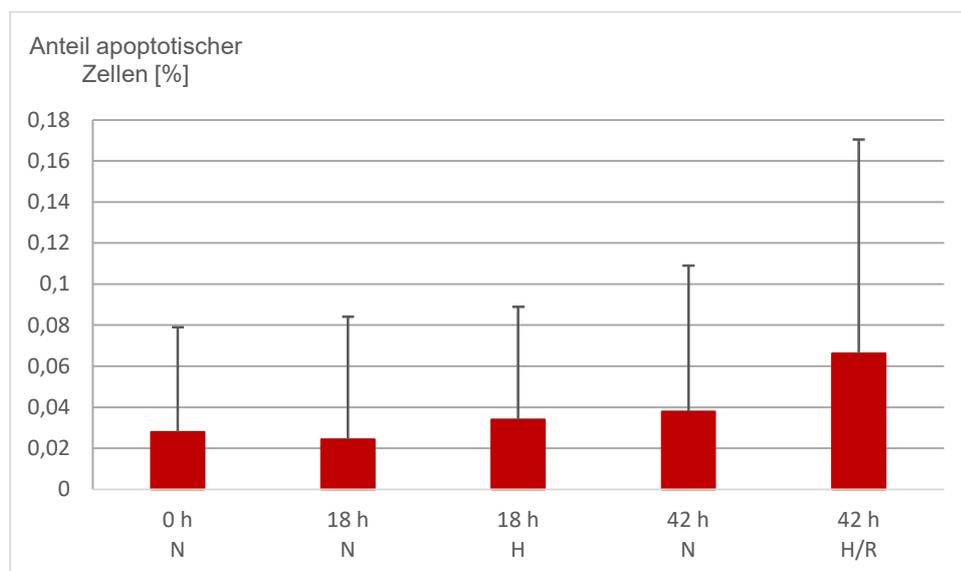


Abbildung 18: Anteil apoptotischer HDMEC in Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6.

4.3.2 Mono-Kultur: ADSC

Im Gegensatz zu HDMEC in MK und CK zeigten ADSC sowohl in MK als auch in CK signifikante Unterschiede hinsichtlich des Anteils apoptotischer Zellen (Abbildungen 18-21). In MK lag der Anteil apoptotischer ADSC unter normoxischen Bedingungen unter 0,1%. Nach Hypoxie bzw. Hypoxie gefolgt von Reoxygenierung kam es jedoch zu einem signifikanten Anstieg des Anteils apoptotischer ADSC im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle auf 0,66% (sd 0,39) bzw. 0,62% (sd 0,42). Die Reoxygenierung hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil apoptotischer ADSC nach Hypoxie.

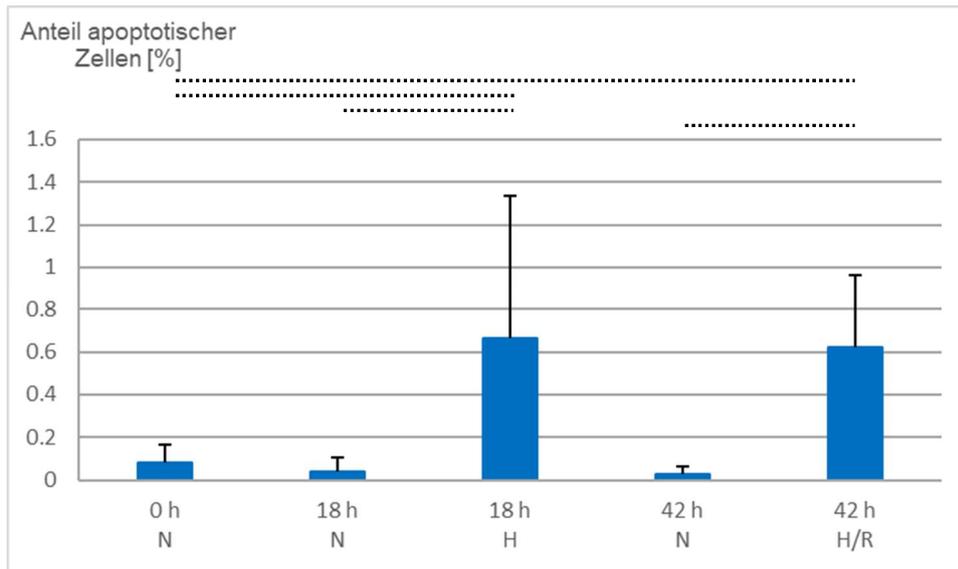


Abbildung 19: Anteil apoptotischer ADSC in Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

4.3.3 Co-Kultur

In CK lag der Anteil apoptotischer HDMEC, außer an 42 h H/R, unter 0,1% (Abbildung 20). An 42 h H/R lag der Anteil apoptotischer HDMEC bei 0,15% (sd 0,28). In einigen Versuchsgruppen wurden keinerlei apoptotische HDMEC festgestellt, auch hier lagen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Anteils der apoptotischen HDMEC vor.

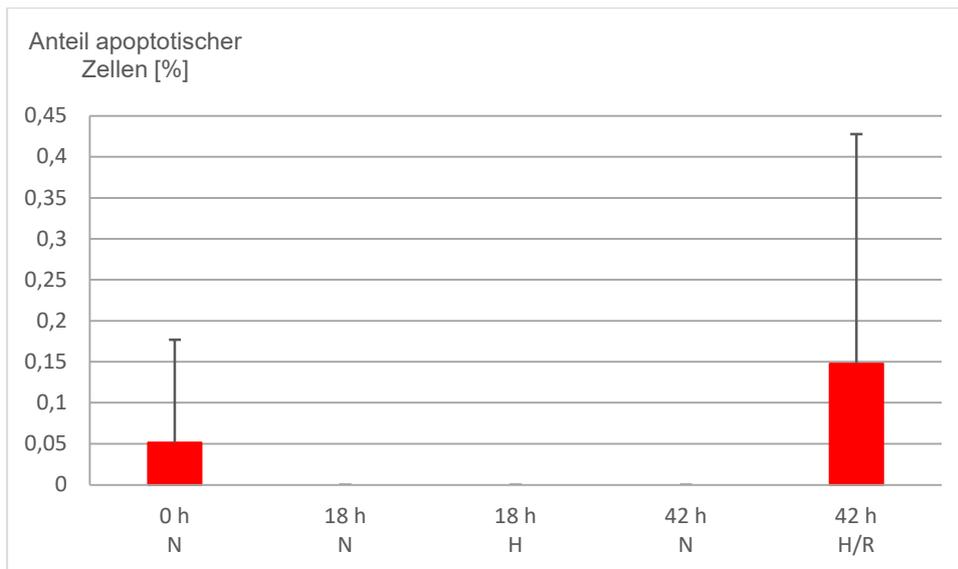


Abbildung 20: Anteil apoptotischer HDMEC in Co-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6.

In CK zeigte sich, analog zur MK, der Anteil apoptotischer ADSC unter normoxischen Bedingungen bei unter 0,1% (Abbildungen 19 und 21). Auch hier kam es unter dem Einfluss von Hypoxie zu einem signifikanten Anstieg des Anteils apoptotischer ADSC auf 0,85% (sd 0,67), welcher nach Reoxygenierung konstant mit 0,67% (sd 0,42) konstant blieb.

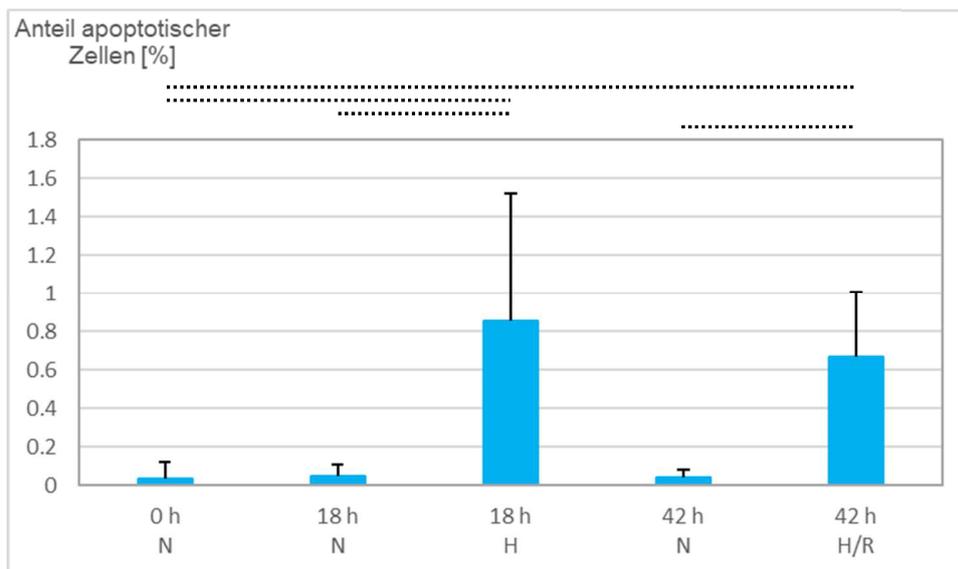


Abbildung 21: Anteil apoptotischer ADSC in Co-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

4.4 Migration

Die Migration wurde anhand des Verschlusses der In-vitro-Wunde bestimmt. Die gemessenen Werte entsprechen der verbleibenden Spaltbreite nach der jeweiligen Kultivierungszeit und in Abhängigkeit der herrschenden Sauerstoffbedingungen.

4.4.1 Mono-Kultur: HDMEC

Zu Beginn des Experiments, nach dem „Scratching“, betrug die Spaltbreite bei den HDMEC-MK 857,43 μm (sd 131,01) (Abbildung 22). Nach 18 h N zeigte sich noch keine signifikante Verkleinerung der mittleren Spaltbreite, diese betrug zu diesem Zeitpunkt 710,25 μm (sd 212,00). Erst nach 42 h durchgehender Normoxie zeigte sich eine signifikante Migration der HDMEC mit einer durchschnittlichen Größe der In-vitro-Wunde von 472,04 μm (sd 284,06). Unter hypoxischen Bedingungen sowie nach anschließender Reoxygenierung zeigte sich keine Migration der HDMEC und daher keine signifikante Verkleinerung der In-vitro-Wunde. Diese war nach 18 h H 840,38 μm (sd 135,68) breit. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich bereits ein kleiner, nicht signifikanter Unterschied zur zwischen 18 h N und 18 h H mit tendenziell stärkerer Migration unter Normoxie. Nach 42 h H/R betrug die Breite der In-vitro-Wunde noch 798,88 μm (sd 182,24), somit zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich mit der normoxischen Kontrollgruppe. Insgesamt zeigen diese Resultate, dass HDMEC unter normoxischen Bedingungen erst verzögert mit der Migration beginnen. Unter hypoxischen Bedingungen sowie nach Reoxygenierung zeigten HDMEC im Vergleich zur durchgehenden Normoxie eine schlechtere Fähigkeit zur Migration.

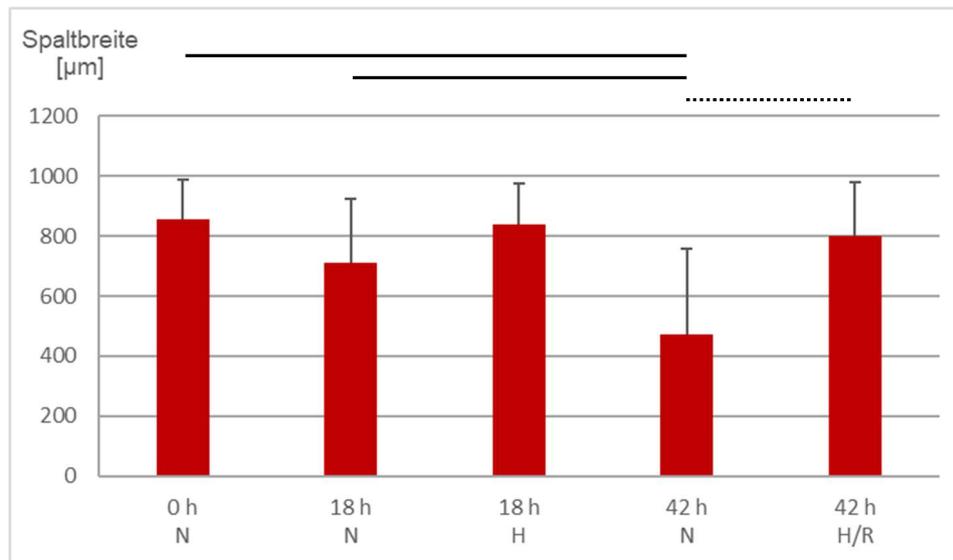


Abbildung 22: Verschluss der In-vitro-Wunde in HDMEC-Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

4.4.2 Mono-Kultur: ADSC

ADSC in MK zeigten zu Beginn des Experiments eine durchschnittliche Spaltbreite von 893,65 µm (sd 81,93) (Abbildung 23). Über die Zeit konnten die ADSC signifikant in den Wundspalt migrieren. An 18 h N betrug die Breite der In-vitro-Wunde noch 385,10 µm (sd 157,93) und an 42 h N noch 122,75 µm (sd 50,30). Nach Hypoxie zeigten ADSC noch keine signifikante Migration im Vergleich zum Ausgangswert, die Spaltbreite betrug nach 18 h H 712,98 µm (sd 245,62). Allerdings zeigte sich im Vergleich zu 18 h H und im Vergleich zum initialen Wert nach 42 h H/R eine signifikante Verkleinerung der In-vitro-Wunde auf 345,22 µm (sd 159,36). Nach 18 h bzw. 42 h konnte sich bei den ADSC eine signifikante Verkleinerung der Spaltbreite nach durchgehender Normoxie im Vergleich zu Hypoxie bzw. Reoxygenierung einstellen.

ADSC zeigten also eine sehr gute Migrationstendenz: Zwar zeigte sich nach initialer Hypoxie keine signifikante Verkleinerung der In-vitro-Wunde, jedoch konnte nach Reoxygenierung eine signifikante Migration von ADSC erreicht werden.

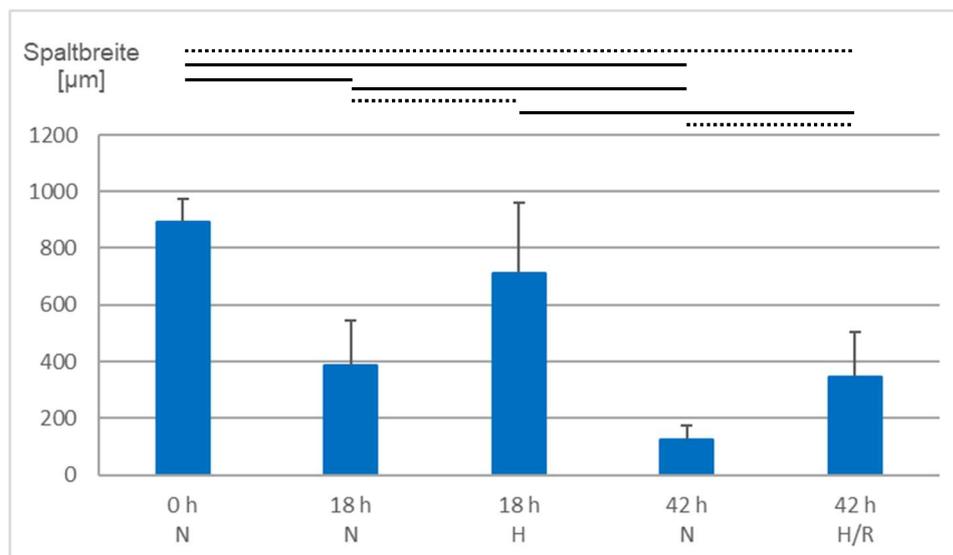


Abbildung 23: Verschluss der In-vitro-Wunde in ADSC-Mono-Kultur zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

4.4.3 Co-Kultur

An 0 h N zeigte die CK eine durchschnittliche Spaltbreite von 899,62 µm (sd 94,64) (Abbildung 24). Ähnlich der ADSC in MK zeigte auch die CK eine signifikante Verkleinerung der In-vitro-Wunde unter normoxischen Sauerstoffbedingungen mit einer Spaltbreite von 583,69 µm (sd 161,94) an 18 h N bzw. 289,90 µm (sd 76,86) an 42 h N. Auch war in der CK wie in der ADSC-MK nach 18 h N im Vergleich zu 18 h H bzw. nach 42 h N zu 42 h H/R der Wundspalt bei der jeweiligen normoxischen Kontrollgruppe signifikant kleiner.

Jedoch zeigte sich in der CK, im Gegensatz zu beiden MK, nach 18 h H im Vergleich zum Ausgangswert eine signifikante Verkleinerung des Wundspalts auf 742,57 µm (sd 105,96). Nach Reoxygenierung kam es zu einer erneuten signifikanten Verringerung der Breite der In-vitro-Wunde auf 451,72 µm (sd 59,33). Einzig in der CK zeigte sich also auch unter dem Einfluss von Hypoxie eine signifikante Migration der Zellen im Sinne einer Verkleinerung der In-vitro-Wunde, welche durch anschließende Reoxygenierung weiter gefördert wurde.

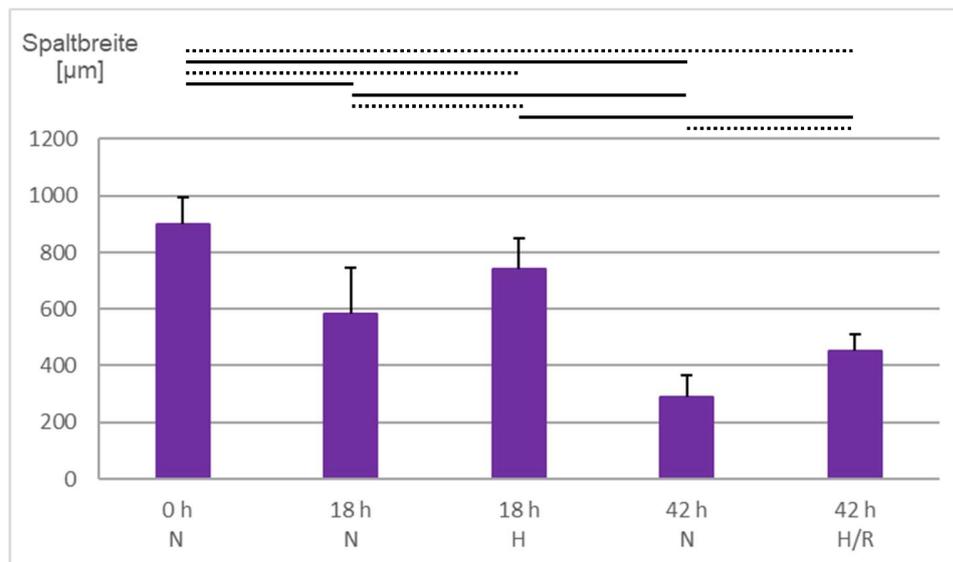


Abbildung 24: Verschluss der In-vitro-Wunde in Co-Kultur zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen, $p < 0,05$.

4.5 Differenzierung der ADSC zu einer myofibroblastoiden Zelle

Zur Quantifizierung der Differenzierung der ADSC zu einer myofibroblastoiden Zelle wurde nach Immunfärbung mikroskopisch der Anteil der α -SMA-positiven ADSC im Verhältnis zu den gesamten ADSC bestimmt.

4.5.1 Mono-Kultur: ADSC

In der MK zeigte sich zu Beginn mit 15,63% (sd 9,20) der höchste Anteil an α -SMA-positiven ADSC (Abbildung 25). Der Anteil nahm über die Zeit kontinuierlich signifikant ab, so zeigte sich nach 18 h N noch ein Anteil von 7,76% (sd 4,94) bzw. von 3,04% (sd 2,63) nach 42 h N. Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich ebenfalls eine Reduktion des Anteils α -SMA-positiver ADSC auf 11,15% (sd 6,91) nach 18 h H bzw. 6,87% (sd 4,08) nach 42 h H/R, jedoch war der Anteil der myofibroblastoid differenzierten ADSC jeweils im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dies zeigt eine verstärkte Differenzierung der ADSC zu einem myofibroblastoiden Zelltyp unter Hypoxie bzw. nach Reoxygenierung.

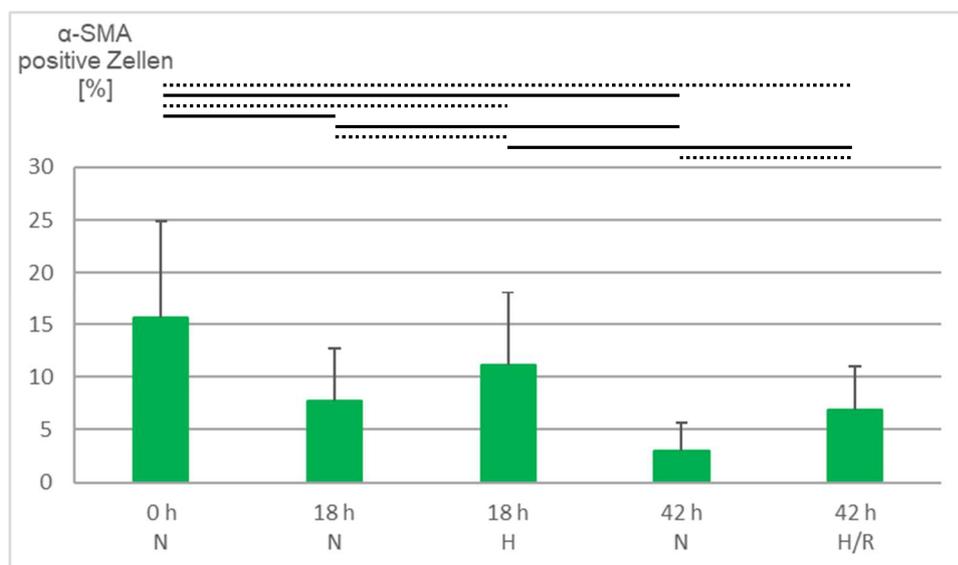


Abbildung 25: Anteil myofibroblastoid differenzierter ADSC in Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

4.5.2 Co-Kultur

Auch in CK war der Anteil der myofibroblastoid differenzierten ADSC zu Versuchsbeginn am höchsten, er lag bei 16,26% (sd 2,49) und nahm auch hier unter normoxischen Bedingungen ab (18 h N: 8,40 % (sd 1,62), 42 h N: 4,92 % (sd 2,39)) (Abbildung 26). Im Gegensatz zur MK kam es in der CK durch den Einfluss von Hypoxie nicht zu einer Beeinflussung der Differenzierung. Im Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe zeigte sich nach 18 h H mit 9,55 % (sd 3,67) und an 42 h H/R mit 4,71 % (sd 1,40) kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Anteils α -SMA-positiver ADSC. Die Präsenz von HDMEC hemmt also die in MK unter Hypoxie und Reoxygenierung beobachtete verstärkte myofibroblastoide Differenzierung der ADSC.

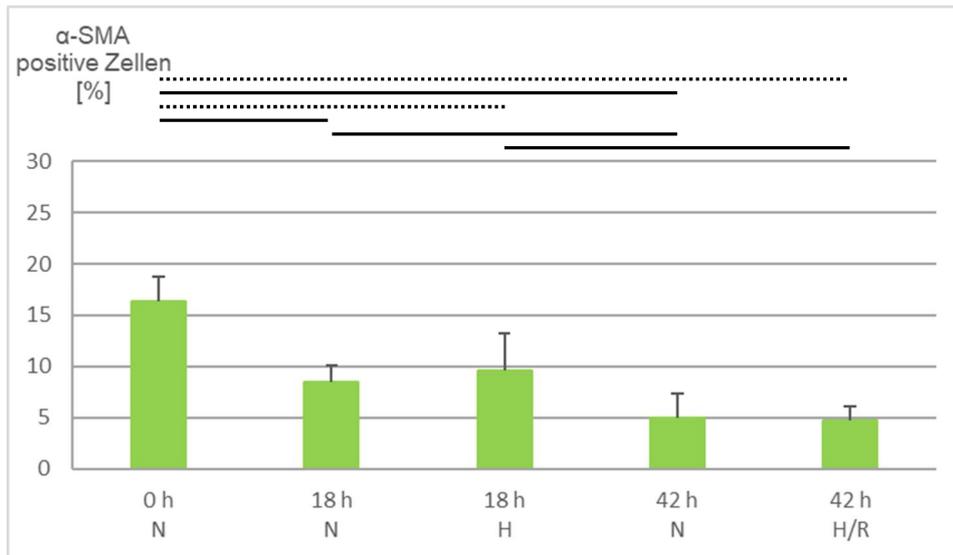


Abbildung 26: Anteil myofibroblastoid differenzierter ADSC in Co-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen, Mittelwerte mit Standardabweichung; $p < 0,05$.

4.6 Zytokin-Bestimmung

Mittels ELISA wurde die Konzentration des jeweiligen Zytokins im ZKÜ bestimmt. Es sind nicht in jeder Gruppe n=6 Werte vorhanden, da die Konzentrationen in einigen Fällen unter der Nachweisgrenze lagen.

4.6.1 Interleukin-6

In MK zeigten HDMEC unter normoxischen Bedingungen eine konstante Sekretion von IL-6. Diese lag an 0 h N bei 0,93 ng/10⁶ Zellen (sd 0,41) (Abbildung 27). An 18 h N und 42 h N zeigte sich keine wesentliche Änderung der Ausschüttung, sie lag bei 0,98 ng/10⁶ Zellen (sd 0,33) bzw. bei 1,44 ng/10⁶ Zellen (sd 0,89). Auch unter Hypoxie kam es nicht zu einer signifikanten Änderung der IL-6-Freisetzung, diese lag nach 18 h H bei 0,60 ng/10⁶ Zellen (sd 0,15). Lediglich nach Reoxygenierung kam es zu einem signifikanten Anstieg der Ausschüttung von IL-6 auf 1,82 ng/10⁶ Zellen (sd 0,44).

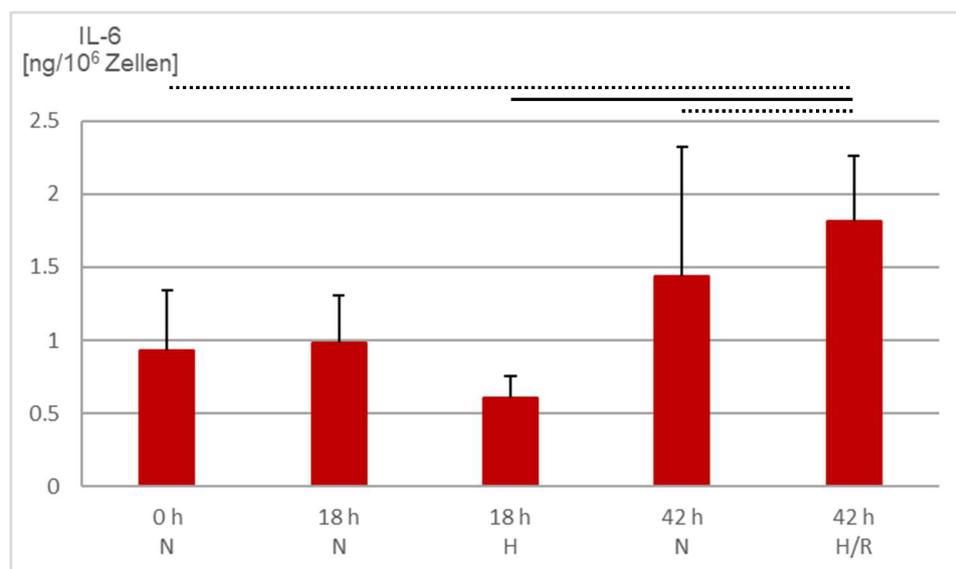


Abbildung 27: IL-6-Sekretion in HDMEC-Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; p < 0,05.

Mono-Kultivierte ADSC zeigten zu Beginn die höchste IL-6-Konzentration im ZKÜ, sie lag bei 6,88 ng/10⁶ Zellen (sd 1,44) (Abbildung 28). Unter Normoxie kam es zu einem signifikanten Abfall der Freisetzung: Die IL-6-Konzentration lag nach 18 h N bei 1,06 ng/10⁶ Zellen (sd 0,32) und sank im Vergleich hierzu nach 42 h N noch einmal signifikant auf 0,65 ng/10⁶ Zellen (sd

0,19). Im Vergleich zum initialen Wert kam es auch unter Hypoxie zu einem signifikanten Abfall der IL-6-Freisetzung der mono-kultivierten ADSC, im Vergleich zur normoxischen Kontrolle zeigte sich jedoch eine deutlich erhöhte Sekretion. Sie lag nach 18 h H bei 2,04 ng/10⁶ Zellen (sd 0,71). Die nachfolgende Reoxygenierung beeinflusste die IL-6 Freisetzung nicht weiter, der Wert zeigte sich bei 42 h H/R konstant bei 1,96 ng/10⁶ Zellen (sd 0,35). Dennoch zeigte sich nach Reoxygenierung ein signifikant erhöhter IL-6-Spiegel im ZKÜ im Vergleich zur entsprechenden normoxischen Kontrollgruppe.

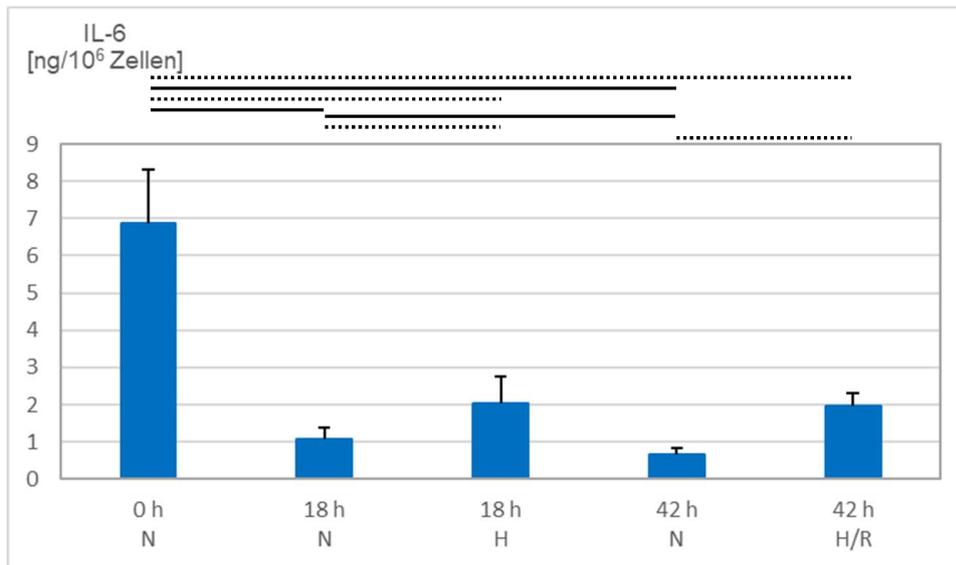


Abbildung 28: IL-6-Sekretion in ADSC-Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; p < 0,05.

Die IL-6-Freisetzung in CK ähnelte derer in ADSC-MK (Abbildung 29). So zeigte sich zu Beginn der höchste Wert mit einer Sekretion von $4,83 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 1,89). Unter Normoxie kam es, wie auch in ADSC-MK, zu einem signifikanten Abfall der IL-6-Freisetzung über die Zeit, sie lag bei 18 h N bei $1,42 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 0,29) und bei 42 h N bei $1,22 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 0,29). Im Vergleich zu den jeweiligen normoxischen Kontrollen zeigte sich nach Hypoxie bzw. Hypoxie und anschließender Reoxygenierung eine signifikant höhere IL-6-Sekretion. So lag diese nach 18 h H bei $3,73 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 0,71) und blieb nach 42 h H/R konstant bei $3,64 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 0,58). Hier zeigte sich also, dass in CK insbesondere unter hypoxischen Bedingungen und nach Reoxygenierung vermehrt IL-6 ausgeschüttet wurde.

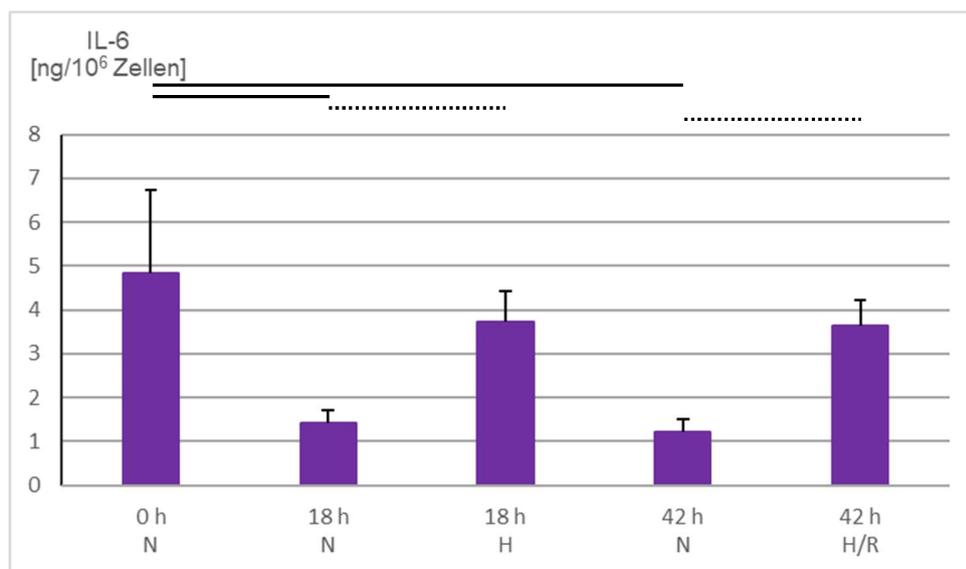


Abbildung 29: IL-6-Sekretion in Co-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

4.6.2 Interleukin-8

HDMEC zeigten in MK unter normoxischen Bedingungen eine konstante IL-8-Freisetzung im ZKÜ, welche generell höher war als in ADSC-MK und CK (Abbildungen 30-32). Diese lag zu Versuchsbeginn bei 23,77 ng/10⁶ Zellen (sd 9,23) und blieb sowohl an 18 h N mit 22,33 ng/10⁶ Zellen (sd 11,84) als auch an 42 h N mit 16,85 ng/10⁶ Zellen (sd 11,49) konstant. Auch unter Hypoxie zeigte sich keine signifikante Änderung, die IL-8-Sekretion lag nach 18 h H bei 19,47 ng/10⁶ Zellen (sd 7,16). Nach Reoxygenierung kam es jedoch zu einem signifikanten Anstieg von IL-8 mit 47,25 ng/10⁶ Zellen (sd 22,32).

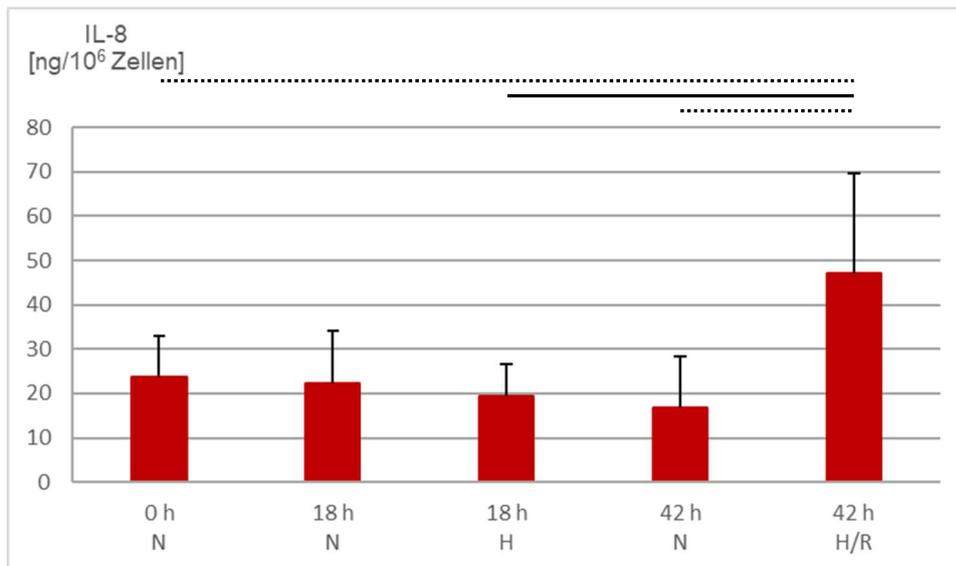


Abbildung 30: IL-8-Sekretion in HDMEC-Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; p < 0,05.

Mono-kultivierte ADSC zeigten ein ähnliches Verhalten, jedoch mit deutlich geringeren IL-8-Konzentrationen als HDMEC (Abbildung 31). Zu Beginn lag die IL-8-Konzentration bei 1,74 ng/10⁶ Zellen (sd 0,56). Diese blieb unter normoxischen Bedingungen an 18 h N mit 1,94 ng/10⁶ Zellen (sd 0,54) und an 42 h N mit 2,51 ng/10⁶ Zellen (sd 1,30) konstant. Durch den Einfluss von Hypoxie kam es zunächst zu keiner signifikanten Veränderung der IL-8-Sekretion, diese lag bei 2,53 ng/10⁶ Zellen (sd 1,03). Nach Reoxygenierung zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung der Freisetzung von IL-8 mit 4,20 ng/10⁶ Zellen (sd 1,15).

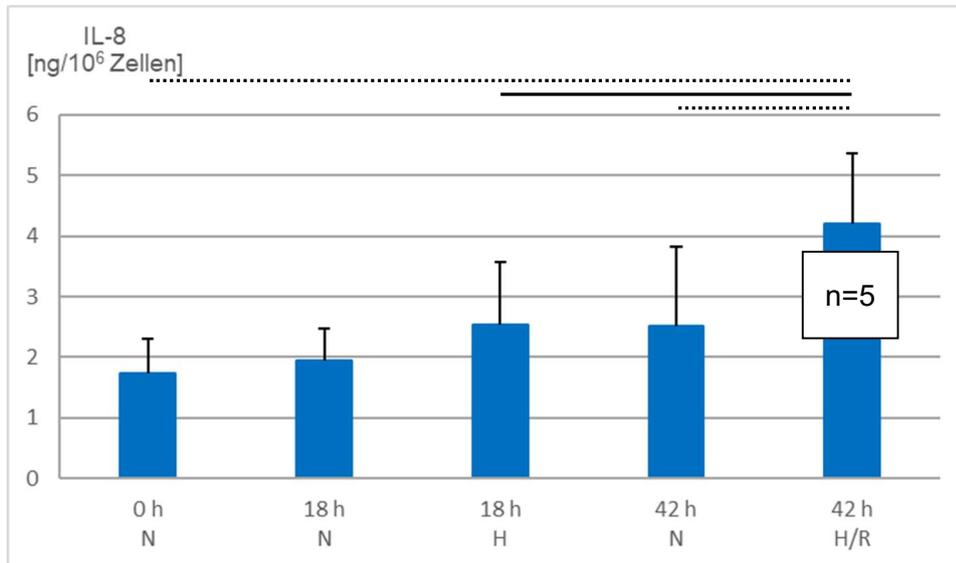


Abbildung 31: IL-8-Sekretion in ADSC-Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6, Abweichungen siehe Grafik, Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; p < 0,05.

In CK lag die Sekretion von IL-8 insgesamt leicht über dem Niveau der ADSC-MK, jedoch deutlich unter der der HDMEC-MK (Abbildung 32). Nach 0 h N lag die IL-8-Konzentration im ZKÜ bei 3,36 ng/10⁶ Zellen (sd 1,73), welche sich nach 18 h N und 42 h N weitgehend konstant zeigte (18 h N: 2,04 ng/10⁶ Zellen (sd 0,58), 42 h N: 2,19 ng/10⁶ (sd 0,40)). Auch hier zeigte sich nach initialer Hypoxie keine signifikante Veränderung, nach 18 h H lag die IL-8-Konzentration bei 3,04 ng/10⁶ Zellen (sd 0,53), nach Reoxygenierung zeigte sich auch in CK ein signifikanter Anstieg auf 4,92 ng/10⁶ Zellen (sd 1,06).

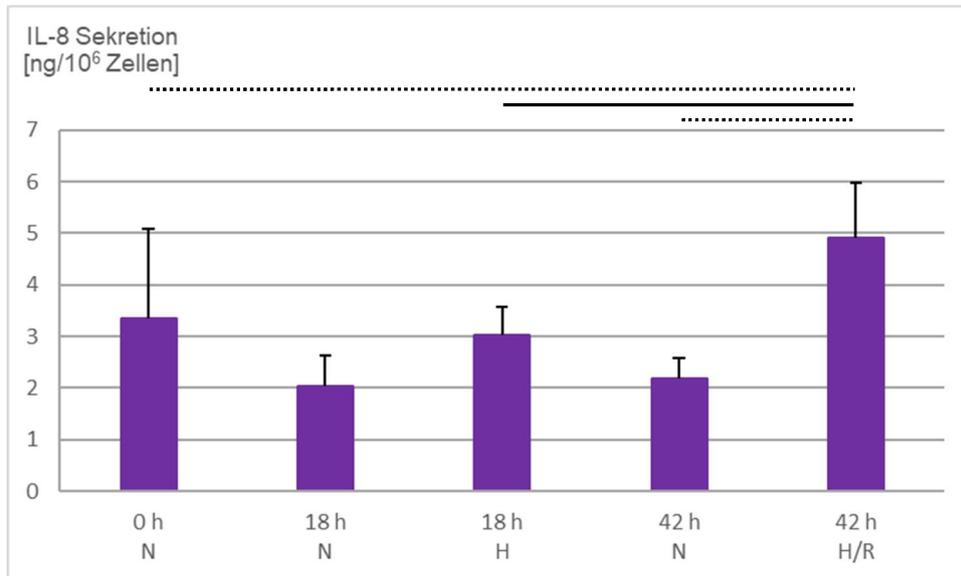


Abbildung 32: IL-8-Sekretion in Co-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; p < 0,05.

4.6.3 Monocyte Chemoattractant Protein-1

Mono-kultivierte HDMEC zeigten, verglichen mit ADSC-MK und CK, die höchste MCP-1-Sekretion (Abbildungen 33-35). Diese lag bei 0 h N bei 34,78 ng/10⁶ Zellen (sd 11,37). Unter normoxischen Bedingungen blieb sie an 18 h N zunächst konstant mit 25,94 ng/10⁶ Zellen (sd 5,60), stieg jedoch an 42 h N signifikant an auf 89,84 ng/10⁶ Zellen (sd 36,82). Nach initialer Hypoxie zeigte sich sowohl im Vergleich zum Ausgangswert als auch im Vergleich zur normoxischen Kontrolle ein signifikanter Abfall der MCP-1-Freisetzung. Nach 18 h H lag diese bei 13,32 ng/10⁶ Zellen (sd 4,80). Nach Reoxygenierung kam es jedoch zu einem signifikanten Anstieg der MCP-1-Freisetzung, nach 42 h H/R lag sie bei 108,24 ng/10⁶ Zellen (sd 16,82). Hier konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur normoxischen Kontrolle festgestellt werden.

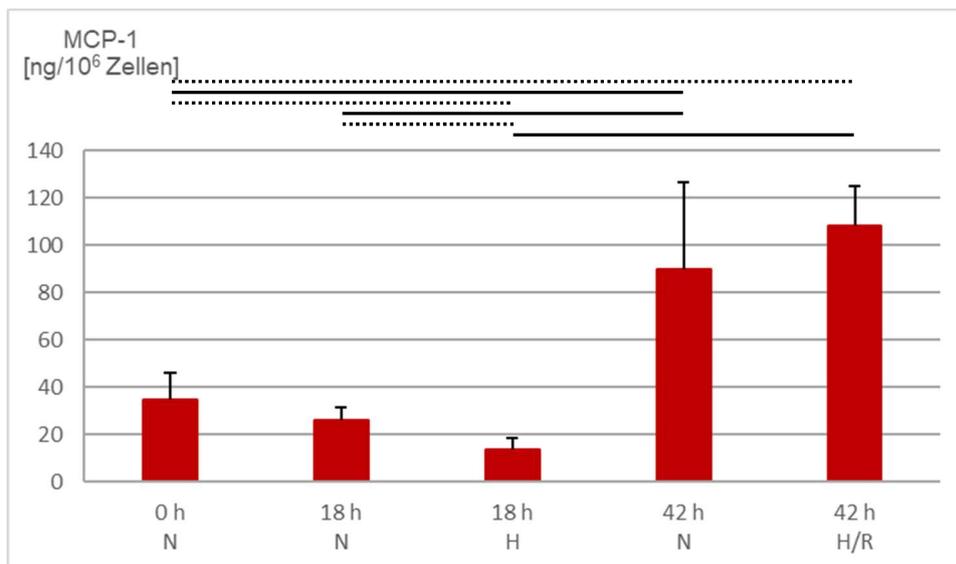


Abbildung 33: MCP-1-Sekretion in HDMEC-Mono-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen, $p < 0,05$.

In der ADSC-MK unterlag die MCP-1 Sekretion keinen signifikanten Schwankungen, es zeigten sich unter allen Bedingungen weitgehend konstante Werte, welche im Vergleich zur HDMEC-MK geringer waren (Abbildungen 33 und 34). Zu Beginn zeigte sich ein Wert von 0,87 ng/10⁶ Zellen (sd 0,21), nach 18 h N lag er bei 0,84 ng/10⁶ Zellen (sd 0,38) und nach 42 h N bei 1,46 ng/10⁶ Zellen (sd 0,31). Unter hypoxischen Bedingungen lag die MCP-1 Sekretion in der ADSC-MK bei 0,61 ng/10⁶ Zellen (sd 0,26) und nach Reoxygenierung bei 2,16 ng/10⁶ Zellen (sd 0,72).

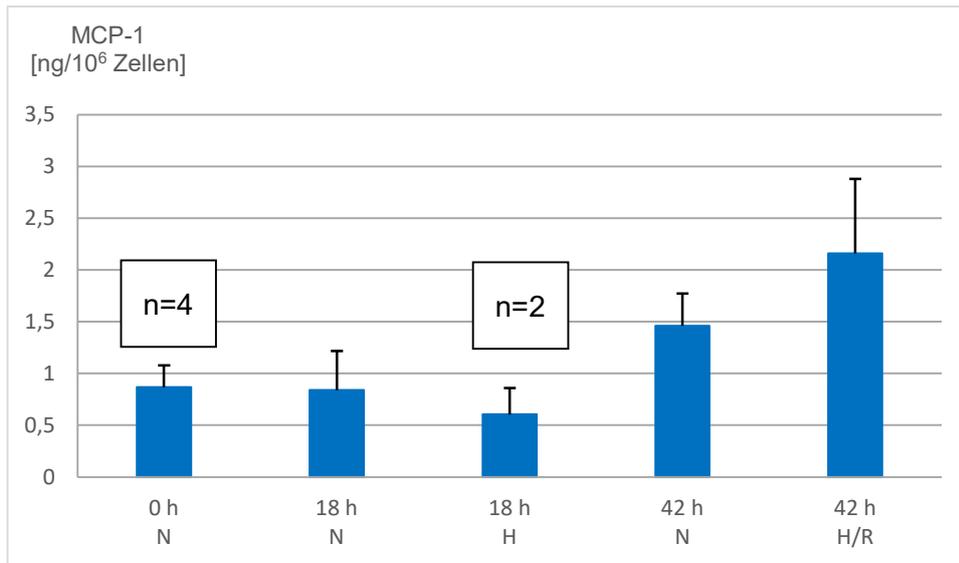


Abbildung 34: MCP-1-Sekretion in ADSC-Mono-Kultur zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6, Abweichungen siehe Grafik; Mittelwerte mit Standardabweichung.

In CK zeigte sich, wie in HDMEC-MK, besonders ein später Anstieg der MCP-1-Konzentration im ZKÜ (Abbildungen 33 und 35). In CK lag die MCP-1 Sekretion nach 0 h N bei $7,50 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 1,83) mit einer nachfolgenden signifikanten Reduktion nach 18 h N auf $4,61 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 1,59). Im Verlauf zeigte sich aber erneut nach 42 h N ein signifikanter Anstieg der MCP-1 Sekretion, auch im Vergleich zum Ausgangswert, auf $16,12 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 7,42). Unter Hypoxie zeigte sich ein signifikanter Abfall der MCP-1-Freisetzung auf $3,36 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 0,91), verglichen mit der normoxischen Kontrolle zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Sinne einer Hemmung der MCP-1-Ausschüttung durch Hypoxie. Nach Reoxygenierung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der MCP-1 Freisetzung auf $16,39 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 7,89) an 42 h H/R im Vergleich zu 18 h H.

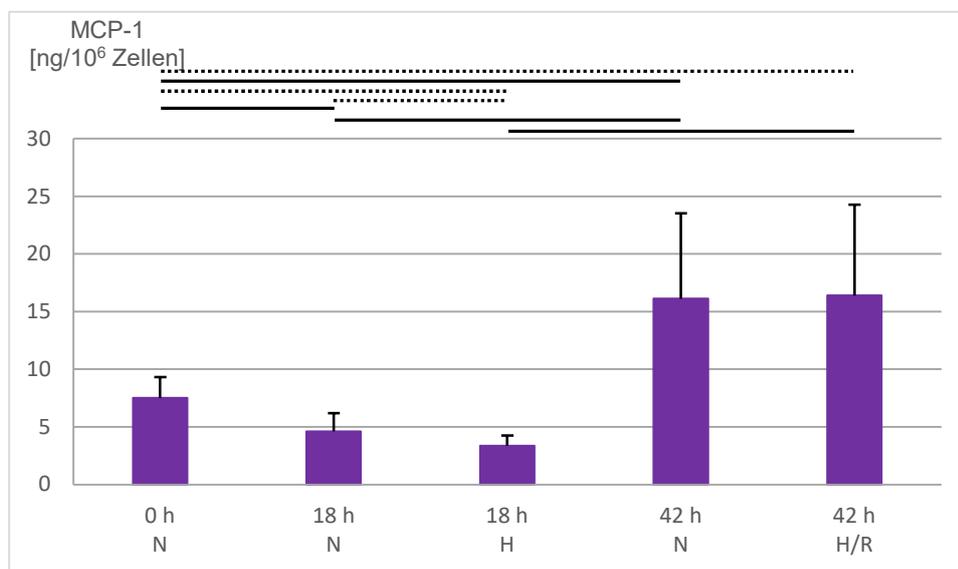


Abbildung 35: MCP-1-Sekretion in Co-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen; $p < 0,05$.

4.6.4 Vascular Endothelial Growth Factor

In allen HDMEC-MK lag die VEGF-Ausschüttung unterhalb der Nachweisgrenze.

In der ADSC-MK zeigte sich zu Beginn eine VEGF-Sekretion von $3,89 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 1,26) (Abbildung 36). Nach 18 h N wurde eine signifikante Abnahme der Freisetzung von VEGF ($1,25 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 0,64)) gemessen, welche nach 42 h N mit $1,64 \text{ ng}/10^6$ Zellen (sd 0,66) konstant blieb. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach 18 h H ein signifikanter Anstieg der

Sekretion von VEGF, welche mit $5,64 \text{ ng}/10^6 \text{ Zellen}$ (sd $0,82$) auch im Vergleich zur normoxischen Kontrolle signifikant erhöht war. Nach Reoxygenierung stieg die Sekretion erneut signifikant auf $7,41 \text{ ng VEGF}/10^6 \text{ Zellen}$ (sd $1,87$) an.

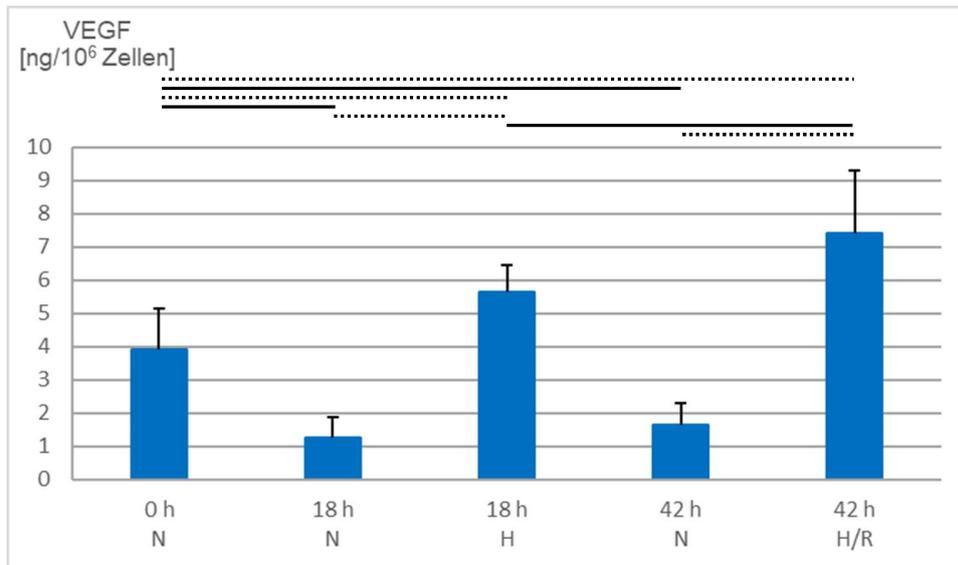


Abbildung 36: VEGF-Sekretion in ADSC-Mono-Kultur zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung. Durchgezogene Linien: signifikante Veränderung im Zeitverlauf, unterbrochene Linien: signifikante Veränderung durch Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen, $p < 0,05$.

In CK lag die VEGF-Konzentration im ZKÜ unter normoxischer Kultivierung, mit Ausnahme von einer Probe an 42 h N, unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 37). Nach Hypoxie konnte eine Sekretion von 1,01 ng/10⁶ Zellen (sd 0,60) festgestellt werden, welche nach Reoxygenierung konstant bei 0,85 ng/10⁶ Zellen (sd 0,40) blieb. Der Vergleich der Werte aus der ADSC-MK mit denen aus der CK, die deutlich geringer sind, könnte darauf hinweisen, dass in CK das stark von ADSC freigesetzte VEGF an die entsprechenden Rezeptoren der HDMEC gebunden wird.

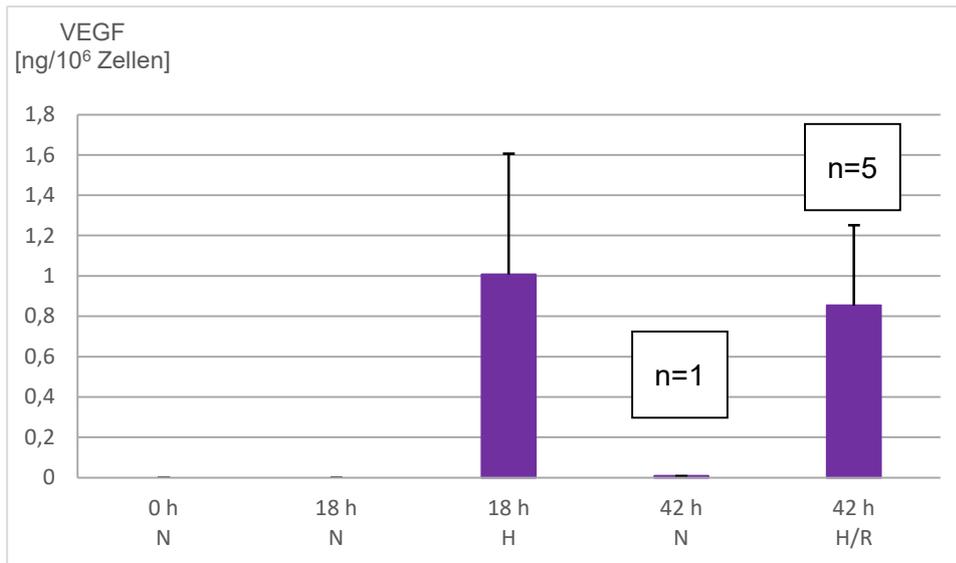


Abbildung 37: VEGF-Sekretion in Co-Kultur ■ zum Zeitpunkt 0 h N, 18 h N, 18 h H, 42 h N und 42 h H/R; n=6; Abweichungen siehe Grafik; Mittelwerte mit Standardabweichung.

5 Diskussion

5.1 Methodik

Das verwendete Modell beruht auf dem „Co-culture scratch wound migration assay“, welcher im Abschnitt 3.2 dieser Arbeit ausgeführt wird (Oberringer et al., 2007). Neben der hier beschriebenen Charakterisierung der Interaktion von HDMEC und ADSC in einem 2D-in-vitro-Wundheilungsassay anhand der ausgewerteten Parameter Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Migration und Zytokinausschüttung unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen wurde o.g. Modell auch zur Charakterisierung anderer Zellen und deren Interaktionen verwendet (Schwarz et al., 2013; Schneider et al., 2015). Neben diesem Assay existieren weitere Techniken der Zellkultivierung, die zur Untersuchung der Wundheilung und insbesondere der Angiogenese geeignet sind. Es besteht die Möglichkeit der direkten Co-Kultivierung, wie sie hier verwendet wurde oder etwa der Durchführung eines Transwell-Assays. Hier sind die Zellen durch eine Membran getrennt, direkte Zell-Zell-Kontakte sind nicht möglich. Während eine direkte Co-Kultivierung die wechselseitige Beeinflussung der Zellen sowohl durch Zell-Zell-Kontakte als auch durch parakrine Faktoren bedingt, ist ein Transwell-Assay nur auf Letztgenanntes abgestimmt (Justus et al., 2014). Transwell-Assays sind, wie der CCSWMA, zur Beurteilung der Migration geeignet (Justus et al., 2014). Die Überprüfung ausschließlich parakriner Einflüsse, unter Ausschluss direkter Zellkontakte, könnte in den verwendeten Assay integriert werden, indem konditioniertes Medium eines Zelltyps zu der jeweils anderen MK gegeben wird.

Eine weitere Möglichkeit der Zellkultivierung, vor dem Hintergrund der Weichgewebeheilung und der Angiogenese im Besonderen, ist die Anlage von 3D-Kulturen. Zur Anlage von 3D-Kulturen gibt es mehrere Möglichkeiten, darunter die Bildung von Sphäroiden (Ong et al., 2018) oder die Integration der Zellen in TE-Scaffolds (Hu et al., 2014). In 3D-Kulturen kann unter Umständen die In-vivo-Situation besser simuliert werden (Duval et al., 2017). 3D-Kulturen erlauben intensivere Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte, außerdem entspricht die Morphologie der Zellen mehr der In-vivo-Situation (Fontoura et al., 2020). Allerdings scheinen nicht alle Zelltypen gleichermaßen für eine 3D-Kultur geeignet zu sein, da beispielsweise HDMEC, die in vivo physiologischerweise Monolayer bilden, im Sphäroid hohe Apoptoseraten zeigen können (Oberringer et al., 2018).

Neben Tierversuchen existiert mit dem CAM (Chorionallantois-Membran)-Assay ein In-vivo-Modell, in welches auch Zellen eingebracht werden können. Hierbei gibt es keine ethischen Einschränkungen, da die CAM, als Teil der Embryogenese von Vögeln, zu dem Zeitpunkt, zu dem sie im Rahmen diesen Assays verwendet wird, noch nicht innerviert ist (Oliinyk et al.,

2023). Der CAM-Assay kann für Versuche bzgl. Wundheilung und Angiogenese genutzt werden (Oliinyk et al., 2023).

In dieser Arbeit wurde das Modell des CCSWMA an die Eigenschaften der verwendeten Zellen adaptiert und der Umfang des ursprünglichen Modells ergänzt, um die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen aus den jeweiligen ZKÜ zu ermöglichen. Vorteile des hier verwendeten Versuchssetups sind unter anderem die Möglichkeit des Vergleichs zwischen MK und CK. Weiterhin ist die Auswertung durch das einheitliche Vorgehen durch Kultivierung auf identischen Oberflächen und Durchführung einer standardisierten Immunfärbung durch Verwendung zuvor festgelegter Antikörper zur Bestimmung der Zelltypzugehörigkeit, des Zellzyklusstadiums und der Differenzierung gut reproduzierbar. Zusätzlich wurden die Parameter Migration und Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1 und VEGF vor dem Hintergrund der Wundheilung ausgewählt. Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Form der Co-Kultivierung ist die Ermöglichung der Zellkommunikation sowohl durch Zell-Zell-Interaktionen als auch auf parakrinem Weg.

Das hier angewandte Modell könnte im Rahmen zukünftiger Forschungsarbeiten erweitert werden. Neben dem hier durchgeführten Scratch Assay, bei dem ein Teil des Zelllayers mithilfe einer Pipettenspitze entfernt wird, kann beispielsweise auch ein Kultivierungs-Einsatz zur Schaffung einer räumlichen Trennung eingebracht werden (Pijuan et al., 2019).

Die direkte Co-Kultivierung von Zellen führt zur Beeinflussung der zellulären Morphologie, beispielsweise durch Polarisierung und Ausbildung von Fortsätzen (Justus et al., 2014). Durch Anlage zusätzlicher Präparate für spezifische Immunfärbungen könnte die Analyse dieser veränderten Morphologie in den vorliegenden Assay integriert werden. Daneben ließe sich ggf. zur Analyse der Zellmorphologie nach Immunfärbung die Verwendung der automatisierten Bildanalyse (Shariff et al., 2010) oder aber die Lebendzellmikroskopie von nicht fixierten Zellen integrieren (Stephens & Allan, 2003).

Andere Ergänzungen bzgl. der Ausleseparameter finden sich im Gebiet der Microarrays (Stears et al., 2003) mit der erweiterten Analyse des Sekretoms (Sutandy et al., 2013) oder Transkriptoms (Dong & Chen, 2013). Zusätzlich zu den Zytokinen könnten auch deren Rezeptoren in die Auswertung einbezogen werden (Barrientos et al., 2014). Außerdem könnte die Genexpression mehr in den Fokus gerückt werden (Kadri, 2020).

Der Anteil apoptotischer Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch anhand des Auftretens von Mikronuklei oder Zellkernzerfall bestimmt. Daneben existieren weitere Verfahren zur Detektion des programmierten Zelltods, die gegebenenfalls auch frühere Stadien der Apoptose nachweisen können. Beispielsweise können frühere Stadien der Apoptose spektroskopisch, durch Markierung mit Annexin-V, was unter anderem auch mit der Bestimmung der Caspase-

Aktivität verbunden werden kann, nachgewiesen werden (Martinez et al., 2010). Solche Analysen könnten zukünftig auch in das verwendete Modell einbezogen werden, was allerdings zusätzliche Zellkulturen erfordert.

In den folgenden Abschnitten werden Charakteristika und mögliche Limitierungen des CCSWMA vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit festgestellten Ergebnisse beleuchtet.

Es scheint eine charakteristische Eigenschaft des CCSWMA zu sein, dass die endotheliale Proliferation in CK abhängig vom Ansatzverhältnis mit den anderen verwendeten Zellen zu sein scheint. Wurden HDMEC mit dem jeweiligen CK-Partner im Verhältnis 1:1 angesetzt, zeigte sich in CK ein hemmender Effekt auf die Proliferation der HDMEC. Diese Hemmung der Proliferation zeigte sich nicht nur in der vorliegenden Arbeit, in der HDMEC mit ADSC co-kultiviert wurden, sondern auch in anderen Versuchen mit Fibroblasten als CK-Partner (Oberinger et al., 2007). Wurden HDMEC jedoch mit ihrem CK-Partner im Verhältnis von 2:1 angesetzt, konnten sie im CCSWMA in CK mit Perizyten proliferieren (Schneider et al., 2015).

Die bei der Co-Kultivierung von Endothelzellen mit ADSC im TE-Konstrukt beobachtete Ausbildung von Gefäßformationen (Kook et al., 2018) ist in einem 2D-Modell wie dem CCSWMA nicht zu erwarten. Bei hoher Zelldichte können im Co-Kultur-Modell Clusterbildungen von Endothelzellen mit umgebenden ADSC beobachtet werden (Kuhn et al., 2022).

In dieser Arbeit waren die niedrigeren Apoptoseraten der HDMEC im Vergleich zu den ADSC auffällig. Vor Fixierung zeigten HDMEC im Vergleich zu ADSC phasenkontrastmikroskopisch einen höheren Anteil an abgeschwommenen Zellen, welcher aber nicht exakt quantifiziert wurde. Es scheint möglich, dass aufgrund schlechterer Adhäsion der Anteil apoptotischer HDMEC ggf. höher war, jedoch diese Zellen nach Fixierung wegen des Abschwimmens nicht mehr vorhanden waren.

Die Hypoxie und die sich anschließende Reoxygenierung wurden in diesem Setup genutzt, um die in einer chronischen Wunde herrschende mangelnde Sauerstoffzufuhr, gefolgt von der nach Re-Etablierung der Vaskulatur intakten Sauerstoffversorgung eines Gewebes zu simulieren. In anderen Studien werden Hypoxie und Reoxygenierung häufig genutzt, um in vitro die Auswirkungen des Ischämie-/Reperfusionssyndroms zu untersuchen. Die hierbei gewählten Zeiten variieren von Studie zu Studie (Liu et al., 2014; Zito et al., 2022). Da in der vorliegenden Arbeit, in Bezug auf die Zelldichte, wenig Unterschiede zwischen Hypoxie und Hypoxie gefolgt von Reoxygenierung vorliegen, könnten durch Verlängerung der Reoxygenierungszeit im Rahmen des hier verwendeten Modells die In-vitro-Verhältnisse weiter angepasst werden, um eine ggf. bessere Nachahmung der In-vivo-Situation zu erreichen, was dann weitere detaillierte Ergebnisse generieren könnte.

Zusammenfassend ist der CCSWMA ein gut geeignetes Modell, um die während der Weichgewebereparatur und der Angiogenese ablaufenden zellulären und parakrinen Prozesse Zelltyp-spezifisch beurteilen zu können. Der Assay kann an die ausgewählten Zellen angepasst werden und unterschiedliche Sauerstoffbedingungen können eingestellt werden. Ebenso kann der Assay, entsprechend den neuen Fragestellungen bezüglich der Auswerteparameter, erweitert werden. Der Assay eignet sich, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, besonders zur Charakterisierung der Eigenschaften der Zellen während der Inflammationsphase und Proliferationsphase mit dem Fokus auf der Angiogenese.

5.2 Ergebnisse

Um die in der vorliegenden Arbeit aus In-vitro-Versuchen erhaltenen Ergebnisse auf die In-vivo-Situation zu übertragen, sollen sie im Folgenden in ihrem Bezug auf die physiologische als auch pathophysiologische Wundheilung dargestellt werden.

Mit der im Rahmen der Gewebetraumatisierung auftretenden Gefäßverletzung kommt es zum Beginn der Hämostase (Singh et al., 2017). Durch die ausgelöste Hypoxie kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF (Gordillo & Sen, 2003; Chen et al., 2012). HIF führt unter anderem zur Transkription von VEGF als Stimulator der Angiogenese (Ahluwalia & Tarnawski, 2012). VEGF wirkt unter anderem proliferationssteigernd und chemotaktisch auf Endothelzellen und stimuliert die Aussprossung aus bestehenden Kapillaren (Eichmann & Simons, 2012). Endotheliale Proliferation und Migration sind essentiell für die im Rahmen der Wundheilung notwendige Gefäßneubildung (Michaelis, 2014).

Im vorliegenden Modell stellt die Hypoxie einerseits die im Rahmen der physiologisch heilenden Wunde herrschende akute Hypoxie und andererseits die bei chronischen Wunden andauernden veränderten Sauerstoffbedingungen dar. Während in HDMEC-MK zu keiner Zeit VEGF im ZKÜ gemessen wurde, kam es unter hypoxischen Bedingungen in ADSC-MK zu einem signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe. Hier zeigt sich also die aus der Literatur bekannte, durch Hypoxie getriggerte VEGF-Synthese (Chung et al., 2009; Lee et al., 2009). In CK wurde VEGF unter normoxischen Bedingungen nur nach 42 h N bei einer Kultur festgestellt. Eine deutliche VEGF-Sekretion konnte in CK nur unter Hypoxie und nach Reoxygenierung gemessen werden. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die zuvor unter Normoxie gebildeten, geringeren Mengen an VEGF durch HDMEC gebunden wurden, unter den veränderten Sauerstoffbedingungen aber die Rezeptoren möglicherweise gesättigt sind und so ein gewisser Überschuss an VEGF im ZKÜ der CK nachgewiesen werden kann. Insgesamt zeigen

diese Ergebnisse, dass Hypoxie durch Stimulation der VEGF-Sekretion aus ADSC deren pro-angiogenes Potential steigert, was auch für die In-vivo-Situation potentiell von Vorteil sein könnte. Dies gilt nicht nur in Bezug auf die physiologische Wundheilung, da die frühe VEGF-Freisetzung die Angiogenese triggert (Bao et al., 2009). Auch im Rahmen der pathophysiologischen Wundheilung könnte dies von Vorteil sein: So zeigte sich im Tierversuch, dass VEGF die Wundheilung diabetischer Mäuse fördert (Galiano et al., 2004). In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die Angiogenese VEGF-abhängig zu sein scheint, da die Hemmung von VEGF-Rezeptoren in vivo die Angiogenese hemmt (Chen et al., 2020). Darüber hinaus wird VEGF zur Therapie diabetischer Ulzera erprobt (Barrientos et al., 2014). Dies verdeutlicht den wundheilungsfördernden Effekt von ADSC, speziell unter hypoxischen Bedingungen, da sie, wie es der Vergleich zwischen den gemessenen und den auf Basis der ADSC- und HDMEC-MK erwarteten Werte, in CK genügend VEGF produzieren, um die VEGF-Rezeptoren der HDMEC zu sättigen (Bachmann et al., 2020).

In der mit der Hämostase überlappend beginnenden Inflammationsphase kommt es unter anderem durch das endothelial gebildete IL-8 zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Wunde (Mukaida et al., 1998; Russo et al., 2014). IL-8 wirkt nicht nur chemotaktisch auf Neutrophile, sondern fördert auch deren transendotheliale Migration sowie deren Degranulation und Bildung von ROS (Mukaida et al., 1998). Etwa 24-48 h später kommt es zur Einwanderung von Monozyten, die sich zu Makrophagen differenzieren (Young & McNaught, 2011). Hierbei wirken insbesondere das endothelial gebildete MCP-1 (Gonzalez et al., 2016; Yadav et al., 2010) und TGF- β chemotaktisch (Gonzalez et al., 2016).

Trotz verschiedener zugrundeliegender Krankheiten sind chronische Wunden und Wundheilungsstörungen generell durch eine Verlängerung der Inflammationsphase gekennzeichnet (Frykberg & Banks, 2015). Schlecht heilende Weichgewebeläsionen zeigen im Vergleich zu akuten Wunden deutlich höhere IL-8-Konzentrationen in der Wundflüssigkeit (Wiegand et al., 2010). Studien an diabetischen Mäusen liefern weiterhin Hinweise, dass MCP-1 an der Verlängerung der Entzündungsreaktion des Gewebes beteiligt sein könnte (Wetzler et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass HDMEC ein Sekretom mit eher proinflammatorischen Eigenschaften besitzen. HDMEC-MK waren im Vergleich zu den anderen Kulturen durch die höchste Sekretion der Zytokine IL-8 und MCP-1 charakterisiert. Die IL-8-Sekretion stieg nur nach Reoxygenierung signifikant an. In Bezug auf MCP-1 hemmte Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle zunächst die MCP-1-Freisetzung, während diese sowohl nach 42 h N als auch nach 42 h H/R signifikant anstieg. ADSC-MK zeigten eine geringere Freisetzung von IL-8 und MCP-1. Auch kam es durch Reoxygenierung in ADSC-MK zu einer erhöhten Sekretion von IL-8, in Bezug auf MCP-1 zeigte sich nur ein Trend mit vermehrter Freisetzung nach 42 h ohne signifikante Unterschiede durch Einfluss der unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen.

Damit liegt die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus ADSC deutlich unter dem Niveau von HDMEC. In CK lagen besonders in Bezug auf IL-8 die gemessenen Werte deutlich unter den aus beiden MK erwarteten Werten. In CK zeigte sich lediglich nach Reoxygenierung eine Erhöhung der IL-8-Konzentration im ZKÜ. Die Freisetzung von MCP-1 wurde durch Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Auch hier kam es wieder zu einem späten Anstieg von MCP-1 unabhängig von der Reoxygenierung, dennoch lagen die gemessenen Konzentrationen deutlich unter den erwarteten Konzentrationen. Allerdings scheint MCP-1 nicht nur eine proinflammatorische Rolle zu spielen. Die mögliche Rolle von MCP-1 in Bezug auf die Angiogenese wird weiter unten beschrieben.

Insgesamt hemmt also die Co-Kultivierung von HDMEC mit ADSC die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine von HDMEC, sodass man von einem grundsätzlich antiinflammatorischen Einfluss der ADSC ausgehen kann.

Die Proliferationsphase der Wundheilung ist durch Bildung von Granulationsgewebe, Angiogenese und Reepithelialisierung bestimmt (Gonzalez et al., 2016). Die Reepithelialisierung wurde in diese Arbeit nicht aufgenommen. Dennoch lassen die vorliegenden Ergebnisse Rückschlüsse auf eine mögliche Wirkung der ADSC auf die Reepithelialisierung schließen.

Granulationsgewebe besteht neben der neu gebildeten EZM aus einsprossenden Kapillaren sowie einwandernden und proliferierenden Zellen, welche an der Auffüllung des Defekts beteiligt sind (Rodrigues et al., 2019). Von besonderer Wichtigkeit sind an dieser Stelle die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Bao et al., 2009) und von Fibroblasten (Bainbridge, 2013). In dieser Phase der Wundheilung kommt es zur vermehrten Proliferation der Zellen durch Eintritt aus der Ruhephase (G₀) in den Zellzyklus, was nach Zellteilung zur Erhöhung der Zelldichte führt (Stephens & Thomas, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation anhand der Entwicklung der Zellzahl sowie des Anteils der Zellen außerhalb der Ruhephase bestimmt.

In MK konnten HDMEC unter normoxischen Bedingungen ihre Zelldichte signifikant erhöhen. Unter Hypoxie bzw. nachfolgender Reoxygenierung zeigte sich keine Proliferation im Sinne einer Erhöhung der Zelldichte. Auch hier scheint, in Bezug auf HDMEC, die Präsenz von ADSC in CK keine positiven Wirkungen auf die Entwicklung der Zelldichte zu haben: Diese blieb, im Vergleich zum Ausgangswert, unter allen Sauerstoffbedingungen konstant, es zeigte sich lediglich ein gewisser Trend zur Proliferation unter normoxischen Sauerstoffbedingungen ohne signifikante Unterschiede. Unter hypoxischen Bedingungen und nach Reoxygenierung zeigte sich eine schwache Reduktion der Zelldichte im Vergleich zum Ausgangswert, jedoch ohne signifikante Unterschiede. Die geringe Proliferation kann in Analogie zum niedrigen Anteil der HDMEC außerhalb der G₀-Phase interpretiert werden.

ADSC zeigten sowohl in MK als auch in CK eine Steigerung ihrer Zelldichte unter normoxischen Bedingungen. In MK konnten ADSC sogar unter Hypoxie im Vergleich zum Ausgangswert ihre Zelldichte signifikant erhöhen, in CK gelang dies nach Reoxygenierung. Die Proliferation unter Sauerstoffmangel zeigt erneut die aus anderen In-vitro-Studien bekannte, ausgezeichnete Hypoxietoleranz von ADSC (Lee et al., 2009; Van Pham et al., 2016), die im vorliegenden Modell unabhängig von HDMEC zu sein scheint. Die Hypoxietoleranz könnte erklären, warum ADSC in vivo bereits günstige Effekte gezeigt haben. Beispielsweise konnte im Rahmen einer klinischen Studie mit 15 Patienten mit kritischer Extremitätenischämie durch intramuskuläre Gabe von ADSC die Heilung der Läsionen verbessert werden (Lee et al., 2012).

In CK befanden sich mehr HDMEC in der G0-Phase des Zellzyklus als in MK. Dies zeigt, dass mehr HDMEC im Rahmen dieses Versuchssystems durch die Präsenz von ADSC in die G0-Phase des Zellzyklus eintreten. Sowohl in CK als auch in MK blieb der Anteil sich außerhalb der G0-Phase befindlicher HDMEC über die Zeit weitgehend konstant und zeigte nur eine geringe Beeinflussung durch die unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen. ADSC wurden im Hinblick auf ihren Anteil der Zellen außerhalb der G0-Phase nicht durch die Anwesenheit von HDMEC beeinflusst: Dieser Anteil lag sowohl in MK als auch in CK stets über 70% und wurde weder durch Hypoxie noch durch Reoxygenierung verändert.

Die folgenden Abschnitte verdeutlichen die Rolle von IL-6. IL-6 scheint eine wichtige Rolle im Rahmen der Wundheilung zu spielen, da dessen Hemmung im Tierversuch zu einer verzögerten Wundheilung führt, welche durch IL-6-Gabe reversibel ist (Gallucci et al., 2000). Während in der vorliegenden Arbeit in HDMEC-MK die IL-6-Freisetzung zunächst von Hypoxie nicht beeinflusst wurde, stieg sie erst nach Reoxygenierung signifikant an und zeigte sich auch im Vergleich zur normoxischen Kontrolle signifikant erhöht. ADSC-MK waren durch eine frühe hohe IL-6-Konzentration charakterisiert, die generell abnahm, durch Hypoxie und Reoxygenierung aber im Vergleich zur Kontrolle gesteigert wurde. In CK wurde generell mehr IL-6 nachgewiesen als aufgrund der in beiden MK festgestellten Werte zu erwarten war. Auch hier zeigte sich ein stimulierender Effekt durch Hypoxie und Reoxygenierung.

Durch diese, insbesondere durch Hypoxie und Reoxygenierung stimulierte Freisetzung von IL-6 in CK könnten ADSC auf diesem Weg einen positiven Effekt auf die Wundheilung ausüben. Darüber hinaus fördert IL-6 im Mausmodell die Wundheilung durch Stimulation der Angiogenese und der Kollagenproduktion (Lin et al., 2003). Für die Reepithelialisierung ist die Migration und Differenzierung von Keratinozyten essentiell (Ben Amar & Wu, 2014). IL-6 spielt eine tragende Rolle im Rahmen dieser Reepithelialisierung, da es die Proliferation und Migration von Keratinozyten stimuliert (Pastar et al., 2014). Das von ADSC gebildete IL-6 trägt im Tierversuch zum Schutz von Hautlappen vor Ischämie-/Reperfusionsschäden bei (Pu et al.,

2017). Ischämie/Reperfusionsschäden können zum Entstehen und zum Progress chronischer Wunden beitragen (Widgerow, 2014).

Im Zuge der Proliferationsphase kommt es *in vivo* zur Migration der Zellen in die Wunde. Zur Untersuchung der Migration der Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Scratch-Assay verwendet. Unter normoxischen Bedingungen konnten sowohl die HDMEC- als auch die ADSC-MK die *In-vitro*-Wunde auffüllen, wobei der Verschluss der *In-vitro*-Wunde in ADSC-MK schneller war als in HDMEC-MK. Unter hypoxischen Bedingungen blieb zunächst eine Migration aus, erst nach Reoxygenierung konnten ADSC in MK signifikant in die *In-vitro*-Wunde migrieren. In CK konnte allerdings schon eine signifikante Verkleinerung der *In-vitro*-Wunde unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden: Übertragen auf die *In-vivo*-Situation könnte dies bedeuten, dass ADSC in der Lage sind, gerade unter hypoxischen Bedingungen ihre Nische zu verlassen und ins Granulationsgewebe einzuwandern. Vorteile vermehrter Präsenz von ADSC im Granulationsgewebe könnte unter anderem in deren parakriner Wirkung liegen, aber auch in ihrer lokalen Wirkung. Die von ihnen sezernierten Faktoren beeinflussen nicht nur Endothelzellen, sondern auch Fibroblasten: In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass im Rattenmodell in Wunden, die mit einem kommerziell erhältlichen Hautersatz und autologer ADSC-Gabe versorgt wurden, die Fibroblastendichte höher war als im Vergleich zur Gruppe, die nicht mit ADSC behandelt wurde (Hamada et al., 2019). Das KM von ADSC steigert *in vitro* die Synthese von Kollagen und Hyaluronsäure von Fibroblasten (Jung et al., 2011). Außerdem bilden ADSC *in vitro*, nach Stimulation mit Ascorbinsäure, selbst EZM aus Kollagen und Fibronectin (Paganelli et al., 2020) und füllen im Tierversuch als zelluläre Komponente des Granulationsgewebes den Weichgewebedefekt auf (Steinberg et al., 2012). So können ADSC sowohl auf direktem als auch auf indirektem Weg die Bildung von Granulationsgewebe fördern.

In vivo kommt es während der Proliferationsphase zur Differenzierung einiger Fibroblasten zu α -SMA-positiven Myofibroblasten, welche EZM synthetisieren und an der Wundkontraktion beteiligt sind (Darby et al., 2014). ADSC sind ebenfalls in der Lage, α -SMA zu exprimieren und *in vitro* einen myofibroblastoiden Phänotyp anzunehmen (Desai et al., 2014). In dieser Arbeit lag der Anteil α -SMA-positiver ADSC in MK zwischen 15,63% an 0 h N und 3,04% an 42 h N. In CK lag dieser Anteil zwischen 16,26% an 0 h N und 4,92% an 42 h N. Sowohl in ADSC-MK als auch in CK zeigte sich also die aus Fibroblasten-Kulturen bekannte Abnahme der Rate α -SMA-positiver Zellen mit zunehmender Zelldichte (Masur et al., 1996). Unter Hypoxie und nach Reoxygenierung zeigte sich in MK, im Vergleich zur normoxischen Kontrolle, ein signifikant höherer Anteil α -SMA-positiver ADSC. Dieser Effekt wurde in CK nicht beobachtet. Die Präsenz von HDMEC scheint in diesem Model einen hemmenden Einfluss auf die Differenzierung der ADSC zu einer myofibroblastoiden Zelle zu haben. Übertragen auf die *In-vivo*-Situation

könnte dies bedeuten, dass die durch Myo-ADSC vermittelte Gewebestabilisierung und -reifung lokal von HDMEC gehemmt wird.

Neben Myofibroblasten (Hinz et al., 2001) sind auch Perizyten durch die Expression von α -SMA charakterisiert (Cai et al., 2011). Perizyten interagieren mit mikrovaskulären Endothelzellen, indem sie den Gefäßtonus regulieren und Gefäße stabilisieren (Zhang et al., 2020). Perizyten spielen sowohl zu Beginn als auch am Abschluss der Angiogenese eine wichtige Rolle: Anfangs lösen sich die Perizyten von der endothelialen Basalmembran ab, um die endotheliale Migration und Aussprossung zu ermöglichen (Van Dijk et al., 2015). Mit Abschluss der Angiogenese lagern sich die Perizyten dem Endothel erneut an, um ihre gefäßstabilisierende Wirkung auszuüben (Van Dijk et al., 2015). Nicht alle neugebildeten Gefäße werden jedoch von Perizyten bedeckt. Solche, die nicht von Perizyten bedeckt sind, bilden sich unter dem Einfluss antiangiogener Faktoren zurück, was einer „Übervaskularisierung“ entgegenwirkt (Kutcher & Herman, 2009). Dies scheint ein wichtiger Schritt im Rahmen der Wundheilung zu sein: Am Modell der diabetischen Maus wurde gezeigt, dass die Gefäße in diabetischen Wunden generell eine höhere Permeabilität bei geringerer Bedeckung mit Perizyten zeigen, als solche in Wunden nicht-diabetischer Tiere (U. A. Okonkwo et al., 2020). Aus In-vitro-Versuchen geht hervor, dass ADSC nicht nur in myofibroblastoide Zellen differenzieren können (Desai et al., 2014), sondern auch durch Annahme Perizyten-ähnlicher Funktion eine gewisse gefäßstabilisierende Wirkung ausüben könnten (Rohringer et al., 2014). Übertragen auf die In-vivo-Situation könnte dies bedeuten, dass Myo-ADSC gewisse Funktionen der Perizyten ausüben könnten.

Ergebnisse aus einem Ex-Vivo-Versuch deuten darauf hin, dass die Hemmung der Freisetzung von MCP-1 die Zell-Zell-Interaktionen zwischen Endothel und den anliegenden Perizyten schwächen könnte (Aplin et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde in CK, insbesondere unter hypoxischen Bedingungen, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant niedrigere Level an MCP-1 festgestellt. Dies könnte wichtig für die Angiogenese sein, da das Ablösen der Perizyten vom Gefäß erst die Aussprossung neuer Gefäße ermöglicht (Van Dijk et al., 2015). MCP-1 fördert im Ex-vivo-Modell die Anlagerung von Perizyten an das Endothel (Aplin et al., 2010), was bedeuten könnte, dass das später vermehrt nachgewiesene MCP-1 mit der Reifung der neu gebildeten Gefäße durch erneute Anlagerung der Perizyten korrelieren könnte.

Damit könnten ADSC im Granulationsgewebe auf parakrinem Weg, wie es durch Förderung der Angiogenese im In-vitro-Modell bekannt ist (Chen et al., 2020), sowie ihrer Fähigkeit in vitro zur Differenzierung in Perizyten-ähnliche Zellen (Rohringer et al., 2014), an der Schaffung eines neuen, stabilen Gefäßnetzwerks im Rahmen der Heilung chronischer Wunden eine wesentliche Rolle spielen.

Die abschließende Phase der Wundheilung ist das Remodelling, welches bis zu 2 Jahre andauern kann (Singh et al., 2017). Hier kommt es zur Umorganisation der im Rahmen der Proliferationsphase neu gebildeten EZM (El Ayadi et al., 2020). Am EZM-Remodelling sind maßgeblich Myofibroblasten beteiligt (Klingberg et al., 2013). Die Wundheilung wird abgeschlossen unter Bildung einer zellarmen Narbe (Gonzalez et al., 2016), die Reduktion der Zelldichte erfolgt durch Apoptose (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019). Eine Persistenz des Myofibroblasten kann zu einer fortgeführten EZM-Synthese und Wundkontraktion führen, wie sie im Rahmen fibrotischer Zustände und pathologisch heilender Wunden beobachtet wird (El Ayadi et al., 2020).

In der vorliegenden Arbeit war die Rate der Myo-ADSC in MK und CK zu Beginn am höchsten und nahm über die Zeit ab. In MK kam es jedoch nach Hypoxie und Hypoxie gefolgt von Reoxygenierung zu einem signifikant höheren Anteil an Myo-ADSC im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Dieser Effekt ließ sich in CK nicht beobachten. In CK lag in der vorliegenden Arbeit die IL-6-Sekretion über dem erwarteten Wert. Ebenso schien sie durch Hypoxie und Reoxygenierung gefördert zu werden. Es scheint anhand dieser Ergebnisse möglich zu sein, dass ADSC, im Gegensatz zu anderen Zellen, wie dem Fibroblasten aus der Sehnenscheide (Seong et al., 2009), nicht durch IL-6 zur Differenzierung zu Myo-ADSC angeregt zu werden. Stattdessen scheinen sie wie die Fibroblasten der Stimmbänder zu reagieren, deren myofibroblastoide Differenzierung durch IL-6 gehemmt wird (Vyas et al., 2011). In Bezug auf die In-vivo-Situation könnte die in CK, im Vergleich zur MK, gehemmte Differenzierung von ADSC zu Myo-ADSC, insbesondere unter hypoxischen Bedingungen, der Fibrose entgegenwirken.

In Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit werden HDMEC im Rahmen des In-vitro-Modells mehr von ADSC beeinflusst als umgekehrt. Für die Übertragung dieser Ergebnisse auf die In-vivo-Situation könnte dies bedeuten, dass ADSC in der Interaktion mit HDMEC das Milieu im Laufe des Heilungsprozesses positiv modulieren. Nach Migration in die Wunde können sie möglicherweise die von HDMEC ausgehende inflammatorische Wirkung herabsetzen, was sich aus dem deutlich reduzierten IL-8-Level in CK ablesen lässt. Charakterisiert durch hohe Werte an VEGF und IL-6 können sie so ein Milieu schaffen, das den Fortgang der Wundheilung und im Besonderen die Angiogenese, positiv beeinflusst.

Im vorliegenden In-vitro-Modell sind ADSC unter anderem durch ihre gute Hypoxietoleranz, mit erhaltener Proliferation und Migration, sowie ihren parakrinen antiinflammatorischen und angiogenen Eigenschaften charakterisiert. Diese Eigenschaften könnten sich auch positiv auf die physiologische In-vivo-Situation der akuten Wundheilung auswirken, da das Gewebe dort zunächst hypoxisch ist (Janis et al., 2010) und die Sauerstoffversorgung im Zuge der Proliferationsphase wieder hergestellt werden muss (Broughton et al., 2006). HDMEC zeigen sich in dieser Arbeit mehr als ortsständige Zellen, deren Proliferation in CK mit ADSC eher stagniert.

Dennoch ist die endotheliale Proliferation und Migration eine Voraussetzung für die Angiogenese und damit für den Fortgang der Wundheilung. Die oben genannten Eigenschaften der ADSC könnten sich insbesondere heilungsfördernd auf chronische Wunden auswirken, da diese unter anderem auf der Basis einer verlängerten Inflammationsreaktion entstehen (Zhao et al., 2013) und häufig durch chronische Hypoxie (Izadi & Ganchi, 2005) und gestörte Angiogenese charakterisiert sind (Kumar et al., 2015). Daher wird in den folgenden Abschnitten auf die Möglichkeiten der Anwendung von ADSC im Rahmen der gestörten Weichgewebeheilung eingegangen.

Die Möglichkeit der therapeutischen Gabe von ADSC zur Behandlung von Weichgewebedefekten durch intravenöse oder intramuskuläre Injektion wurde im Rahmen eines Tierversuchs demonstriert (Ebrahimian et al., 2009). Im Rattenmodell wurden sie erfolgreich in Hydrogele (Abbasi et al., 2023) bzw. Scaffolds (Wu et al., 2018) integriert, in den Weichteilschaden eingebracht und trugen dort zur Verbesserung der Wundheilung bei (Abbasi et al., 2023; Wu et al., 2018). In einem Review von 2018 wurden insgesamt 9 klinische Studien ausgewertet, die die Applikation von ADSC zur Therapie chronischer Ulzera beinhalteten (Holm et al., 2018): Die Applikation erfolgte in den betrachteten Studien teils topisch, intramuskulär, als Injektion um das Ulcus herum oder als Kombination aus einer Injektion um das Ulcus herum sowie in einen im Bereich der Wunde fixierten Schwamm (Holm et al., 2018). Es wurde festgestellt, dass die Verwendung von ADSC mit allenfalls sehr geringen Nebenwirkungen einherging und dass generell die Wundheilung verbessert wird (Holm et al., 2018). Im Rahmen einer später veröffentlichten klinischen Studie wurden ADSC, eingebettet in Sheets, erfolgreich zur Verbesserung der Heilung chronischer Wunden verwendet (Dung et al., 2021). Daneben werden auch die zellfreien Derivate von ADSC und deren Wirkung auf die Weichgewebereparatur erforscht. So zeigte etwa eine Studie am Tiermodell die Verbesserung der diabetischen Wundheilung durch Exosomen von humanen ADSC (Zhang et al., 2022). Im klinischen Versuch am Menschen konnte das konditionierte Medium von ADSC die Heilung von Verbrennungswunden verbessern (Zhou et al., 2013). In Studien zeigte also die Anwendung von ADSC und ihrer Derivate zur Therapie von Weichgewebeschäden positive Resultate.

Trotz vieler erfolgversprechender Studien sollten jedoch einige Limitierungen und potentielle Risiken genannt und beachtet werden.

Ein Gefahrenaspekt, der mit dem Einsatz von MSC im Allgemeinen verknüpft ist, ist deren mögliche Tumorigenität (Li et al., 2021). ADSC fördern in vitro auf parakrinem Weg die Migration und somit die Invasivität von Melanomzellen (Preisner et al., 2018), was auch bei deren Anwendung für die Weichgeweberegeneration zu beachten ist. ADSC selbst scheinen in der In-vitro-Langzeitkultur sowohl ihre morphologischen als auch phänotypischen Eigenschaften zu erhalten. Ebenso zeigten sie eine stabile Telomeraseaktivität, keine Mutationen der

untersuchten Tumorsuppressoren und damit ein insgesamt geringes Entartungspotential (El Atat et al., 2016). Anhand dieser In-vitro-Ergebnisse scheinen ADSC also selbst eher keiner malignen Transformation zu unterliegen, möglicherweise können sie aber andere Tumorzellen beeinflussen.

In Bezug auf die Verwendung von ADSC zur Behandlung von Weichgewebeschäden sollte auch der Aspekt der zellulären Seneszenz nicht außer Acht gelassen werden. Hierunter versteht man einen physiologischerweise auftretenden Zellzyklusarrest (Birch & Gil, 2020). Auch ADSC unterliegen in vitro der Seneszenz (Liao et al., 2019). Seneszenz scheint im Fall von ADSC altersabhängig zu sein, da juvenile ADSC im Vergleich zu adulten ADSC in vitro über längere Zeit über eine bessere Proliferations- und Differenzierungskapazität verfügen. Daneben zeigen juvenile ADSC in vitro eine geringere Expression Seneszenz-assoziiierter Genen (Wu et al., 2022). Die proangiogene Wirkung von seneszenten ADSC scheint in vitro ebenfalls vermindert, speziell dieser Effekt kann aber bis zu einem gewissen Grad durch hypoxische Präkonditionierung aufgehoben werden (Efimenko et al., 2011). Chronische Wunden betreffen überwiegend Ältere (Tilgen & Eming, 2007). Die Auswirkungen der zellulären Seneszenz könnten dabei im Rahmen der autologen Applikation von ADSC für Weichgewebeschäden, insbesondere chronische Wunden, eine Rolle spielen, da aus diesem Grund das therapeutische Potential verändert sein kann.

Insgesamt betrachtet zeigte die Applikation von ADSC im Rahmen klinischer Studien bisher nur sehr wenige und milde Nebenwirkungen (Holm et al., 2018). Dennoch sollten die oben beschriebenen Sicherheitsaspekte im Rahmen der zukünftigen therapeutischen Applikation bedacht werden.

Unter Beachtung der hier beschriebenen Limitierungen könnten ADSC zukünftig verstärkt ein gutes therapeutisches Mittel in verschiedenen Phasen der chronischen Wunde darstellen, besonders zur Schaffung eines antiinflammatorischen und proangiogenen Milieus. Zur weiteren Charakterisierung der genauen Beteiligung der ADSC und deren Interaktion mit anderen Zellen im Rahmen der chronischen Wundheilung eignet sich der vorliegende Assay auch im Rahmen zukünftiger Arbeiten aufgrund seiner Variabilität, insbesondere im Hinblick auf die Kultivierung unterschiedlicher Zellen, der variablen Sauerstoffbedingungen und durch Anpassung und Hinzunahme der Auswerteparameter wie der Zytokinexpression. Ebenso kann der Assay in Zukunft um weitere Methoden, wie beispielsweise der Genexpression, ergänzt werden, um so weitere Aspekte der Rolle von ADSC bei der Modulation chronischer Wunden zu beleuchten.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Originalliteratur

- Abbasi, K., Tavakolizadeh, S., Hosseini, M., Soufdoost, R. S., Heboyan, A., Alam, M., & Fani-Hanifeh, S. (2023). The wound healing effect of collagen/adipose-derived stem cells (ADSCs) hydrogel: In vivo study. *Veterinary Medicine and Science*, 9(1), 282–289. <https://doi.org/10.1002/vms3.1059>
- Agarwal, P., Kukrele, R., & Sharma, D. (2019). Vacuum assisted closure (VAC)/negative pressure wound therapy (NPWT) for difficult wounds: A review. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 10(5), 845–848. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2019.06.015>
- Ahluwalia, A., & Tarnawski, A. S. (2012). Critical Role of Hypoxia Sensor – HIF-1 α in VEGF Gene Activation. Implications for Angiogenesis and Tissue Injury Healing. *Current Medical Chemistry*, 19(1), 90–97. <https://doi.org/10.2174/092986712803413944>
- Akter, F. (2016). Principles of Tissue Engineering. In *Tissue Engineering Made Easy* (S. 3–16). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00002-3>
- Alarcon-Martinez, L., Yilmaz-Ozcan, S., Yemisci, M., Schallek, J., Kılıç, K., Can, A., Di Polo, A., & Dalkara, T. (2018). Capillary pericytes express α -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *eLife*, 7, e34861. <https://doi.org/10.7554/eLife.34861>
- Aplin, A. C., Fogel, E., & Nicosia, R. F. (2010). MCP-1 promotes mural cell recruitment during angiogenesis in the aortic ring model. *Angiogenesis*, 13(3), 219–226. <https://doi.org/10.1007/s10456-010-9179-8>
- Atkin, L. (2019). Chronic wounds: The challenges of appropriate management. *British Journal of Community Nursing*, 24(9), 26–32. <https://doi.org/10.12968/bjcn.2019.24.Sup9.S26>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Bachmann, S., Jennewein, M., Bubel, M., Guthörl, S., Pohlemann, T., & Oberringer, M. (2020). Interacting adipose-derived stem cells and microvascular endothelial cells provide a beneficial milieu for soft tissue healing. *Molecular Biology Reports*, 47(1), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05112-y>
- Baczako, A., Fischer, T., Konstantinow, A., & Volz, T. (2019). Die Versorgung akuter Wunden. *MMW - Fortschritte der Medizin*, 161(4), 46–53. <https://doi.org/10.1007/s15006-019-0005-y>

- Baer, P. C. (2014). Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 256–265. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.256>
- Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care*, 22(8), 407–412. <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.8.407>
- Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M. S., Ehrlich, H. P., & Brem, H. (2009). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*, 153(2), 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>
- Barrientos, S., Brem, H., Stojadinovic, O., & Tomic-Canic, M. (2014). Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 22(5), 569–578. <https://doi.org/10.1111/wrr.12205>
- Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>
- Baum, C. L., & Arpey, C. J. (2005). Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. *Dermatologic Surgery*, 31(6), 674–686. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31612>
- Beldon, P. (2010). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 28(9), 409–412. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2010.05.007>
- Ben Amar, M., & Wu, M. (2014). Re-epithelialization: Advancing epithelium frontier during wound healing. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(93), 20131038. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.1038>
- Bergers, G., & Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology*, 7(4), 452–464. <https://doi.org/10.1215/S1152851705000232>
- Birch, J., & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: Many therapeutic avenues. *Genes & Development*, 34, 1565–1576. <https://doi.org/10.1101/gad.343129.120>
- Boniakowski, A. E., Kimball, A. S., Jacobs, B. N., Kunkel, S. L., & Gallagher, K. A. (2017). Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *The Journal of Immunology*, 199, 17–24. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700223>
- Bosman, F. T., & Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix: Structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology*, 200(4), 423–428. <https://doi.org/10.1002/path.1437>
- Broughton, G., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7S), 12S-34S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>

- Cai, X., Lin, Y., Hauschka, P. V., & Grottkau, B. E. (2011). Adipose stem cells originate from perivascular cells. *Biology of the Cell*, 103(9), 435–447.
<https://doi.org/10.1042/BC20110033>
- Cai, Y., Li, J., Jia, C., He, Y., & Deng, C. (2020). Therapeutic applications of adipose cell-free derivatives: A review. *Stem Cell Research & Therapy*, 11, 312.
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-01831-3>
- Cañedo-Dorantes, L., & Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation*, 2019, 3706315.
<https://doi.org/10.1155/2019/3706315>
- Cardinal, M., Eisenbud, D. E., Armstrong, D. G., Zelen, C., Driver, V., Attinger, C., Phillips, T., & Harding, K. (2009). Serial surgical debridement: A retrospective study on clinical outcomes in chronic lower extremity wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 17(3), 306–311. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00485.x>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473, 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- Chen, L., Gajendrareddy, P. K., & DiPietro, L. A. (2012). Differential Expression of HIF-1 α in Skin and Mucosal Wounds. *Journal of Dental Research*, 91(9), 871–876.
<https://doi.org/10.1177/0022034512454435>
- Chen, L., Zheng, Q., Liu, Y., Li, L., Chen, X., Wang, L., & Wang, L. (2020). Adipose-derived stem cells promote diabetic wound healing via the recruitment and differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells mediated by the VEGF-PLC γ -ERK pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 692, 108531.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108531>
- Cherng, S., Young, J., & Hongbao, M. (2008). Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA). *The Journal of American Science*, 4(4), 7–9.
- Childs, D. R., & Murthy, A. S. (2017). Overview of Wound Healing and Management. *Surgical Clinics of North America*, 97(1), 189–207.
<https://doi.org/10.1016/j.suc.2016.08.013>
- Chittajallu, S. N. S. H., Richhariya, A., Tse, K. M., & Chinthapenta, V. (2022). A Review on Damage and Rupture Modelling for Soft Tissues. *Bioengineering*, 9(1), 26.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering9010026>
- Chung, H.-M., Won, C.-H., & Sung, J.-H. (2009). Responses of adipose-derived stem cells during hypoxia: Enhanced skin-regenerative potential. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(12), 1499–1508. <https://doi.org/10.1517/14712590903307362>
- Clark, R. A. F. (1993). Regulation of Fibroplasia in Cutaneous Wound Repair. *The American Journal of the Medical Sciences*, 306(1), 42–48. <https://doi.org/10.1097/00000441-199307000-00011>

- Darby, I. A., & Hewitson, T. D. (2016). Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell and Tissue Research*, 365(3), 553–562. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2461-3>
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7, 301–311. <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>
- Demidova-Rice, T. N., Durham, J. T., & Herman, I. M. (2012). Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 1(1), 17–22. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0308>
- Demidova-Rice, T. N., Hamblin, M. R., & Herman, I. M. (2012). *Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care*. 25(7).
- Desai, V. D., Hsia, H. C., & Schwarzbauer, J. E. (2014). Reversible Modulation of Myofibroblast Differentiation in Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, 9(1), e86865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086865>
- Diegelmann, R., F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9(1), 283–289. <https://doi.org/10.2741/1184>
- DiPietro, L. A. (2016). Angiogenesis and wound repair: When enough is enough. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(5), 979–984. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0316-102R>
- Dissemond, J., Augustin, M., Eming, S. A., Goerge, T., Horn, T., Karrer, S., Schumann, H., & Stücker, M. (2014). Modern wound care—Practical aspects of non-interventional topical treatment of patients with chronic wounds. *Journal of the German Society of Dermatology*, 12(7), 541–554. <https://doi.org/10.1111/ddg.12351>
- Dissemond, J., Goos, M., & Wagner, S. N. (2002). Die Bedeutung von oxidativem Stress in der Genese und Therapie chronischer Wunden. *Der Hautarzt*, 53(11), 718–723. <https://doi.org/10.1007/s00105-001-0325-5>
- Dong, Z., & Chen, Y. (2013). Transcriptomics: Advances and approaches. *Science China Life Sciences*, 56(10), 960–967. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4557-2>
- Dung, T., Han, V., Tien, G., & Lam, H. (2021). Autologous Adipose-Derived Stem Cell (ADSC) Transplantation In The Management Of Chronic Wounds. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 34(4), 343–350.
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., Leaper, D., & Georgopoulos, N. T. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: The functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process: Reactive oxygen species and wound healing. *International Wound Journal*, 14(1), 89–96. <https://doi.org/10.1111/iwj.12557>

- Duscher, D., Barrera, J., Wong, V. W., Maan, Z. N., Whittam, A. J., Januszyk, M., & Gurtner, G. C. (2016). Stem Cells in Wound Healing: The Future of Regenerative Medicine? A Mini-Review. *Gerontology*, *62*(2), 216–225. <https://doi.org/10.1159/000381877>
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, *32*(4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Ebrahimian, T. G., Pouzoulet, F., Squiban, C., Buard, V., André, M., Cousin, B., Gourmelon, P., Benderitter, M., Casteilla, L., & Tamarat, R. (2009). Cell Therapy Based on Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Promotes Physiological and Pathological Wound Healing. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(4), 503–510. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.178962>
- Efimenko, A., Starostina, E., Kalinina, N., & Stolzing, A. (2011). Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *Journal of Translational Medicine*, *9*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-10>
- Efimenko, A. Yu., Starostina, E. E., Rubina, K. A., Kalinina, N. I., & Parfenova, E. V. (2010). Viability and angiogenic activity of mesenchymal stromal cells from adipose tissue and bone marrow under hypoxia and inflammation in vitro. *Cell and Tissue Biology*, *4*(2), 117–127. <https://doi.org/10.1134/S1990519X1002001X>
- Eichmann, A., & Simons, M. (2012). VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Current Opinion in Cell Biology*, *24*(2), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.02.002>
- El Atat, O., Antonios, D., Hilal, G., Hokayem, N., Abou-Ghoch, J., Hashim, H., Serhal, R., Hebbo, C., Moussa, M., & Alaaeddine, N. (2016). An Evaluation of the Stemness, Paracrine, and Tumorigenic Characteristics of Highly Expanded, Minimally Passaged Adipose-Derived Stem Cells. *PLOS ONE*, *11*(9), e0162332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162332>
- El Ayadi, A., Jay, J. W., & Prasai, A. (2020). Current Approaches Targeting the Wound Healing Phases to Attenuate Fibrosis and Scarring. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3), 1105. <https://doi.org/10.3390/ijms21031105>
- Elkington, P. T., Green, J. A., & Friedland, J. S. (2009). Analysis of Matrix Metalloproteinase Secretion by Macrophages. In N. E. Reiner (Hrsg.), *Macrophages and Dendritic Cells* (Bd. 531, S. 253–265). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-396-7_16
- Ellis, S., Lin, E. J., & Tartar, D. (2018). Immunology of Wound Healing. *Current Dermatology Reports*, *7*(4), 350–358. <https://doi.org/10.1007/s13671-018-0234-9>
- Enoch, S., & Leaper, D. J. (2005). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, *23*(2), 37–42. <https://doi.org/10.1383/surg.23.2.37.60352>

- Enoch, S., & Price, P. E. (2004). Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide Wounds*.
- Eriksson, E., Liu, P. Y., Schultz, G. S., Martins-Green, M., Tanaka, R., Weir, D., Gould, L. J., Armstrong, D. G., Gibbons, G. W., Wolcott, R., Olutoye, O. O., Kirsner, R. S., & Gurtner, G. C. (2022). Chronic wounds: Treatment consensus. *Wound Repair and Regeneration*, *30*(2), 156–171. <https://doi.org/10.1111/wrr.12994>
- Falanga, V., Isseroff, R. R., Soulika, A. M., Romanelli, M., Margolis, D., Kapp, S., Granick, M., & Harding, K. (2022). Chronic wounds. *Nature Reviews Disease Primers*, *8*, 50. <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00377-3>
- Fontoura, J. C., Viezzer, C., dos Santos, F. G., Ligabue, R. A., Weinlich, R., Puga, R. D., Antonow, D., Severino, P., & Bonorino, C. (2020). Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science and Engineering: C*, *107*, 110264. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110264>
- Franck, C. L., Senegaglia, A. C., Leite, L. M. B., De Moura, S. A. B., Francisco, N. F., & Ribas Filho, J. M. (2019). Influence of Adipose Tissue-Derived Stem Cells on the Burn Wound Healing Process. *Stem Cells International*, *2019*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/2340725>
- Frykberg, R. G., & Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, *4*(9), 560–582. <https://doi.org/10.1089/wound.2015.0635>
- Gabbiani, G. (1992). The biology of the myofibroblast. *Kidney International*, *41*(3), 530–532. <https://doi.org/10.1038/ki.1992.75>
- Galiano, R. D., Tepper, O. M., Pelo, C. R., Bhatt, K. A., Callaghan, M., Bastidas, N., Bunting, S., Steinmetz, H. G., & Gurtner, G. C. (2004). Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells. *The American Journal of Pathology*, *164*(6), 1935–1947. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63754-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63754-6)
- Gallucci, R. M., Simeonova, P. P., Matheson, J. M., Kommineni, C., Guriel, J. L., Sugawara, T., & Luster, M. I. (2000). Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *The FASEB Journal*, *14*(15), 2525–2531. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0073com>
- Garrett, B. (1998). Re-epithelialisation. *Journal of Wound Care*, *7*(7), 358–359. <https://doi.org/10.12968/jowc.1998.7.7.358>
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., & Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer*, *31*(1), 13–20. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910310104>

- Gerhardt, H. (2008). VEGF and Endothelial Guidance in Angiogenic Sprouting. *Organogenesis*, 4(4), 241–246. <https://doi.org/10.4161/org.4.4.7414>
- Gill, S., & Parks, W. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6–7), 1334–1347. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.024>
- Goldman, R. (2004). Growth Factors and Chronic Wound Healing: Past, Present, and Future: *Advances in Skin & Wound Care*, 17(1), 24–35. <https://doi.org/10.1097/00129334-200401000-00012>
- Gonzalez, A. C. D. O., Costa, T. F., Andrade, Z. D. A., & Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing—A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>
- Gordillo, G. M., & Sen, C. K. (2003). Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *The American Journal of Surgery*, 186(3), 259–263. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(03\)00211-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(03)00211-3)
- Greenhalgh, D. G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(9), 1019–1030. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00058-2)
- Guillamat-Prats, R. (2021). The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration. *Cells*, 10(7), 1729. <https://doi.org/10.3390/cells10071729>
- Guillaud, P., Vermont, J., & Seigneurin, D. (1991). Automatic classification of cells in cell cycle phases based on Ki-67 antigen quantification by fluorescence microscopy. *Cell Proliferation*, 24(5), 481–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1991.tb01176.x>
- Guo, J., Hu, H., Gorecka, J., Bai, H., He, H., Assi, R., Isaji, T., Wang, T., Setia, O., Lopes, L., Gu, Y., & Dardik, A. (2018). Adipose-derived mesenchymal stem cells accelerate diabetic wound healing in a similar fashion as bone marrow-derived cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 315(6), C885–C896. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2018>
- Hamada, T., Matsubara, H., Yoshida, Y., Ugaji, S., Nomura, I., & Tsuchiya, H. (2019). Autologous adipose-derived stem cell transplantation enhances healing of wound with exposed bone in a rat model. *PLOS ONE*, 14(5), e0214106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214106>
- Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., & Matsushima, K. (1994). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 56(5), 559–564. <https://doi.org/10.1002/jlb.56.5.559>
- Hart, J. (2002). Inflammation 1: Its role in the healing of acute wounds. *Journal of Wound Care*, 11(6), 205–209. <https://doi.org/10.12968/jowc.2002.11.6.26411>

- Hassan, I., Saxena, A., & Ahmad, F. (2012). Structure and function of von Willebrand factor. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 23(1), 11–22.
<https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32834cb35d>
- Hassan, W. U., Greiser, U., & Wang, W. (2014). Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 22(3), 313–325.
<https://doi.org/10.1111/wrr.12173>
- Henry, C. M., Hollville, E., & Martin, S. J. (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, 61(2), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.01.008>
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
- Hinz, B. (2010). The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics*, 43(1), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.020>
- Hinz, B. (2016). The role of myofibroblasts in wound healing. *Current Research in Translational Medicine*, 64(4), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.09.003>
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G., & Chaponnier, C. (2001). Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. *Molecular Biology of the Cell*, 12(9), 2730–2741. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.9.2730>
- Hinz, B., & Gabbiani, G. (2003). Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: Role in connective tissue remodeling. *Thrombosis and Haemostasis*, 90(12), 993–1002.
<https://doi.org/10.1160/TH03-05-0328>
- Hirschi, K. K., & D'Amore, P. A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular Research*, 32(4), 687–698. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(96\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(96)00063-6)
- Holm, J. S., Toyserkani, N. M., & Sorensen, J. A. (2018). Adipose-derived stem cells for treatment of chronic ulcers: Current status. *Stem Cell Research & Therapy*, 9, 142.
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0887-0>
- Hu, M. S., Maan, Z. N., Wu, J.-C., Rennert, R. C., Hong, W. X., Lai, T. S., Cheung, A. T. M., Walmsley, G. G., Chung, M. T., McArdle, A., Longaker, M. T., & Lorenz, H. P. (2014). Tissue Engineering and Regenerative Repair in Wound Healing. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(7), 1494–1507. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1010-z>
- Huang, Y.-Z., Gou, M., Da, L.-C., Zhang, W.-Q., & Xie, H.-Q. (2020). Mesenchymal Stem Cells for Chronic Wound Healing: Current Status of Preclinical and Clinical Studies. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 26(6), 555–570.
<https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0351>
- Huayllani, M. T., Sarabia-Estrada, R., Restrepo, D. J., Boczar, D., Sisti, A., Nguyen, J. H., Rinker, B. D., Moran, S. L., Quiñones-Hinojosa, A., & Forte, A. J. (2020). Adipose-derived stem cells in wound healing of full-thickness skin defects: A review of the

- literature. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, 54(5), 263–279.
<https://doi.org/10.1080/2000656X.2020.1767116>
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. In W. H. Yong (Hrsg.), *Biobanking* (Bd. 1897, S. 299–311). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Izadi, K., & Ganchi, P. (2005). Chronic Wounds. *Clinics in Plastic Surgery*, 32(2), 209–222.
<https://doi.org/10.1016/j.cps.2004.11.011>
- Janis, J. E., Kwon, R. K., & Lalonde, D. H. (2010). A Practical Guide to Wound Healing: *Plastic and Reconstructive Surgery*, 125(6), 230e–244e.
<https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181d9a0d1>
- Jia, Q., Zhao, H., Wang, Y., Cen, Y., & Zhang, Z. (2023). Mechanisms and applications of adipose-derived stem cell-extracellular vesicles in the inflammation of wound healing. *Frontiers in Immunology*, 14, 1214757. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1214757>
- Johnson, B. Z., Stevenson, A. W., Prêle, C. M., Fear, M. W., & Wood, F. M. (2020). The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing. *Biomedicines*, 8(5), 101.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8050101>
- Johnson, K. E., & Wilgus, T. A. (2014). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in Wound Care*, 3(10), 647–661. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0517>
- Johnston, B. R., Ha, A. Y., & Kwan, D. (2016). Surgical Management of Chronic Wounds. *Rhode Island Medical Journal*, 99(2), 30–33.
- Jones, R. E., Foster, D. S., & Longaker, M. T. (2018). Management of Chronic Wounds—2018. *Journal of the American Medical Association*, 320(14), 1481–1482.
<https://doi.org/10.1001/jama.2018.12426>
- Jordan, W. (2009). Antigen Measurement Using ELISA. In *The Protein Protocols Handbook* (3. Aufl., S. 1083–1088).
- Jung, H., Kim, H. H., Lee, D. H., Hwang, Y.-S., Yang, H.-C., & Park, J.-C. (2011). Transforming growth factor-beta 1 in adipose derived stem cells conditioned medium is a dominant paracrine mediator determines hyaluronic acid and collagen expression profile. *Cytotechnology*, 63(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/s10616-010-9327-4>
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments*, 88, e51046.
<https://doi.org/10.3791/51046>
- Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In M. L. Nagpal, O.-M. Boldura, C. Baltă, & S. Enany (Hrsg.), *Synthetic Biology—New Interdisciplinary Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>

- Kakudo, N., Kushida, S., Suzuki, K., Ogura, T., Notodihardjo, P. V., Hara, T., & Kusumoto, K. (2012). Effects of transforming growth factor-beta1 on cell motility, collagen gel contraction, myofibroblastic differentiation, and extracellular matrix expression of human adipose-derived stem cell. *Human Cell*, 25(4), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s13577-012-0049-0>
- Kalra, S., & Sharma, S. K. (2018). Diabetes in the Elderly. *Diabetes Therapy*, 9(2), 493–500. <https://doi.org/10.1007/s13300-018-0380-x>
- Kapur, S. K., & Katz, A. J. (2013). Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie*, 95(12), 2222–2228. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.001>
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S. S., Vynios, D. H., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C. E. H., Duca, L., Durbeej, M., Afratis, N. A., Troeberg, L., Franchi, M., Masola, V., & Onisto, M. (2021). A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS Journal*, 288(24), 6850–6912. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>
- Kim, W.-S., Park, B.-S., & Sung, J.-H. (2009). The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(7), 879–887. <https://doi.org/10.1517/14712590903039684>
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, 37(7), 8471–8486. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>
- Kirsner, R. S., & Eaglestein, W. H. (1993). The Wound Healing Process. *Dermatologic Clinics*, 11(4), 629–640. [https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(18\)30216-X](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(18)30216-X)
- Klingberg, F., Hinz, B., & White, E. S. (2013). The myofibroblast matrix: Implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of Pathology*, 229(2), 298–309. <https://doi.org/10.1002/path.4104>
- Koehler, C., Niederbichler, A. D., Jung, F. J., Scholz, T., Labler, L., Perez, D., Jandali, A., Comber, M., Kuenzi, W., & Wedler, V. (2008). Wound Therapy Using the Vacuum-Assisted Closure Device: Clinical Experience with Novel Indications. *Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care*, 65(3), 722–731. <https://doi.org/10.1097/01.ta.0000249295.82527.19>
- Kook, Y.-M., Kim, H., Kim, S., Heo, C. Y., Park, M. H., Lee, K., & Koh, W.-G. (2018). Promotion of Vascular Morphogenesis of Endothelial Cells Co-Cultured with Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Using Polycaprolactone/Gelatin Nanofibrous Scaffolds. *Nanomaterials*, 8(2), 117. <https://doi.org/10.3390/nano8020117>
- Korn, C., & Augustin, H. G. (2015). Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Developmental Cell*, 34(1), 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.004>

- Kranke, P., Bennett, M. H., Martyn-St James, M., Schnabel, A., Debus, S. E., & Weibel, S. (2015). Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6, CD004123. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004123.pub4>
- Krzyszczczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., & Berthiaume, F. (2018). The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in Physiology*, 9, 419. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>
- Kuhn, P., Bubel, M., Jennewein, M., Guthörl, S., Pohlemann, T., & Oberringer, M. (2022). Dose-dependent dominance: How cell densities design stromal cell functions during soft tissue healing. *Cell Biochemistry and Function*, 40(5), 439–450. <https://doi.org/10.1002/cbf.3705>
- Kumar, P., Kumar, S., Udupa, E. P., Kumar, U., Rao, P., & Honnegowda, T. (2015). Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plastic and Aesthetic Research*, 2(5), 243. <https://doi.org/10.4103/2347-9264.165438>
- Kumar, S., & Leaper, D. J. (2005). Classification and management of acute wounds. *Surgery (Oxford)*, 23(2), 47–51. <https://doi.org/10.1383/surg.23.2.47.60348>
- Kutcher, M. E., & Herman, I. M. (2009). The pericyte: Cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvascular Research*, 77(3), 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.01.007>
- Lam, G., Fontaine, R., Ross, F. L., & Chiu, E. S. (2017). Hyperbaric Oxygen Therapy: Exploring the Clinical Evidence. *Advances in Skin & Wound Care*, 30(4), 181–190. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000513089.75457.22>
- Landén, N. X., Li, D., & Stähle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: A critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(20), 3861–3885. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260(5110), 920–926.
- Las Heras, K., Igartua, M., Santos-Vizcaino, E., & Hernandez, R. M. (2020). Chronic wounds: Current status, available strategies and emerging therapeutic solutions. *Journal of Controlled Release*, 328, 532–550. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.039>
- Lazarus, G. S. (1994). Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. *Archives of Dermatology*, 130(4), 489. <https://doi.org/10.1001/archderm.1994.01690040093015>
- Lee, E. Y., Xia, Y., Kim, W.-S., Kim, M. H., Kim, T. H., Kim, K. J., Park, B.-S., & Sung, J.-H. (2009). Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: Increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair and Regeneration*, 17(4), 540–547. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00499.x>

- Lee, H. C., An, S. G., Lee, H. W., Park, J.-S., Cha, K. S., Hong, T. J., Park, J. H., Lee, S. Y., Kim, S.-P., Kim, Y. D., Chung, S. W., Bae, Y. C., Shin, Y. B., Kim, J. I., & Jung, J. S. (2012). Safety and Effect of Adipose Tissue-Derived Stem Cell Implantation in Patients With Critical Limb Ischemia: – A Pilot Study –. *Circulation Journal*, *76*(7), 1750–1760. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-11-1135>
- Li, C., Zhao, H., & Wang, B. (2021). Mesenchymal stem/stromal cells: Developmental origin, tumorigenesis and translational cancer therapeutics. *Translational Oncology*, *14*(1), 100948. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100948>
- Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, *25*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007>
- Li, J., Zhang, Y.-P., & Kirsner, R. S. (2003). Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy Research and Technique*, *60*(1), 107–114. <https://doi.org/10.1002/jemt.10249>
- Liao, N., Shi, Y., Zhang, C., Zheng, Y., Wang, Y., Zhao, B., Zeng, Y., Liu, X., & Liu, J. (2019). Antioxidants inhibit cell senescence and preserve stemness of adipose tissue-derived stem cells by reducing ROS generation during long-term in vitro expansion. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 306. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1404-9>
- Lin, Z.-Q., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T., & Mukaida, N. (2003). Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology*, *73*(6), 713–721. <https://doi.org/10.1189/jlb.0802397>
- Lingen, M. W. (2001). Role of Leukocytes and Endothelial Cells in the Development of Angiogenesis in Inflammation and Wound Healing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *125*(1), 67–71. <https://doi.org/10.5858/2001-125-0067-ROLAEC>
- Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., & Yan, C. (2014). Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia–reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvascular Research*, *92*, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.01.008>
- Madonna, R., Pizzi, S. D., Tartaro, A., & De Caterina, R. (2014). Transplantation of Mesenchymal Cells Improves Peripheral Limb Ischemia in Diabetic Rats. *Molecular Biotechnology*, *56*(5), 438–448. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9735-3>
- Martin, P. (1997). Wound Healing—Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, *276*(5309), 75–81. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.75>
- Martinez, M. M., Reif, R. D., & Pappas, D. (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods*, *2*(8), 996. <https://doi.org/10.1039/c0ay00247j>

- Maruo, N., Morita, I., Shirao, M., & Murota, S. (1992). IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology*, *131*(2), 710–714. <https://doi.org/10.1210/endo.131.2.1639018>
- Masłowski, L., Paprocka, M., Czyżewska-Buczyńska, A., Bielawska-Pohl, A., Duś, D., Grendziak, R., Witkiewicz, W., & Czarnecka, A. (2020). Autotransplantation of the Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Therapy of Venous Stasis Ulcers. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *68*(1), 5. <https://doi.org/10.1007/s00005-020-00571-9>
- Masur, S. K., Dewal, H. S., Dinh, T. T., Erenburg, I., & Petridou, S. (1996). Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(9), 4219–4223. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.4219>
- Mazini, L., Rochette, L., Admou, B., Amal, S., & Malka, G. (2020). Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4), 1306. <https://doi.org/10.3390/ijms21041306>
- Mazini, L., Rochette, L., Amine, M., & Malka, G. (2019). Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10), 2523. <https://doi.org/10.3390/ijms20102523>
- Mazini, L., Rochette, L., Hamdan, Y., & Malka, G. (2021). Skin Immunomodulation during Regeneration: Emerging New Targets. *Journal of Personalized Medicine*, *11*(2), 85. <https://doi.org/10.3390/jpm11020085>
- Merfeld-Clauss, S., Gollahalli, N., March, K. L., & Traktuev, D. O. (2010). Adipose Tissue Progenitor Cells Directly Interact with Endothelial Cells to Induce Vascular Network Formation. *Tissue Engineering Part A*, *16*(9), 2953–2966. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0635>
- Michaelis, U. R. (2014). Mechanisms of endothelial cell migration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(21), 4131–4148. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1678-0>
- Monaco, J. L., & Lawrence, W. T. (2003). Acute wound healing An overview. *Clinics in Plastic Surgery*, *30*(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/s0094-1298\(02\)00070-6](https://doi.org/10.1016/s0094-1298(02)00070-6)
- Mukaida, N., Harada, A., & Matsushima, K. (1998). Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *9*(1), 9–23. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(97\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(97)00022-1)
- Mustoe, T. A., O’Shaughnessy, K., & Kloeters, O. (2006). Chronic Wound Pathogenesis and Current Treatment Strategies: A Unifying Hypothesis: *Plastic and Reconstructive Surgery*, *117*(June Supplement), 35S–41S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225431.63010.1b>

- Naderi, N., Combellack, E. J., Griffin, M., Sedaghati, T., Javed, M., Findlay, M. W., Wallace, C. G., Mosahebi, A., Butler, P. E., Seifalian, A. M., & Whitaker, I. S. (2017). The regenerative role of adipose-derived stem cells (ADSC) in plastic and reconstructive surgery. *International Wound Journal*, *14*(1), 112–124.
<https://doi.org/10.1111/iwj.12569>
- Nathan, C., & Sporn, M. (1991). Cytokines in context. *Journal of Cell Biology*, *113*(5), 981–986. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.5.981>
- Nguyen, A., Guo, J., Banyard, D. A., Fadavi, D., Toranto, J. D., Wirth, G. A., Paydar, K. Z., Evans, G. R. D., & Widgerow, A. D. (2016). Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, *69*(2), 170–179.
<https://doi.org/10.1016/j.bjps.2015.10.015>
- Nishimoto, N., & Kishimoto, T. (2006). Interleukin 6: From bench to bedside. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, *2*(11), 619–626. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0338>
- Nurden, A. T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I., & Anitua, E. (2008). Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience*, *13*(9), 3525–3548. <https://doi.org/10.2741/2947>
- Nwomeh, B. C., Yager, D. R., & Cohen, I. K. (1998). Physiology of the Chronic Wound. *Clinics in Plastic Surgery*, *25*(3), 341–354. [https://doi.org/10.1016/S0094-1298\(20\)32468-8](https://doi.org/10.1016/S0094-1298(20)32468-8)
- Oberringer, M., Bubel, M., Jennewein, M., Guthörl, S., Morsch, T., Bachmann, S., Metzger, W., & Pohlemann, T. (2018). The role of adipose-derived stem cells in a self-organizing 3D model with regard to human soft tissue healing. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *445*(1–2), 195–210. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3265-9>
- Oberringer, M., Jennewein, M., Motsch, S. E., Pohlemann, T., & Seekamp, A. (2005). Different cell cycle responses of wound healing protagonists to transient in vitro hypoxia. *Histochemistry and Cell Biology*, *123*(6), 595–603. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0782-5>
- Oberringer, M., Meins, C., Bubel, M., & Pohlemann, T. (2007). A new in vitro wound model based on the co-culture of human dermal microvascular endothelial cells and human dermal fibroblasts. *Biology of the Cell*, *99*(4), 197–207.
<https://doi.org/10.1042/BC20060116>
- Okonkwo, U. A., Chen, L., Ma, D., Haywood, V. A., Barakat, M., Urao, N., & DiPietro, L. A. (2020). Compromised angiogenesis and vascular Integrity in impaired diabetic wound healing. *PLOS ONE*, *15*(4), e0231962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231962>
- Okonkwo, U., & DiPietro, L. (2017). Diabetes and Wound Angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7), 1419. <https://doi.org/10.3390/ijms18071419>

- Oliinyk, D., Eigenberger, A., Felthaus, O., Haerteis, S., & Prantl, L. (2023). Chorioallantoic Membrane Assay at the Cross-Roads of Adipose-Tissue-Derived Stem Cell Research. *Cells*, *12*(4), 592. <https://doi.org/10.3390/cells12040592>
- Ong, C. S., Zhou, X., Han, J., Huang, C. Y., Nashed, A., Khatri, S., Mattson, G., Fukunishi, T., Zhang, H., & Hibino, N. (2018). In vivo therapeutic applications of cell spheroids. *Biotechnology Advances*, *36*(2), 494–505. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.003>
- Paganelli, A., Benassi, L., Rossi, E., & Magnoni, C. (2020). Extracellular matrix deposition by adipose-derived stem cells and fibroblasts: A comparative study. *Archives of Dermatological Research*, *312*(4), 295–299. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01997-8>
- Pakyari, M., Farrokhi, A., Maharlooei, M. K., & Ghahary, A. (2013). Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Advances in Wound Care*, *2*(5), 215–224. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0406>
- Pan, X., Chen, G., Wu, P., Han, C., & Ho, J. (2018). Skin perfusion pressure as a predictor of ischemic wound healing potential (Review). *Biomedical Reports*, *8*(4), 330–334. <https://doi.org/10.3892/br.2018.1064>
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R., & Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care*, *3*(7), 445–464. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0473>
- Percival, N. J. (2002). Classification of Wounds and their Management. *Surgery (Oxford)*, *20*(5), 114–117. <https://doi.org/10.1383/surg.20.5.114.14626>
- Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Altrock, B. W., Deuel, T. F., & Thomason, A. (1991). Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*, *45*(4), 319–326. <https://doi.org/10.1002/jcb.240450403>
- Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Marti, R. M., Macià, A., & Panosa, A. (2019). In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*, 107. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00107>
- Powers, J. G., Higham, C., Broussard, K., & Phillips, T. J. (2016). Wound healing and treating wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *74*(4), 607–625. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.070>
- Prasetyono, T. O. H. (2009). General concept of wound healing, revisited. *Medical Journal of Indonesia*, *18*(3), 208–216. <https://doi.org/10.13181/mji.v18i3.364>
- Preisner, F., Leimer, U., Sandmann, S., Zoernig, I., Germann, G., & Koellensperger, E. (2018). Impact of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Malignant

- Melanoma Cells in An In Vitro Co-culture Model. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(1), 125–140. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9772-y>
- Prince, M. J., Wu, F., Guo, Y., Gutierrez Robledo, L. M., O'Donnell, M., Sullivan, R., & Yusuf, S. (2015). The burden of disease in older people and implications for health policy and practice. *The Lancet*, 385(9967), 549–562. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61347-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61347-7)
- Pu, C.-M., Liu, C.-W., Liang, C.-J., Yen, Y.-H., Chen, S.-H., Jiang-Shieh, Y.-F., Chien, C.-L., Chen, Y.-C., & Chen, Y.-L. (2017). Adipose-Derived Stem Cells Protect Skin Flaps against Ischemia/Reperfusion Injury via IL-6 Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(6), 1353–1362. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.12.030>
- Rakocevic, J., Orlic, D., Mitrovic-Ajtic, O., Tomasevic, M., Dobric, M., Zlatic, N., Milasinovic, D., Stankovic, G., Ostojić, M., & Labudovic-Borovic, M. (2017). Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Experimental and Molecular Pathology*, 102(2), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.02.005>
- Ramasastry, S. S. (2005). Acute Wounds. *Clinics in Plastic Surgery*, 32(2), 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2004.12.001>
- Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., & Saparov, A. (2021). Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*, 11(5), 700. <https://doi.org/10.3390/biom11050700>
- Rhinn, M., Ritschka, B., & Keyes, W. M. (2019). Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development*, 146(20), dev151837. <https://doi.org/10.1242/dev.151837>
- Ribatti, D., Tamma, R., Ruggieri, S., Annese, T., & Crivellato, E. (2020). Surface markers: An identity card of endothelial cells. *Microcirculation*, 27(1), e12587. <https://doi.org/10.1111/micc.12587>
- Ridiandries, A., Tan, J., & Bursill, C. (2018). The Role of Chemokines in Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3217. <https://doi.org/10.3390/ijms19103217>
- Riedel, K., Ryssel, H., Koellensperger, E., Germann, G., & Kremer, T. (2008). Pathophysiologie der chronischen Wunde. *Der Chirurg*, 79(6), 526–534. <https://doi.org/10.1007/s00104-008-1501-2>
- Rivera, A. E., & Spencer, J. M. (2007). Clinical aspects of full-thickness wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.10.001>
- Robson, M. C. (1997). WOUND INFECTION: A Failure of Wound Healing Caused by an Imbalance of Bacteria. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 637–650. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70572-7](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70572-7)

- Rodeheaver, G. T., & Ratliff, C. R. (1997). Wound Cleansing, Wound Irrigation, Wound Disinfection. In *Chronic wound care: A clinical source book for healthcare professionals* (S. 97–108). HMP communications.
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, *99*(1), 665–706.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>
- Rodriguez, P. G., Felix, F. N., Woodley, D. T., & Shim, E. K. (2008). The Role of Oxygen in Wound Healing: A Review of the Literature. *Dermatologic Surgery*, *34*(9), 1159–1169.
<https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2008.34254.x>
- Rohringer, S., Hofbauer, P., Schneider, K. H., Husa, A.-M., Feichtinger, G., Peterbauer-Scherb, A., Redl, H., & Holnthoner, W. (2014). Mechanisms of vasculogenesis in 3D fibrin matrices mediated by the interaction of adipose-derived stem cells and endothelial cells. *Angiogenesis*, *17*(4), 921–933. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9439-0>
- Rousselle, P., Montmasson, M., & Garnier, C. (2019). Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix Biology*, *75–76*, 12–26.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.002>
- Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, *10*(5), 593–619. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.894886>
- Ruthenborg, R. J., Ban, J.-J., Wazir, A., Takeda, N., & Kim, J. (2014). Regulation of Wound Healing and Fibrosis by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1. *Molecules and Cells*, *37*(9), 637–643. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0150>
- Sadler, J. E. (1998). BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF VON WILLEBRAND FACTOR. *Annual Review of Biochemistry*, *67*(1), 395–424. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.395>
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & Development*, *28*(2), 99–114.
<https://doi.org/10.1101/gad.235184.113>
- Schneider, G., Bubel, M., Pohlemann, T., & Oberringer, M. (2015). Response of endothelial cells and pericytes to hypoxia and erythropoietin in a co-culture assay dedicated to soft tissue repair. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *407*(1–2), 29–40.
<https://doi.org/10.1007/s11010-015-2451-x>
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, *182*(3), 311–322. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9)

- Schreml, S., Szeimies, R. M., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M., & Babilas, P. (2010). Oxygen in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, *163*(2), 257–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09804.x>
- Schultz, G., Clark, W., & Rotatori, D. S. (1991). EGF and TGF- α in wound healing and repair. *Journal of Cellular Biochemistry*, *45*(4), 346–352. <https://doi.org/10.1002/jcb.240450407>
- Schwarz, F., Jennewein, M., Bubel, M., Holstein, J. H., Pohlemann, T., & Oberringer, M. (2013). Soft tissue fibroblasts from well healing and chronic human wounds show different rates of myofibroblasts in vitro. *Molecular Biology Reports*, *40*(2), 1721–1733. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2223-6>
- Sen, C. K. (2009). Wound healing essentials: Let there be oxygen. *Wound Repair and Regeneration*, *17*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00436.x>
- Seong, G. J., Hong, S., Jung, S.-A., Lee, J.-J., Lim, E., Kim, S.-J., & Lee, J. H. (2009). TGF- β -induced interleukin-6 participates in transdifferentiation of human Tenon's fibroblasts to myofibroblasts. *Molecular Vision*, *15*, 2123–2128.
- Shariff, A., Kangas, J., Coelho, L. P., Quinn, S., & Murphy, R. F. (2010). Automated Image Analysis for High-Content Screening and Analysis. *Journal of Biomedical Screening*, *15*(7), 726–734. <https://doi.org/10.1177/1087057110370894>
- Shu, S., Wang, Y., Zheng, M., Liu, Z., Cai, J., Tang, C., & Dong, Z. (2019). Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair. *Cells*, *8*(3), 207. <https://doi.org/10.3390/cells8030207>
- Siddiqui, A., Galiano, R. D., Connors, D., Gruskin, E., Wu, L., & Mustoe, T. A. (1996). Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: Acute versus chronic hypoxia. *Wound Repair and Regeneration*, *4*(2), 211–218. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1996.40207.x>
- Silva, A. C., & Lobo, J. M. S. (2019). Cytokines and Growth Factors. In A. C. Silva, J. N. Moreira, J. M. S. Lobo, & H. Almeida (Hrsg.), *Current Applications of Pharmaceutical Biotechnology* (Bd. 171, S. 87–113). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2019_105
- Singer, A. J., & Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine*, *341*(10), 738–746. <https://doi.org/NEJM199909023411006>
- Singh, S., Anshita, D., & Ravichandiran, V. (2021). MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *International Immunopharmacology*, *101*, 107598. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>
- Singh, S., Young, A., & McNaught, C.-E. (2017). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, *35*(9), 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.004>

- Soundararajan, M., & Kannan, S. (2018). Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9099–9109. <https://doi.org/10.1002/jcp.26860>
- Stears, R. L., Martinsky, T., & Schena, M. (2003). Trends in microarray analysis. *Nature Medicine*, 9(1), 140–145. <https://doi.org/10.1038/nm0103-140>
- Steinberg, J. P., Hong, S. J., Geringer, M. R., Galiano, R. D., & Mustoe, T. A. (2012). Equivalent Effects of Topically-Delivered Adipose-Derived Stem Cells and Dermal Fibroblasts in the Ischemic Rabbit Ear Model for Chronic Wounds. *Aesthetic Surgery Journal*, 32(4), 504–519. <https://doi.org/10.1177/1090820X12442679>
- Stephens, D. J., & Allan, V. J. (2003). Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science*, 300(5616), 82–86. <https://doi.org/10.1126/science.1082160>
- Stephens, P., & Thomas, D. W. (2002). The cellular proliferative phase of the wound repair process. *Journal of Wound Care*, 11(7), 253–261. <https://doi.org/10.12968/jowc.2002.11.7.26421>
- Su, Y., & Richmond, A. (2015). Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. *Advances in Wound Care*, 4(11), 631–640. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0559>
- Sutandy, F. X. R., Qian, J., Chen, C., & Zhu, H. (2013). Overview of Protein Microarrays. *Current Protocols in Protein Science*, 72(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2701s72>
- Thorin, E. (1998). Heterogeneity of Vascular Endothelial Cells in Normal and Disease States. *Pharmacology & Therapeutics*, 78(3), 155–166. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00005-9)
- Tilgen, W., & Eming, S. (2007). Modernes Wundmanagement. *Der Hautarzt*, 58(11), 937–938. <https://doi.org/10.1007/s00105-007-1431-9>
- Toews, G. B. (2001). Cytokines and the lung. *European Respiratory Journal*, 18(1), 3–17. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.00266001>
- Tonnesen, M. G., Feng, X., & Clark, R. A. F. (2000). Angiogenesis in Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5(1), 40–46. <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x>
- Tsourdi, E., Barthel, A., Rietzsch, H., Reichel, A., & Bornstein, S. R. (2013). Current Aspects in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Wounds in Diabetes Mellitus. *Bio-Med Research International*, 2013, 385641. <https://doi.org/10.1155/2013/385641>
- Turkmen, A., Graham, K., & McGrouther, D. A. (2010). Therapeutic applications of the larvae for wound debridement. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 63(1), 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2008.08.070>

- Van Dijk, C. G. M., Nieuweboer, F. E., Pei, J. Y., Xu, Y. J., Burgisser, P., Van Mulligen, E., El Azzouzi, H., Duncker, D. J., Verhaar, M. C., & Cheng, C. (2015). The complex mural cell: Pericyte function in health and disease. *International Journal of Cardiology*, *190*, 75–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.03.258>
- Van Pham, P., Vu, N. B., & Phan, N. K. (2016). Hypoxia promotes adipose-derived stem cell proliferation via VEGF. *Biomedical Research and Therapy*, *3*(1), 4. <https://doi.org/10.7603/s40730-016-0004-x>
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*, *37*(5), 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Vyas, B., Ishikawa, K., Duflo, S., Chen, X., & Thibeault, S. L. (2011). Inhibitory effects of HGF and IL-6 on TGF- β 1 mediated vocal fibroblast-myofibroblast differentiation. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, *119*(5), 350–357. <https://doi.org/10.1177/000348941011900513>
- Wang, Z., Feng, C., Liu, H., Meng, T., Huang, W., Long, X., & Wang, X. (2021). Hypoxic Pre-treatment of Adipose-Derived Stem Cells Accelerates Diabetic Wound Healing via circ-Gcap14 and HIF-1 α /VEGF Mediated Angiopoiesis. *International Journal of Stem Cells*, *14*(4), 447–454. <https://doi.org/10.15283/ijsc21050>
- Wang, Z., & Shi, C. (2020). Cellular senescence is a promising target for chronic wounds: A comprehensive review. *Burns & Trauma*, *8*, tkaa021. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkaa021>
- Wei, X., Li, M., Zheng, Z., Ma, J., Gao, Y., Chen, L., Peng, Y., Yu, S., & Yang, L. (2022). Senescence in chronic wounds and potential targeted therapies. *Burns & Trauma*, *10*, tkab045. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkab045>
- Wetzler, C., Kämpfer, H., Stallmeyer, B., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2000). Large and Sustained Induction of Chemokines during Impaired Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse: Prolonged Persistence of Neutrophils and Macrophages during the Late Phase of Repair. *Journal of Investigative Dermatology*, *115*(2), 245–253. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00029.x>
- Wicke, C., Bachinger, A., Coerper, S., Beckert, S., Witte, M. B., & Königsrainer, A. (2009). Aging influences wound healing in patients with chronic lower extremity wounds treated in a specialized wound care center. *Wound Repair and Regeneration*, *17*(1), 25–33. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00438.x>
- Widgerow, A. D. (2014). Ischemia-Reperfusion Injury: Influencing the Microcirculatory and Cellular Environment. *Annals of Plastic Surgery*, *72*(2), 253–260. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e31825c089c>

- Wiegand, C., Schönfelder, U., Abel, M., Ruth, P., Kaatz, M., & Hipler, U.-C. (2010). Protease and pro-inflammatory cytokine concentrations are elevated in chronic compared to acute wounds and can be modulated by collagen type I in vitro. *Archives of Dermatological Research*, 302(6), 419–428. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-1011-1>
- Wilgus, T. A., Roy, S., & McDaniel, J. C. (2013). Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in Wound Care*, 2(7), 379–388. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0383>
- Witte, M. B., & Barbul, A. (1997). GENERAL PRINCIPLES OF WOUND HEALING. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 509–528. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70566-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70566-1)
- Wong, D. E., Banyard, D. A., Santos, P. J. F., Sayadi, L. R., Evans, G. R. D., & Widgerow, A. D. (2019). Adipose-derived stem cell extracellular vesicles: A systematic review☆. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 72(7), 1207–1218. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2019.03.008>
- Wu, S.-H., Yu, J.-H., Liao, Y.-T., Liu, K.-H., Chiang, E.-R., Chang, M.-C., & Wang, J. (2022). Comparison of the Infant and Adult Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Proliferation, Senescence, Anti-oxidative Ability and Differentiation Potential. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 19(3), 589–601. <https://doi.org/10.1007/s13770-022-00431-x>
- Wu, X., Zhu, H., Xu, Y., Kong, B., & Tan, Q. (2023). Chronic wounds: Pathological characteristics and their stem cell-based therapies. *Engineered Regeneration*, 4(1), 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.11.004>
- Wu, Y.-Y., Jiao, Y.-P., Xiao, L.-L., Li, M.-M., Liu, H.-W., Li, S.-H., Liao, X., Chen, Y.-T., Li, J.-X., & Zhang, Y. (2018). Experimental Study on Effects of Adipose-Derived Stem Cell-Seeded Silk Fibroin Chitosan Film on Wound Healing of a Diabetic Rat Model. *Annals of Plastic Surgery*, 80(5), 572–580. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000001355>
- Xue, M., & Jackson, C. J. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, 4(3), 119–136. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>
- Yadav, A., Saini, V., & Arora, S. (2010). MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clinica Chimica Acta*, 411(21–22), 1570–1579. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.07.006>
- Yager, D. R., & Nwomeh, B. C. (1999). The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 7(6), 433–441. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1999.00433.x>
- Yamamoto, Y., Fujita, M., Tanaka, Y., Kojima, I., Kanatani, Y., Ishihara, M., & Tachibana, S. (2013). Low Oxygen Tension Enhances Proliferation and Maintains Stemness of

- Adipose Tissue–Derived Stromal Cells. *BioResearch Open Access*, 2(3), 199–205.
<https://doi.org/10.1089/biores.2013.0004>
- Ye, C. J., Sharpe, Z., Alemara, S., Mackenzie, S., Liu, G., Abdallah, B., Horne, S., Regan, S., & Heng, H. H. (2019). Micronuclei and Genome Chaos: Changing the System Inheritance. *Genes*, 10(5), 366. <https://doi.org/10.3390/genes10050366>
- Young, A., & McNaught, C.-E. (2011). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 29(10), 475–479. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.06.011>
- Zhang, Y., Bai, X., Shen, K., Luo, L., Zhao, M., Xu, C., Jia, Y., Xiao, D., Li, Y., Gao, X., Tian, C., Wang, Y., & Hu, D. (2022). Exosomes Derived from Adipose Mesenchymal Stem Cells Promote Diabetic Chronic Wound Healing through SIRT3/SOD2. *Cells*, 11(16), 2568. <https://doi.org/10.3390/cells11162568>
- Zhang, Z.-S., Zhou, H.-N., He, S.-S., Xue, M.-Y., Li, T., & Liu, L.-M. (2020). Research advances in pericyte function and their roles in diseases. *Chinese Journal of Traumatology*, 23(2), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.cjte.2020.02.006>
- Zhao, G., Usui, M. L., Lippman, S. I., James, G. A., Stewart, P. S., Fleckman, P., & Olerud, J. E. (2013). Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 2(7), 389–399. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0381>
- Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., & Xue, M. (2016). Inflammation in Chronic Wounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2085. <https://doi.org/10.3390/ijms17122085>
- Zhou, B.-R., Xu, Y., Guo, S.-L., Xu, Y., Wang, Y., Zhu, F., Permatasari, F., Wu, D., Yin, Z.-Q., & Luo, D. (2013). The Effect of Conditioned Media of Adipose-Derived Stem Cells on Wound Healing after Ablative Fractional Carbon Dioxide Laser Resurfacing. *Bio-Med Research International*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/519126>
- Zitelli, J. A. (1984). Secondary Intention Healing: An Alternative to Surgical Repair. *Clinics in Dermatology*, 2(3), 92–106. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(84\)90031-2](https://doi.org/10.1016/0738-081X(84)90031-2)
- Zito, G., Miceli, V., Carcione, C., Busà, R., Bulati, M., Gallo, A., Iannolo, G., Pagano, D., & Conaldi, P. G. (2022). Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Pre-Conditioning Inhibits Inflammation and Apoptosis of Immune and Parenchymal Cells in an In Vitro Model of Liver Ischemia/Reperfusion. *Cells*, 11(4), 709. <https://doi.org/10.3390/cells11040709>
- Zou, M., Liu, S., Sun, Z., Wu, J., Yuan, Z., Teng, Y., Feng, Y., & Yuan, F. (2021). Insights into the role of adipose-derived stem cells: Wound healing and clinical regenerative potential. *Journal of Cellular Physiology*, 236(4), 2290–2297. <https://doi.org/10.1002/jcp.30019>

6.2 Zusätzliche Dokumente

AWMF S1 Leitlinie: Querschnittsspezifische Dekubitusbehandlung und -prävention; <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/179-008>, abgerufen 03.05.2023

AWMF S3 Leitlinie: Lokalthherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronisch venöse Insuffizienz; <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/091-001>; abgerufen 03.05.2023

Bund-Länder Demografie Portal, <https://www.demografie-portal.de/DE/Fakten/aeltere-bevoelkerung.html>, abgerufen 02.05.2023

Gelbe Liste, <https://www.gelbe-liste.de/neue-medikamente/obnitix>, abgerufen 03.05.2023

Medac, <https://www.medac.de/news/detail-view/news/pressemitteilung-31/>, abgerufen 23.11.2023

Paul-Ehrlich-Institut; <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/atmp/tep/tep-node.html>, abgerufen 03.05.2023; https://www.pei.de/SharedDocs/schulungsmaterial/Alofisel-Schulungsmaterial-Aerzte_Version-1.0_Anwendungsanleitung.pdf?__blob=publicationFile&v=3, abgerufen 23.11.2023

Takeda; <https://www.takeda-gastroenterologie.de/perianale-fisteln-bei-mc/therapie/anwendung-von-alofisel>, abgerufen 23.11.2023

7 Anhang

7.1 Publikationen

Bachmann S., Bubel M., Jennewein M., Guthörl S., Pohlemann T., Oberringer M. (2017).

Characteristics of adipose derived stem cells and dermal microvascular endothelial cells in a co-culture assay related to soft tissue repair, 21. *Chirurgische Forschungstage Köln, European Surgical Research 58*: 310

Oberringer M., Jennewein M., Guthörl S., Bubel M., Morsch T., Bachmann S., Metzger W., Pohlemann T. (2017). Ein neues 3D-in-vitro-Modell zur Untersuchung der Funktion adipöser Stammzellen bei der Weichgewebereparatur, *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie Berlin 10/2017; German Medical Science GMS*; doi: 10.3205/17dkou591

Oberringer M., Bubel M., Jennewein M., Guthörl S., Morsch T., Bachmann S., Metzger W., Pohlemann T. (2018). The role of adipose-derived stem cells in a self-organizing 3D model with regard to human soft tissue healing, *Molecular and Cellular Biochemistry 445* (1-2), 195-210, doi: 10.1007/s11010-017-3265-9

Bachmann S., Jennewein M., Bubel M., Guthörl S., Pohlemann T., Oberringer M. (2020). Interacting adipose-derived stem cells and microvascular endothelial cells provide a beneficial milieu for soft tissue healing, *Molecular Biology Reports 47*, 111-122, doi: 10.1007/s11033-019-05112-y

7.2 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. T. Pohlemann bedanken. Ich danke ihm insbesondere für die Ermöglichung der Nutzung der Räumlichkeiten und der Gerätschaften des Molekular- und Zellbiologischen Forschungslabors der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, die mir die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. (apl.) Dr. rer. nat. M. Oberringer. Er führte mich kompetent und strukturiert an die Thematik der Arbeit heran und vermittelte mir forschungsorientiertes wissenschaftliches Arbeiten. Er stand mir bei Fragen zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite und gab mir wertvolle Anregungen.

Weiterhin möchte ich meinen Dank an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Molekular- und Zellbiologischen Forschungslabors richten, insbesondere an Frau M. Jennewein, Frau M. Bubl und an Frau S. Guthörl. Sie unterstützten mich bei der praktischen Einarbeitung und gaben mir darüber hinaus, wann immer ich Hilfe brauchte, wertvolle Ratschläge.

Abschließend bedanke ich mich bei all jenen, die mich während der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben. Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Partner und meiner Familie. Sie verliehen mir den Ansporn, den ich benötigte, um diese Arbeit fertigzustellen und leisteten stets moralische Unterstützung.

.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.