

Diplomarbeit

Stammzellen in der Wundheilung

eingereicht von

Jakob Michael Fuchs

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Klinische Abteilung für Plastische, Ästhetische und
Rekonstruktive Chirurgie**

unter der Anleitung von

Univ. Ass. Dr. med. univ. Daryousch Parvizi

u.

Univ. Prof. Dr. med. univ. Lars-Peter Kamolz, MSc.

Graz, am 14.02.2016

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 14.02.2016

Jakob Fuchs eh

IN MEMORIAM

Dr. med. univ. Günther Schetelig
1985 - 2014

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Univ. Ass. Dr. med. univ. Daryousch Parvizi und Herrn Univ. Prof. Dr. med. univ. Lars-Peter Kamolz, MSc für die Betreuung meiner Diplomarbeit danken. Sie haben mich an die Thematik herangeführt und den Tierversuch und damit meine Arbeit erst ermöglicht.

Weiters danke ich Frau ao. Univ. Prof.ⁱⁿ Mag.^a Dr.ⁱⁿ rer. nat. Ingrid Lang-Olip und ihren Mitarbeitern für die Unterstützung bei der histologischen Ausarbeitung des Versuchs.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen Frau Melanie Pichlsberger und Herrn Alexandru Tuca für die produktive Zusammenarbeit während des gesamten Tierversuches.

Ein Dankeschön gilt auch meinen Freunden, die dazu beigetragen haben meine Studienzeit zu einem unvergesslichen Abschnitt meines Lebens zu machen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, die mir mein Studium erst ermöglichten und mich während meines gesamten Werdegangs stets mit großem Interesse begleitet haben.

Auch Martina und ihrer Familie möchte ich von ganzem Herzen danken, dass sie mich vor allem in den oft turbulenten Phasen meines Studienabschlusses stets verständnisvoll unterstützt haben.

Index

Danksagung	IV
Index	V
Glossar und Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung.....	ii
Abstract.....	iv
1 Einführung.....	1
1.1 Wundheilung	3
1.2 Angiogenese	9
1.3 Stammzellen – Mesenchymale Stammzellen.....	10
1.4 Studienziel.....	12
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Studiendesign	14
2.2 Versuchstiere	20
2.3 Im Wundareal applizierte Zelltypen	21
2.4 Weitere im Versuch verwendete Materialien	23
2.5 Auswertung der Versuche	24
3 Ergebnisse	31
3.1 Vorversuch	31
3.2 Hauptversuche	33
4 Diskussion	51
5 Schlussfolgerung.....	57
Referenzen.....	58

Glossar und Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
AMSC	Amnion derived MSC
Anm.	Anmerkung
AT-MSC	Adipose tissue derived MSC
AZ	Allgemeinzustand
BGW	Bindegewebe
BM	Knochenmark (engl.: bone marrow)
bzw.	beziehungsweise
ECM	Extrazellulärmatrix (engl.: extra cellular matrix)
EGM	endothelial cell growth medium
EtOH	Ethylalkohol (Ethanol)
FDGF	fibroblast derived growth factor
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
GF	Wachstumsfaktoren (engl.: growth factors)
h	human (wenn als Präfix verwendet)
H.E.	Hämatoxylin Eosin
IHC	Immunhistochemie
MD	MatriDerm®
MG	Matrigel
MSC	mesenchymale Stammzelle
MT	Masson(-Goldner)-Trichrom
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung(engl.:phosphate buffered saline)
PDGF	platelet derived growth factor
PLAEC	plazentare Endothelzellen
PLGF	placenta growth factor
smA	smooth muscle actin
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
u.ä.	und ähnliche(s)
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
WJ-MSC	wharton's jelly MSC

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der Hautschichten	4
Abb. 2: Die klassischen Stadien der Wundheilung	7
Abb. 3: Eindeutige Identifizierung der Tiere durch unterschiedliche Farbe und Anzahl der Markierungen	14
Abb. 4: Rechteckiger Schnitt zur Entnahme der Biopsie // Schnellfixierung der Biopsien	26
Abb. 5: Schema der mit AMSC38 behandelten Mäuse	34
Abb. 6: Mäuse nach 4 Tagen, repräsentative Beispiele;	35
Abb. 7: Wunden nach 4 Tagen, mit Matrigel behandelt;.....	36
Abb. 8: Wunden nach 4 Tagen, mit MatriDerm® behandelt;	36
Abb. 9: Tag 8, Wunden mit MatriDerm® behandelt; Auswahl repräsentativer Tiere;	37
Abb. 10: Matrigel, HE-Färbung; Markierung: 100µm;	39
Abb. 11: MatriDerm®, HE-Färbung; Markierung: 100µm;	41
Abb. 12: Matrigel mit AMSC, Vimentin// CD31; Markierung: 100µm	43
Abb. 13: MatriDerm® mit AMSC, Vimentin // CD31; Markierung: 100µm	44
Abb. 14: MatriDerm®, CD45; Markierung: 100µm.....	45
Abb. 15: Matrigel leer / MatriDerm® leer, CD31; Markierung: 100µm	46
Abb. 16: Wunden mit Unterschiedlicher Behandlung im direkten Vergleich; Markierung: 100µm	47
Abb. 17: MatriDerm® mit AMSC // AMSC+EC; CD31; Markierung: 100µm	49
Abb. 18: MatriDerm® mit AMSC, nach 8 Tagen; MT-Färbung; Markierung: 100µm	50

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht Vorversuch	16
Tab. 2: Übersicht Versuch I	17
Tab. 3: Übersicht Versuch II	18
Tab. 4: Übersicht Versuch III	19
Tab. 5: Übersicht über die in den Versuchen verwendeten Zellen	20
Tab. 6: H.E. Färbeprotokoll für Paraffinschnitte	28
Tab. 7: MT Färbeprotokoll für Paraffinschnitte	29
Tab. 8: Übersicht verwendeter AK für IHC	30

Zusammenfassung

Einleitung:

Die Haut als größtes Organ des Menschen erfüllt nicht nur Barriere- sondern auch wichtige Schutzfunktion. Im Laufe des Lebens kommt es durch Unfälle oder Krankheiten zu zahlreichen Verletzungen der äußeren Körperhülle. Daher ist der komplexe und fein abgestimmte Vorgang der Wundheilung essentiell für die Aufrechterhaltung der Integrität.

Durchläuft eine Wunde verzögert oder nur unvollständig die Phasen der Wundheilung, kommt es zum Auftreten einer Wundheilungsstörung bzw. zur Entwicklung einer chronischen Wunde.

Die Behandlung solcher Wunden stellt im klinischen Alltag oft eine Hürde dar.

Daher ist jede Verbesserung in der Versorgung von Wunden anzustreben.

Stammzell-basierte Therapien scheinen ein vielversprechender Ansatz in der Zukunft der modernen Medizin zu sein.

Dabei werden für mesenchymale Stammzellen (MSC) in der aktuellen Forschung zahlreiche Anwendungsgebiete beschrieben.

Material und Methoden:

Um diese für den Prozess der Wundheilung postulierten Effekte zu untersuchen wurde ein Tierversuch an immundefizienten Nacktmäusen durchgeführt.

Im Rahmen des Versuches wurden aus unterschiedlichen Orten des extraembryonalen Gewebes isolierte Stammzellen lokal in Wunden appliziert.

Die mesenchymalen Stammzellen wurden entweder in Matrigel suspendiert oder auf MatriDerm® (eine bovine Kollagenmatrix) aufgetropft und in Stanzen am Rücken der Tiere eingebracht. Bei einigen Tieren wurden die MSC mit Endothelzellen kombiniert, um eine mögliche Progression des postulierten proangiogenetischen Potentials zu erzielen

Ergebnisse:

Am Ende des Versuchs wurden die Wunden makroskopisch beurteilt und mikroskopisch ausgewertet. Beurteilungskriterien waren der Grad der Epithelialisierung sowie stattgehabte (Neo-)Angiogenese im Stanzbereich.

Zur mikroskopischen Auswertung wurde eine HE- sowie eine Mason-Goldner-Trichrom Färbung durchgeführt. Für eine immunhistochemische Auswertung kamen Vimentin, smA, CD31 und CD45 zum Einsatz.

Schlussfolgerung:

Bei den mit MSC behandelten Wunden zeigte sich ein deutlich dichteres Netz an Gefäßen, die bis an die Oberfläche reichten. Auch waren in den neu entstandenen Kapillaren Erythrozyten sichtbar. Hinsichtlich der Epithelbildung konnte für die mit MSC behandelten Wunden keine Verbesserung festgestellt werden. Auch die Kombination mit Endothelzellen zeigte im Vergleich zur alleinigen Gabe der mesenchymalen Stammzellen keine verbesserte Angiogenese.

Die Ergebnisse aus dem Tierversuch stellen einen weiteren Schritt für die Entwicklung stammzell-basierter Therapien in der Wundheilung dar.

Abstract

Introduction:

The skin as the largest human organ not only serves as a barrier but also has an important protecting function. Throughout life this outer body shell is harmed numerous times through accidents or illness. Thus the complex and finely tuned process of wound healing is essential for maintaining integrity.

When the phases of wound healing are delayed or passed through only incompletely, the healing process is disturbed or disrupted, or a chronic wound develops.

The treatment of such wounds presents a major obstacle in the clinical routine.

Thus any improvement in the handling of wounds needs to be pursued.

Stem cell based therapies seem to be a promising approach in the future of modern medical science.

In this context numerous applications for mesenchymal stem cells (MSC) are described in the current research.

Materials and methods:

In order to examine the effects postulated for the process of wound healing, an animal experiment was performed on immune-deficient nude mice.

In this experiment stem cells isolated from divers locations in extraembryonal tissues were applied locally into the wounds.

The mesenchymal stem cells were either suspended in Matrigel or dripped on MatriDerm® (a bovine collagen matrix) and subsequently applied in punch-cuts to the back of the animals. In some of the animals the mesenchymal stem cells were combined with endothelial cells, in order to obtain a possible progression of the postulated proangiogenic potential.

Results:

Upon completing the experiment the wounds were assessed macroscopically and microscopically evaluated. Assessment criteria were the level of epithelialisation as well as a (neo-) angiogenesis in the cutting area.

For microscopic evaluation an HE- as well as a Mason-Goldner-Trichrom staining were performed. For the immunohistochemical evaluation Vimentin, smA, CD31 and CD45 were used.

Conclusion:

The wounds treated with MSC showed a clearly more dense network of vessels up to the surface. In addition erythrocytes were visible in the newly developed capillaries. Concerning the development of epithelium no improvement showed in wounds treated with MSC. When combined with endothelial cells the angiogenesis showed no improvement as compared to sole administration of mesenchymal stem cells.

The results of the animal experiment represent one step further in the development of stem cell-based therapies in wound healing.

1 Einführung

Rasche und komplikationsarme Wundheilung, verminderte Narbenbildung und ein dadurch verbessertes Outcome für den Patienten nach akuten Verletzungen oder bei chronischen Wunden sind wesentliche Ziele in der modernen Medizin. Reparations- und Regenerationsprozesse finden in fast allen Geweben des menschlichen Körpers statt.

Diese Arbeit beschäftigt sich jedoch im speziellen mit der Heilung der Haut, genauer definiert mit der Heilung von Wunden die Epidermis und die Dermis betreffend (und teilweise bis an die Subcutis reichend).

Da die Haut das größte Organ des Menschen darstellt und sowohl eine Schutz- als auch Barrierefunktion besitzt, ist die Wahrscheinlichkeit von Verletzungen hoch. (1) Die Ursachen für Läsionen können akute Verletzungen im Rahmen von Unfällen (z.B. Schnitt-, Brandverletzungen und ähnliches), ein Zustand nach Operationen, Störungen der Integrität der Haut im Rahmen pathologischer Durchblutungssituationen (periphere arterielle Verschlusskrankheit, venöse Insuffizienz) oder Infektionen und systemischen Erkrankungen (zum Bsp. Diabetes mellitus) sein. (2)(3)

Der Heilungsprozess ist ein fein abgestimmter und komplexer Prozess der sowohl auf biologischer als auch auf molekularer Ebene abläuft. (4) Unabhängig von der Genese findet die physiologische Wundheilung in mehreren zeitlich geordneten, teilweise überlappenden Phasen statt. (5) Dabei findet man in der Literatur je nach Quelle 3 bis 5 Phasen beschrieben. Vergleiche hierzu „Chirurgie; Henne-Bruns, D. et al., 2012; (6) und „Praxis der plastischen Chirurgie; Vogt, 2011“ (3). Dieser Umstand ist zum einen der Tatsache geschuldet, dass es Ansichtssache ist ob man die Phase der Hämostase bereits als Teil der eigentlichen Wundheilung betrachtet oder nicht, und zum Weiteren kann die inflammatorische Phase in eine exsudative und eine resorptive Phase unterteilt werden.

Ziel des gesamten Prozesses, der begleitet und gesteuert von zahlreichen Interaktionen verschiedenster Zelltypen, der Extrazellulärmatrix und teilweise zytokinaktivierten molekularen Transmittern stattfindet, ist der Wiederverschluss des Integuments und damit verbunden einer Wiederherstellung der Funktion.

Ein Problem tritt auf, wenn eine Wunde (oder Verletzung) diese Phasen nicht oder nicht vollständig durchläuft, und daher nicht zu vollständiger anatomischer und funktioneller Wiederherstellung gelangt.

Wunden die nicht in einer gewissen Zeitspanne vollständig epithelialisieren und sich verschließen werden als chronische Wunden bezeichnet. In den meisten Fällen wird diese Zeitspanne mit etwa 30 Tagen, in einigen Ausnahmen mit bis zu 3 Monaten beschrieben. Derartige Wunden stellen im klinischen Alltag im Wundmanagement eine komplexe Herausforderung dar und belasten auch oft nicht unerheblich das Gesundheitssystem. Für den Patienten gehen chronische Wunden und die Behandlung solcher oft mit ernst zu nehmenden psychischen und physischen Belastungen und Problemen einher. (3)

Ein zentraler Faktor in der Pathogenese der chronischen Wunden ist die Gewebeischämie bzw. die Gewebehypoxie. Beides ist assoziiert mit einer arteriellen Minderdurchblutung. Diese Mangeldurchblutung verlangsamt durch die verminderte Versorgung nicht nur den Wundheilungsprozess, es besteht bei schlecht durchblutetem Wundgrund auch ein deutlich erhöhtes Infektrisiko.

Darauf begründet sich die Annahme, dass durch die Förderung der lokalen Durchblutung, durch verstärkte Angiogenese bzw. den Erhalt und die Stabilisierung der noch vorhandenen Gefäße, eine wesentliche Behandlungsverbesserung von schwer heilenden bzw. chronischen Wunden erreicht werden kann.

Wie in den Studien von Tam et al., 2014, „A Nanoscaffold Impregnated With Human Wharton's Jelly Stem Cells or Its Secretion Improves Healing of Wounds“ (2), Fong et al. 2014, „Human Wharton's Stem Cells and Its Conditioned Medium Enhance Healing of Excisional and Diabetic Wounds“ (1) oder auch Edwards et al. 2014, „Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration“ (7) postuliert, besitzen mesenchymale Stammzellen(MSC) die Potenz, die Wundheilung durch Förderung der erwähnten Faktoren zu begünstigen.

1.1 Wundheilung

Jede Zerstörung oder Kontinuitätsunterbrechung eines Gewebes kann im weitesten Sinne als Wunde verstanden werden und zwar unabhängig von der Ursache der Läsion.

Dieser pathologische Zustand bringt meist einen mehr oder weniger ausgeprägten Substanzverlust und eine Funktionseinschränkung mit sich. Das Bestreben jedes Organismus ist die schnellstmögliche Heilung, also der Verschluss des Defektes und die Wiederherstellung der Funktion des betroffenen Bereiches. Dabei ist die eigentliche Wundheilung als Defektverschluss durch vernarbendes Bindegewebe und die Epithelregeneration definiert. Dazu bedient sich der menschliche Körper zwei unterschiedlicher Mechanismen: der Regeneration und der Reparation.

Bei der Regeneration kommt es zu gewebespezifischem Ersatz, bei der Reparation hingegen zu einem Ersatz des fehlenden oder defekten Gewebes mit unspezifischem Binde- oder Stützgewebe. Hierbei ist anzumerken, dass die Knochenheilung eine Sonderstellung einnimmt, da zunächst eine Reparation stattfindet und anschließend ein Umbau in spezifisches Knochengewebe. (6) Heilung und Regeneration findet in fast allen Geweben des menschlichen Körpers statt. Für diese Arbeit liegt der Fokus im Speziellen auf der Reparation und Regeneration der Haut.

Die Haut als das größte Organ des Menschen hat vielfältige Funktionen, ist ständig Belastungen ausgesetzt und häufig von Verletzungen betroffen. Aufgrund der breitgefächerten Aufgaben und des dafür erforderlichen regelrechten Aufbaus der Haut ist ein exakt und zeitlich geordneter Ablauf der Heilung wesentlich. Je nach Literatur wird die Wundheilung in 3 bis 5 Phasen unterteilt. Dabei ist festzustellen, dass die Abläufe und Vorgänge im Wesentlichen identisch beschrieben sind, lediglich die Bezeichnung und die Gliederung variieren.

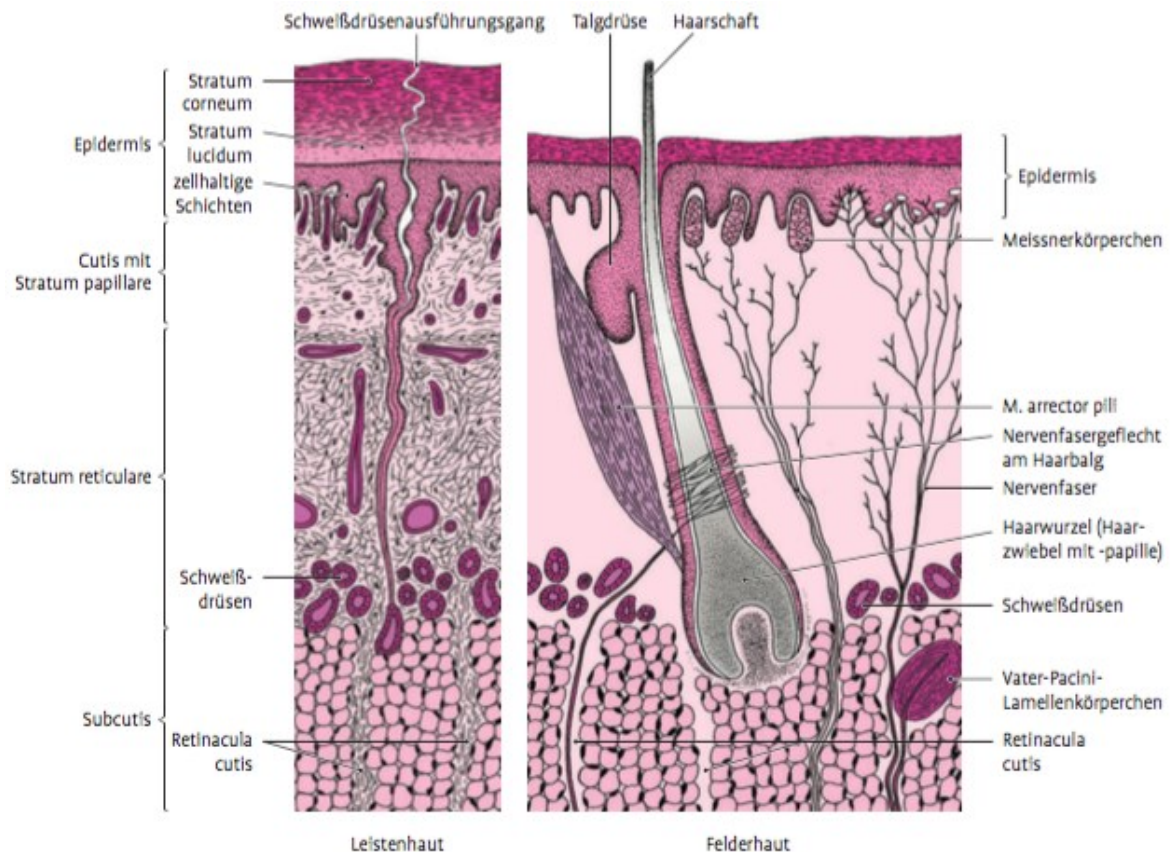


Abb. 1: Schema der Hautschichten
Abbildung unverändert entnommen aus (8)

1.1.1 Physiologische Wundheilung

Die Haut bedeckt unsere gesamte Körperoberfläche und hat sowohl eine Barriere- als auch Schutzfunktion. Der Umstand, dass sie daher im Alltag zahlreichen Belastungen ausgesetzt ist, bringt häufige Verletzungen mit sich. Deshalb ist die Fähigkeit einer raschen Reparatur und Regeneration von lebensnotwendiger Bedeutung. (9) Wie bereits beschrieben, wird die Wundheilung in mehrere zeitlich geordnete und teilweise überlappende Phasen unterteilt. Jede dieser Phasen ist durch charakteristische molekulare, zelluläre und physiologische Abläufe gekennzeichnet, die größtenteils durch das Zusammenspiel und die Kommunikation von hämatopoetischen, immunologischen und lokalen (Haut)Zellen gesteuert werden. (10) Eine detaillierte Beschreibung dieser komplexen Vorgänge findet sich in der Arbeit von Gurtner et al., 2008, „Wound repair and regeneration.“ (11)

1.1.1.1 Hämostase / Inflammatorische Phase

Der Beginn der Wundheilung dient sowohl der Reinigung der Wunde, dem provisorischen Verschluss der verletzten Gefäße, als auch dem Auffüllen des Defekts mit einer temporären Matrix, dem Wundthrombus. Charakteristisch für diesen Abschnitt der Wundheilung ist die lokale Entzündungsreaktion mit Rötung und Schwellung.

Unmittelbar nach Verletzung sorgen die austretende Lymphe und das ausfließende Blut für eine erste Ausschwemmung von Mikroorganismen und Schmutz. Anschließend kommt es zu einer Vasokonstriktion die etwa 5 bis 10 Minuten anhält. (5) Dies dient dazu den Blut- (bzw. Flüssigkeits-)verlust möglichst gering zu halten und eine Adhäsion und Aggregation der aktivierten Thrombozyten zu ermöglichen. Dabei kommt es letztlich zur Bildung eines Fibrinthrombus, der die Läsion sowohl mechanisch schützt als auch den einwandernden Zellen als Matrix dient. Nach der initialen Vasokonstriktion kommt es nunmehr zu einer Vasodilatation mit Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Es kommt zur chemotaktisch getriggerten Einwanderung von Leukozyten (v.a. neutrophile Granulozyten und Monozyten), Keratinozyten und Endothelzellen. Weiters finden sich im Wundgebiet Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, die intrazelluläre Signalkaskaden initiieren. So kommt es unter der Wirkung vor allem von FGF und PDGF („fibroblast“ und „platelet-derived growth factor“) zur Aktivierung der Bindegewebssynthese. (4)

Die eingewanderten Monozyten differenzieren im Wundareal zu Makrophagen und phagozytieren den anfallenden Zelldetritus und vorhandene Pathogene. Gleichzeitig sezernieren sie weitere Wachstumsfaktoren (GF – growth factors) Chemokine und Zytokine. Diese Botenstoffe dienen nicht nur der Aufrechterhaltung des Fortschritts des aktuellen Heilungsprozesses sondern leiten auch den nächsten Schritt der Wundheilung ein. (5)(11)

1.1.1.2 Proliferative Phase

Die zentralen Prozesse in der proliferativen Phase sind die definitive Bedeckung des Wundgrundes, die Formierung von Granulationsgewebe und die

Wiederherstellung des vaskulären Netzwerkes. Sehr wesentlich ist dabei die Neoangiogenese bzw. Neovaskularisation, da die Mikrozirkulation im Wundgebiet die essentielle Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherstellt und dadurch eine Heilung erst möglich macht. (4)

Die angesprochenen Prozesse laufen üblicherweise in den Tagen 2-10 nach Verletzung ab.

Dabei kommt es zunächst zur Migration von Keratinozyten im Bereich der verletzten Dermis, begleitet von der Formierung von Fibroblasten und Makrophagen entlang der während der frühen Phase der Wundheilung entstandenen Fibrinmatrix.

Mit Beginn der Neovaskularisierung und Angiogenese kommt es nach und nach zum Abbau des Fibrinthrombus und die Fibroblasten beginnen mit der Synthese von Kollagen, Fibronectin und Proteoglykanen, die zum Aufbau und zur Stabilisierung der neu entstehenden Extrazellulärmatrix (ECM – extra cellular matrix) dienen. Eine Reepithelialisierung findet vom Wundrand beginnend durch lokale Keratinozyten statt. Dieser Schritt bedeutet gleichzeitig die Wiederherstellung der Barrierefunktion der Haut.

Im späten Stadium der Proliferationsphase kommt es, durch den Stimulus von Makrophagen, zur Differenzierung einiger Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese Myofibroblasten sind kontraktile Zellen, die im späteren Verlauf dafür sorgen, dass sich die Wundränder zusammen ziehen und es so zu einem möglichst raschen Wundverschluss kommt. Gleichzeitig bilden die Myofibroblasten in Interaktion mit den Fibroblasten die definitive ECM. Diese besteht zu einem großen Teil aus Kollagenfasern, und stellt so letztlich den Hauptbestandteil der reifen Narbe dar. (11)(12)

1.1.1.3 Regenerative Phase / Remodelling

Die letzte Phase der Wundheilung beginnt etwa zwischen dem 14. und dem 21. Tag nach Verletzung. Die letztendliche Ausreifung der Narbe und somit der Abschluss der Wundheilung kann 1 bis 2 Jahre in Anspruch nehmen. (5)(11)

Im Laufe dieser Phase kommt es nach und nach zu einer Reduzierung der, während der ersten Phasen der Wundheilung, hochregulierten molekularen und

zellulären Aktivitäten im Verletzungsbereich. Dabei spielt unter anderem der sich verändernde pH-Wert eine wesentliche Rolle. (13)

Die meisten der eingewanderten Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, Myofibroblasten und weitere Endothelzellen gelangen zur Apoptose. (14)

Das reife Narbengewebe ist somit fast vollständig avaskulär und azellulär und besteht überwiegend aus Kollagen und weiteren Extrazellulärmatrix-Proteinen.

Diese zum Großteil aus Kollagen Typ-III bestehende Matrix wird im Laufe des Remodelling durch Proteinasen zu Kollagen Typ-I umgewandelt. Dies verleiht dem neu entstandenen Gewebe die notwendige Festigkeit und Widerstandsfähigkeit.

Es ist jedoch anzumerken, dass auch wenn dieser komplexe und exakt orchestrierte Prozess der Wundheilung vollständig durchlaufen wird, das regenerierte bzw. reparierte Gewebe niemals vollständig die Eigenschaften eines unverletzten Gewebes aufweist. (11)

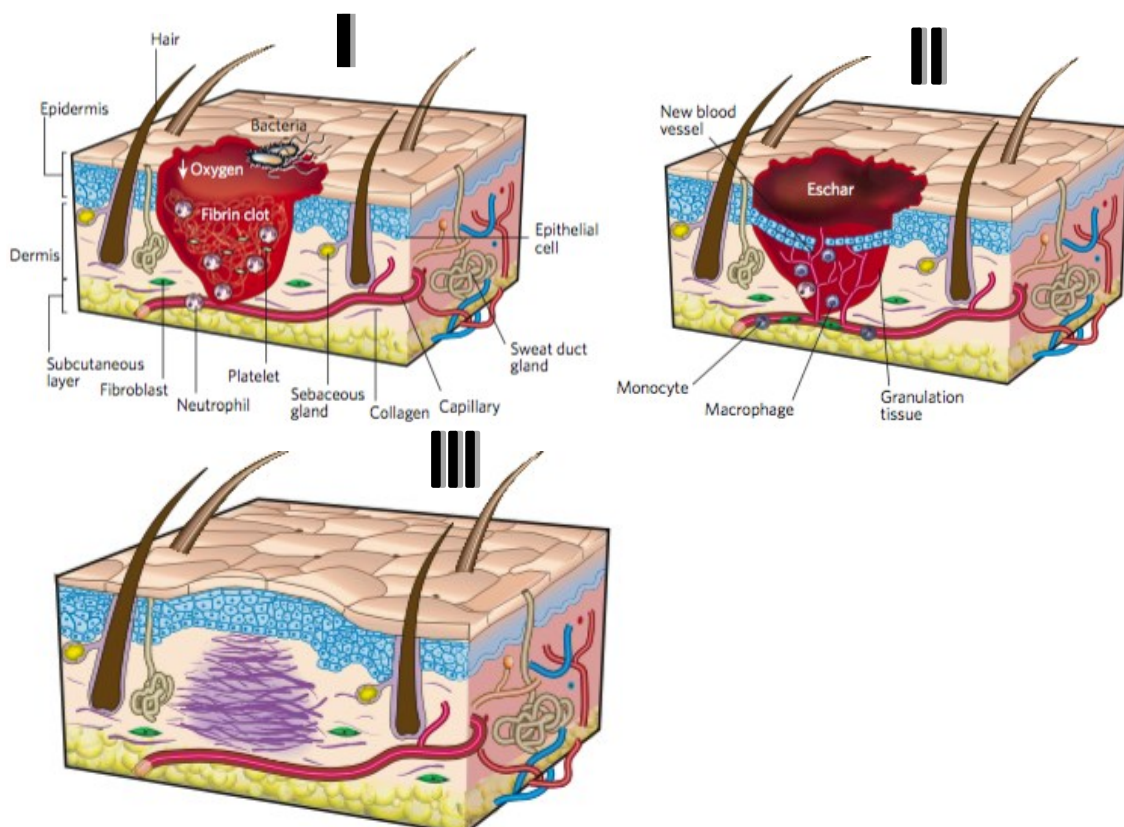


Abb. 2: Die klassischen Stadien der Wundheilung
Abbildungen leicht verändert aus (11) übernommen

1.1.2 Gestörte Wundheilung

Durchläuft eine Wunde nur unvollständig die Phasen der Wundheilung und findet nicht in entsprechender Zeit zur Abheilung, spricht man von gestörter bzw. verzögerter Wundheilung und dem Entstehen einer chronischen Wunde. Für den Zeitraum, in dem eine Wunde physiologischerweise zur Reepithelialisierung gelangt sein sollte, findet man je nach Literatur Angaben zwischen 30 Tagen und 3 Monaten. (3)(4)

Meist ist eine derartige chronische Wunde charakterisiert durch eine verlängerte inflammatorische Phase.

„Prinzipiell kann eine Stagnation in jeder Phase auftreten, meist geschieht dies jedoch in der inflammatorischen Phase. Viele Faktoren beeinträchtigen die Wundheilung und führen zur Chronifizierung einer Wunde, hierunter patientenspezifische (Begleiterkrankungen, Ernährungsstatus, Medikamente, Nikotinkonsum) sowie lokale Faktoren (Durchblutungssituation, mechanische Belastung, bakterielle Kolonisierung).“ Heinlin et al., 2010; (4)

Ursachen für eine gestörte bzw. verzögerte Wundheilung können also vielfältig sein. Eine sehr zentrale Rolle spielt die Durchblutung. Wie im Buch „Praxis der plastischen Chirurgie“ von Vogt; Berlin: Springer Medizin; 2011; erläutert wird: „Bei der Pathogenese von chronischen Wunden spielt die Gewebeischämie und -hypoxie eine entscheidende Rolle. Beide Einflussgrößen korrelieren mit der arteriellen Mangeldurchblutung. Darüber hinaus besteht bei schlecht durchblutetem Wundgrund ein deutlich höheres Infektrisiko.

Diese Faktoren haben einen negativen Einfluss auf die verschiedenen Phasen der Wundheilung und verzögern somit den Wundheilungsprozess.“ (3)

Daher scheint die Förderung der Neoangiogenese ein zentrales Ziel hinsichtlich der Optimierung und Beschleunigung der Wundheilung.

1.2 Angiogenese

Die Angiogenese, der Prozess der Bildung von feinsten Kapillaren bis hin zu größeren Blutgefäßen, ist ein streng regulierter Vorgang der sowohl in der Entwicklung, der Reproduktion als auch in der Wundheilung einen wesentlichen Anteil hat.

Durch das Zusammenspiel unterschiedlicher proangiogenetischer und antiangiogenetischer Faktoren kann die Gefäßneubildung binnen weniger Tage auf ein Maximum stimuliert werden und anschließend innerhalb kürzester Zeit wieder völlig zum Erliegen kommen. (15)

Zahlreiche Wachstumsfaktoren sind inzwischen identifiziert, für die Angiogenese verantwortlich zu sein.

So sind aktuell zwei Gruppen von Faktoren bekannt die am wesentlichsten zu einer Stimulation dieser führen: die Familie der „Vascular endothelial growth factors“ (VEGF) und die der Angiopoietine.

Zu den VEGFs zählen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E sowie der placenta growth factor (PLGF). Ihre biologische Funktion entfalten sie über die Bindung an transmembranöse Tyrosinkinase Rezeptoren, VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3.

Aus der Gruppe der Angiopoietine sind bisher vier unterschiedliche Typen bekannt. Angiopoietin-1 bis -4. Diese beeinflussen allerdings, im Gegensatz zu den VEGFs, nicht die Proliferation der Endothelzellen, sondern über ihren zugehörigen transmembranösen Tyrosinkinase Rezeptor, Tie2, die Stabilität der Blutgefäße. Interessant dabei ist, dass Angiopoietin-1 und -4 den Rezeptor aktivieren und Angiopoietin-2 und -3 ihn blockieren. So führt Angiopoietin-2 zu einer Destabilisierung und zu einem Umbau der Blutgefäße und Angiopoietin-1 zu einer Stabilisierung derer. (16)(17)

Die Gruppe der Fibroblast Growth Factors (FGFs) fungieren im Allgemeinen als Mitogene und zeigen eine zellprotektive Wirkung. Darüber hinaus wurde für die FGF-1 und -2 eine Angiogenese-stimulierende Funktion nachgewiesen. (18) Aktuell gelten VEGF-A und FGF2 mit ihren zugehörigen Rezeptoren, VEGFR-1 und -2 sowie FGFR2, als wichtigste Stimulatoren der Angiogenese in der Wundheilung. (11)(16)

1.3 Stammzellen – Mesenchymale Stammzellen

Stammzellen sind inzwischen in vielen unterschiedlichen Geweben des Körpers nachgewiesen worden, und stellen dennoch eine in ihren Merkmalen sehr homogene Zellpopulation dar.

Wesentliche gemeinsame Merkmale sind dabei: die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ein langsam laufender Zellzyklus, und ein niedriger Differenzierungsgrad, bei gleichzeitig hohem Differenzierungspotential.

Anzumerken ist, dass die Teilung der Stammzellen asymmetrisch erfolgt, d.h. die Mutterzelle behält die ursprünglichen Merkmale der Stammzelle bei, und die andere wird zur sogenannten Progenitorzelle (Vorläuferzelle). Aus dieser Tochterzelle entwickelt sich die Population, die in weiterer Folge in die verschiedenen Gewebe differenziert. (19)

Eine Einteilung der Stammzellen kann u.a. nach ihrem Potential zur Differenzierung erfolgen.

Im Stadium der Zygote finden sich die totipotenten Stammzellen. Diese besitzen die Fähigkeit, sowohl den Embryo in seiner Gesamtheit, als auch die Plazenta gemeinsam mit dem restlichen extraembryonalen Gewebe zu bilden.

Nach den ersten Teilungsstadien finden sich im Embryo die sog. embryonalen Stammzellen die als pluripotent gelten, d.h. sie bilden den Ursprung der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Entoderm) und können sich in alle daraus hervorgehenden Gewebe differenzieren.

In weiterer Folge entwickeln sich dann die als multipotent definierten Stammzellen. Zu dieser Population zählen u.a. die hämatopoetischen Stammzellen, und auch die für diese Arbeit relevanten mesenchymalen Stammzellen.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) können, wie die Bezeichnung nahe legt, zu Zellen des mesenchymalen Gewebes differenzieren. (20)

Um eine bessere Identifizierbarkeit von humanen MSC und ihre Vergleichbarkeit in Studien zu ermöglichen wurden von Dominici et al., 2006 in ihrer Arbeit „Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement“ (21) folgende Kriterien definiert die Zellen erfüllen müssen, um als mesenchymale Stroma- bzw. Stammzellen zu gelten:

- Zellen müssen unter Standard-Kultur Bedingungen plastisch und adhärent sein
- sie müssen die Oberflächenmoleküle CD105, CD73 und CD90 exprimieren, und dürfen die hämatopoetischen bzw. endothelialen Oberflächenmoleküle CD45, CD34, CD14 (oder CD11b), CD79a (oder CD19) und HLA-DR nicht exprimieren;
- MSC müssen in der Lage sein, in vitro in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren;

Erstmalig wurden MSC aus dem Knochenmark isoliert, auch wenn sie zum damaligen Zeitpunkt noch als fibroblast colony-forming units (CFU-F) definiert wurden. (22) Da diese Zellen die oben genannten Minimalkriterien erfüllten, wurden sie im Nachhinein als MSC identifiziert.

Obwohl das Knochenmark nach wie vor die klassische Quelle für Stammzellen darstellt, konnten MSC inzwischen unter anderem auch aus der Haut (23), dem Fettgewebe (24) oder dem peripheren Blut (25) isoliert werden.

Eine weitere vielversprechende Möglichkeit zur Isolierung von MSC, stellt die humane Plazenta, insbesondere auch das Amnion dar. (26)(27)(28)

Die aus der Plazenta und ihren Bestandteilen extrahierten MSC (z.B. humane amniotische mesenchymale (Stroma-)Stammzellen hAMSC) stellen aus mehrerlei Hinsicht eine vielversprechende Möglichkeit für zukünftige klinische Anwendungen dar.

Die Gewinnung ist, im Gegensatz zu den Zellen aus dem Knochenmark, nicht mit einem invasiven Eingriff verbunden. Da die Plazenta nach der Geburt üblicherweise entsorgt wird, sind die ethischen Bedenken gering, und die Verfügbarkeit beinahe unbegrenzt.

MSC werden vielfältige Fähigkeiten und Eigenschaften zugeschrieben, die aktuell Thema zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten sind.

Zum Beispiel zeigen (hA)MSC eine niedrige Immunogenität und können sowohl die Differenzierung von Monozyten zu Antigen (AG)-präsentierenden dendritischen Zellen blockieren, als auch die Proliferation von T-Lymphozyten hemmen. (29)

Eine erfolgreiche xenogene Transplantation von hAMSC konnte u.a. bereits an Mäusen (30), und neugeborenen Ratten und Schweinen (31) durchgeführt werden.

Weitere Charakteristika (und die dazugehörigen Studien) die das große Potential von MSC verdeutlichen, finden sich in Kapitel 4 der vorliegenden Arbeit.

1.4 Studienziel

Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss von Stammzellen auf die kutane Wundheilung zu betrachten. Hierzu wurde ein Versuch an Nacktmäusen in mehreren Versuchsreihen durchgeführt.

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Tierversuch wurde entsprechend der aktuell gültigen Richtlinien gemäß TVG2012, BGBl. I Nr. 114/2012, und mit Bewilligung des Bundesministeriums für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft realisiert.

Der Aufbau des Versuchs wurde in Anlehnung an bereits erfolgreich durchgeführte Projekte mit ähnlicher Fragestellung erstellt. (32)(33)(34)

Die detaillierte Durchführung wurde mittels eines Vorversuchs überprüft und anhand der daraus gewonnenen Erkenntnisse für die weiteren (Haupt-)Versuche entsprechend adaptiert und optimiert.

Sämtliche Arbeiten an den Tieren wurden unter Aufsicht von und Betreuung durch Veterinärmediziner der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

Die optimale Versorgung von Wunden und das Handling der Verbandsmaterialien gestaltet sich, trotz der bereits sehr fortschrittlichen Therapien und Techniken im klinischen Wundmanagement, oft sehr schwierig und ist für den Patienten meist mit schmerzhaften und aufwendigen Prozeduren verbunden.

Oftmals ist die Heilung nicht oder nur sehr schwer möglich und geht mit einer massiven Einschränkung der Lebensqualität des Patienten einher. (3) Jede Verbesserung der Therapie ist anzustreben. Somit auch die weitere Erforschung des Einsatzes von Stammzellen in der Wundheilung, um diese vielversprechende Therapieform klinisch anwendbar zu machen.

Einen wesentlichen Faktor für bestmögliche Wundheilung stellt, wie bereits erwähnt, eine ausreichende Neovaskularisation bzw. die Stabilisierung der vorhandenen Gefäße dar.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) besitzen die Fähigkeit, das Überleben und die Stabilisierung von endothelialen Zellen durch die Sekretion von Angiogenesefaktoren zu fördern und damit die Wundheilung zu fördern. (35) Ebenso wurde bei in vivo Versuchen bereits gezeigt, dass MSC die Fähigkeit besitzen, eine Neoangiogenese zu fördern und zu beschleunigen. (36)

Daher scheint der Einsatz von Stammzellen im Wundmanagement ein sehr vielversprechender Ansatz zu sein.

Dieser Versuch soll einen weiteren Schritt bei der Identifizierung der Zellen mit dem größten Potential für die Entwicklung derartiger Therapien darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Insgesamt umfasste der Versuch 36 Nacktmäuse. Bei den Tieren wurden dabei am Rücken mehrere Vollhautstanzen durchgeführt, und das Wundbett mit unterschiedlichen Materialien und Zellkombinationen versorgt.

Im Vorversuch wurden bis zu 4 Stanzen mit Durchmessern von 4 bis 8mm gesetzt. In den weiteren Versuchsreihen wurde die Anzahl auf 2 Stanzen und der Durchmesser auf 8mm festgelegt. Im gesamten Verlauf des Versuches wurden sämtliche Stanzen ausschließlich am Rücken der Tiere durchgeführt.

Abgelaufen ist der Tierversuch in 4 einzelnen Durchgängen. Zur eindeutigen Identifizierung der Tiere während und nach den Versuchen wurden am Schwanz der Mäuse farbige Markierungen angebracht. Zur beispielhaften Ansicht siehe Abbildung 3.

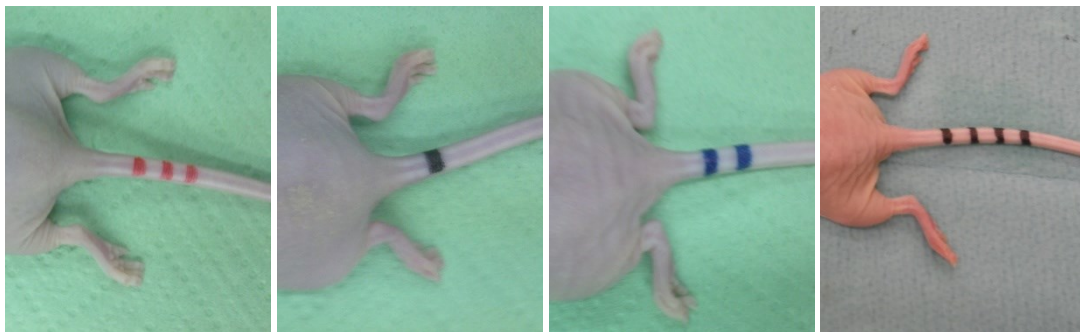


Abb. 3: Eindeutige Identifizierung der Tiere durch unterschiedliche Farbe und Anzahl der Markierungen

Der erste Versuchsdurchlauf (sog. Vorversuch) umfasste 5 Tiere und diente primär zur Überprüfung des Versuchsaufbaus und zur Kenntniserlangung bezüglich der Operationstechniken an den Tieren sowie der Optimierung der prä- und postoperativen Therapie. Daraus folgte eine entsprechende Adaptierung der

Prozesse für die weiteren Versuchsreihen. Auch die optimale Zeitspanne von Operation bis Probenentnahme wurde anhand der Ergebnisse festgelegt. Eine Übersicht über die Tiere und die jeweilige Behandlung findet sich in Tabelle 1.

Für den zweiten Zyklus wurden 8 Tiere operiert. Durch zufällige Auswahl der Tiere wurden 2 gleichgroße Gruppen (n=4) gebildet. Die Läsionen der 1. Gruppe wurden mit Matrigel versorgt, die der zweiten mit MatriDerm®, einer bovinen Kollagenmatrix.

Dabei wurde in die Kontroll- bzw. Leerwunde jeweils nur Matrigel bzw. MatriDerm® eingebracht. Bei der zweiten Läsion wurde Matrigel bzw. MatriDerm® in Kombination mit den jeweiligen zu untersuchenden Stammzellen bzw. Zellkombinationen appliziert. Eine Übersicht zum betreffenden Versuchsdurchgang findet sich in Tabelle 2.

Im 3. Durchgang kamen ebenfalls 8 Mäuse zur Verwendung. Als Wundmatrix wurde ausschließlich MatriDerm® verwendet, da sich im Rahmen der 2. Versuchsreihe das Arbeiten mit dieser Matrix als praktikabler und praxisrelevanter erwies. Die Aufteilung der Gruppen erfolgte ident zum vorangegangenen Durchlauf. Eine Übersicht zu Versuch II und den verwendeten Zellen findet sich in Tabelle 3. Beim abschließenden 4. Versuchsdurchgang wurden 15 Tiere operiert. Es erfolgte eine Einteilung in 3 Gruppen zu je 5 Tieren. Ein wesentlicher Unterschied zu den vorangegangenen Serien war, dass bereits die Kontrollwunde mit Stammzellen behandelt wurde und auf der zweiten Seite eine Kombination der Stammzellen mit Endothelzellen appliziert wurde. Eine Übersicht bezüglich des vierten Durchgangs bzw. des III. Versuchs findet sich in Tabelle 4.

	MAUS	Wunden/ Durchmesser	Behandlung
Durchgang 1 Vorversuch (5 Mäuse)	M01	MF/4mm	leer
		LB/8mm	leer
		RB/8mm	leer
	M02	LF/8mm	50µl Matrigel leer
		RF/8mm	50µl Matrigel leer
	M03	LF/8mm	50µl Matrigel leer
		RF/8mm	50µl Matrigel leer
		LB/8mm	50µl Matrigel leer
		RB/8mm	50µl Matrigel leer
	M04	LF/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		RF/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		LB/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		RB/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
	M05	LF/6mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		RF/6mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		LB/6mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		RB/6mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer

Tab. 1: Übersicht Vorversuch

	MAUS	Wunden/ Durchmesser	Behandlung
Durchgang 2 Versuch I (8 Mäuse)	M06	L/8mm	50µl Matrigel leer
		R/8mm	50µl Matrigel + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M07	L/8mm	50µl Matrigel leer
		R/8mm	50µl Matrigel + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M08	L/8mm	50µl Matrigel leer
		R/8mm	50µl Matrigel + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M09	L/8mm	50µl Matrigel leer
		R/8mm	50µl Matrigel + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M10	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M11	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M12	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M13	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)

Tab. 2: Übersicht Versuch I

	MAUS	Wunden/ Durchmesser	Behandlung
Durchgang 3 Versuch II (8 Mäuse)	M14	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 2 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M15	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 2 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M16	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 2 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M17	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 2 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M18	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 3 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M19	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 3 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M20	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 3 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M21	L/8mm	MatriDerm® + 50µl PBS leer
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 3 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)

Tab. 3: Übersicht Versuch II

	MAUS	Wunden/ Durchmesser	Behandlung
Durchgang 4 Versuch III (15 Mäuse)	M22	L/8mm	MatriDerm® + MSC 2 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 2 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M23	L/8mm	MatriDerm® + MSC 2 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 2 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M24	L/8mm	MatriDerm® + MSC 2 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 2 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M25	L/8mm	MatriDerm® + MSC 2 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 2 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M26	L/8mm	MatriDerm® + MSC 2 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 2 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M27	L/8mm	MatriDerm® + MSC 3 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 3 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M28	L/8mm	MatriDerm® + MSC 3 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 3 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M29	L/8mm	MatriDerm® + MSC 3 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 3 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M30	L/8mm	MatriDerm® + MSC 3 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 3 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M31	L/8mm	MatriDerm® + MSC 3 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 3 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M32	L/8mm	MatriDerm® + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 1 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M33	L/8mm	MatriDerm® + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 1 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M34	L/8mm	MatriDerm® + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 1 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M35	L/8mm	MatriDerm® + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 1 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
	M36	L/8mm	MatriDerm® + MSC 1 in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)
		R/8mm	MatriDerm® + MSC 1 + EC in EGM-2 (300.000Zellen/50µl)

Tab. 4: Übersicht Versuch III

Bezeichnungen/Abkürzungen	
MSC 1	AMSC38
MSC 2	blood vessel derived MSC, Fbl 50V1
MSC 3	Whartons jelly MSC, NS1 1
EC	plazentare Endothelzellen (PLAEC)

Tab. 5: Übersicht über die in den Versuchen verwendeten Zellen

2.2 Versuchstiere

Im Rahmen des Projektes kamen insgesamt 36 ausschließlich weibliche Mäuse vom Typ NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu aus dem Harlan Labor zur Verwendung. Besondere Merkmale dieses Albino-Mäusetyps sind, das Fehlen der Körperbehaarung von Geburt an, sowie ein vollständiges Fehlen des Thymus (und dadurch bedingt keine bzw. stark reduzierte T-Zell Population).

Eine erhöhte Infektanfälligkeit aufgrund der fehlenden T-Zell Population erfordert besonders hohe Hygienestandards bei der Unterbringung der Tiere und beim gesamten Handling. Daher sollten die Mäuse idealerweise unter Isolationsbedingungen gehalten werden. Sollten die räumlichen Gegebenheiten eine derartige Unterbringung nicht gestatten, so können die Käfige alternativ mit speziellen Filterdeckeln ausgestattet werden. Im vorliegenden Fall wurden die Käfige mit den erwähnten Filterdeckeln bestückt.

Verwendung finden diese athymischen Nacktmäuse vor allem in Versuchen zur Forschung im Bereich experimenteller Infektionen und Entzündungen, in der Forschung im Bereich der Onkologie und bei Versuchen bezüglich Transplantationen von Xenografts und Allografts.

Die Wahl der Mäuse für den vorliegenden Tierversuch fiel deshalb auf die NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu Mäuse, da das Fehlen des Felles eine bessere Operabilität ermöglichte und auch eine postoperative Versorgung mit Verbandsmaterial erleichterte. Zusätzlich ist dieser spezielle Typ bereits langjährig und vielfach für den Einsatz in derartigen Versuchen erprobt.

Die Unterbringung der Tiere erfolgte im Tierstall situiert in den Gebäuden der Vorklinik der Medizinischen Universität Graz und unter Aufsicht speziell geschulten Tierpflegepersonals.

Die Eingriffe fanden in Allgemeinnarkose mit Isofluran und unter Aufsicht eines Veterinärmediziners der Medizinischen Universität Graz statt.

Eine ausreichende postoperative Schmerzmedikation wurde ebenfalls durch den verantwortlichen Tierarzt sichergestellt.

Am Versuchsende erfolgte die Euthanasierung durch tiefe Kohlendioxidnarkose, die fotografische Dokumentation der Wundareale, die makroskopische Beurteilung sowie die Probenentnahme zur histologischen Aufarbeitung.

2.3 Im Wundareal applizierte Zelltypen

Die im Versuch verwendeten Zellen wurden vom Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz zur Verfügung gestellt.

Sämtliche Zellen wurden aus humanen Plazenten von gesunden Patienten isoliert. Die Plazenten wurden, mit Einwilligung der Patienten, von der Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in Graz zur Verfügung gestellt.

In den vorliegenden Versuchen wurden hAMSC aus 3 unterschiedlichen Lokalisationen in EGM-2 suspendiert und ins Wundgebiet eingebracht. Im letzten Versuchsdurchgang wurden die applizierten Stammzellen mit Endothelzellen aus der Plazenta kombiniert. Die plazentaren Endothelzellen (PLAEC) wurden aus arteriellen und venösen Gefäßen der Chorionplatte von humanen Plazenten isoliert.

Die Isolierung der hAMSC sowie der PLAEC wurde entsprechend der von Soncini et al., 2007 (37) respektive Lang et al., 2003 (38) verwendeten Protokolle durchgeführt.

Eine Übersicht über die verwendeten Zellen findet sich in Tab.5.

Die im Versuch mit MSC1 betitelten AMSC38, sind humane aus dem Amnion extrahierte mesenchymale Stammzellen, sog. hAMSC. Appliziert wurden sie im Versuch I (M06-M13) und im Versuch III (M32-M36).

Mit MSC2 betitelt wurden die in Versuch II (M14-M17) und Versuch III (M22-M26) verwendeten blood vessel derived MSC vom Typ Fbl 50V1, Fibroblasten aus den Oberflächengefäßen der Plazenta.

Bei den in Versuch II (M18- M21) und Versuch III (M27-M31) eingebrachten MSC3 handelt es sich um Whartons Jelly MSC (Wj-MSC) vom Typ NS1 1.

Im Versuch III (M22-M36) wurden jeweils in eine der beiden Wunden am Rücken der Mäuse die genannten MSC eingebracht, und in die zweite Wunde eine Kombination der jeweiligen Stammzellen mit den PLAEC.

Die hAMSC und WJ-MSC scheinen hinsichtlich ihres Potentials in der Wundheilung vergleichbar zu sein. Eine repräsentative Auswahl der Fähigkeiten von hAMSC und WJ-MSC in der Wundheilung findet sich in den Kapiteln 1.3 und 4 dieser Arbeit.

Da die PLAEC einfach zu isolieren sind und die parakrinen Effekte auf hAMSC bereits analysiert wurden (39)(34) schien die kombinierte Gabe von MSC und PLAEC für den vorliegenden Versuch vielversprechend.

Fibroblasten sind bewegliche, plastische Zellen und stellen einen Hauptbestandteil des Bindegewebes (BGW) dar. Eine wesentliche Aufgabe besteht in der Synthese von Kollagen und anderen Fasern und dient damit dem Aufbau der Extrazellulärmatrix (ECM).

Nach ihrer Reifung werden Fibroblasten zu ortsständigen Fibrozyten, die durch ihre verzweigte Struktur eine wesentliche Stabilitätsfunktion im Bindegewebe und der ECM haben. Fibroblasten und Fibrozyten werden als die gleiche Zelle in unterschiedlichem Aktivitätsstatus gewertet.

Auch in der Wundheilung spielen sie eine wichtige Rolle. (40)(41)(42)

Ähnlich wie MSC sind auch Fibroblasten plastische und adhärente Zellen und besitzen ein gewisses Differenzierungspotential. So wurde von Lysy et al., 2007 in ihrer Arbeit „Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation“ gezeigt das humane dermale Fibroblasten zu mesodermalen Zellen differenzieren können. (43) Ebenso inhibieren sie die Proliferation von alloge- nen T-Lymphozyten. (44)

Eine eindeutige phänotypische Unterscheidung zu anderen MSC gestaltet sich oft schwierig, da beide Zelltypen einige idente Oberflächenmoleküle exprimieren. (44)

Aufgrund ihrer in vitro nachgewiesenen Effekte auf Endothelzellen scheinen die aus der Plazenta gewonnenen Fibroblasten (PIFbl) für den vorliegenden Versuch eine vielversprechende Ergänzung zu sein. (45)

2.4 Weitere im Versuch verwendete Materialien

Zellen benötigen Matrizen, an denen sie sich anheften können, um zu wachsen und zu proliferieren. Daher wurden in der Vergangenheit unterschiedlichste spezielle Medien erforscht, die ähnlich der Extrazellulärmatrix funktionieren und gleichzeitig den Zellen als Nährmedium dienen.

Für diesen Versuch wurde dafür auf zwei bereits erprobte Präparate zurückgegriffen. So kam einerseits die Zellkulturmatrix BD Matrigel™ der Firma BD Biosciences zur Anwendung und andererseits die Kollagenmatrix MatriDerm® der Firma Sorbion Austria.

Basierend auf Erfahrungswerten aus ähnlichen, bereits erfolgreich durchgeführten, Versuchen wurde als Matrigel-Matrix das „BD Matrigel™ Growth Factor Reduced, Phenol red-free“ als geeignetstes Präparat ausgewählt. (46)

Matrigel ist eine Kombination aus gereinigten ECM Proteinen die von Tumorzellen eines Engelbreth-Holm-Swarm Tumor in Mäusen sezerniert werden.

Hauptsächliche Bestandteile des Matrigel sind Laminin, Kollagen IV und Entactin. (47) Wie bereits in mehreren Arbeiten beschrieben, ist Matrigel ein ideales Nähr- und Wachstumsmedium für Zellen. Siehe dazu unter anderem Hughes et al., 2010, „Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture“ (47) oder auch Kleinmann und Martin, 2005, „Matrigel: basement membrane matrix with biological activity“ (48). Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften scheint Matrigel für die Anwendung im vorliegenden Versuch ein vielversprechendes Medium zu sein.

MatriDerm®, das zweite im Versuch zur Anwendung gekommene Medium, ist eine bereits im klinischen Alltag gut etablierte Kollagen-Elastin Matrix. Siehe dazu unter

anderem Haslik et al., 2010, „Management of full-thickness skin defects in the hand and wrist region: first long-term experiences with the dermal matrix MatriDerm®“ (49), Haslik et al., 2007, „First experiences with the collagen-elastin matrix MatriDerm® as a dermal substitute in severe burn injuries of the hand“ (50) oder auch Heckmann et al., 2012, „Einzeitige Defektdeckung von denudiertem Knochen und freiliegenden Sehnen mittels MATRIDERM® und Spalthaut: Möglichkeiten und Grenzen“. (51) Hauptbestandteile dieser Matrix sind bovine Hautkollagene vom Typ I, III und V.

Durch eine dreidimensionale Mikrostruktur ist eine Zellwanderung möglich. (52) Hauptsächlich findet MatriDerm® unter anderem beim Dermisaufbau bei tiefen Defekten, zur Deckung bei freiliegenden Sehnen und Knochen, bei chirurgischen Wunden nach Tumorentfernung oder bei Vollhautwunden in der Verbrennungschirurgie. (53)

Im dieser Arbeit zugrunde liegenden Tierversuch wurde MatriDerm® unter sterilen Bedingungen mittels einer Hautstanze für die entsprechende Wundgröße vorbereitet, und dann intraoperativ zur Wunddeckung und als Matrix für die applizierten Zellen eingebracht.

Zum Schutz vor Verschmutzung des Wundbereiches (durch etwaige Nistmaterialien und ähnlichem) wurde nach Applikation der Matrizen bzw. Medien und der Zellen ein Tegaderm™ Film-Transparentverband angebracht.

Im zweiten Durchlauf sollte ein zusätzlich angebrachter elastischer Schlauchverband einen Schutz des Wundareals gewährleisten und eine frühzeitige Ablösung des Tegaderm™ verhindern. Da sich der vorhandene Verband jedoch als zu groß erwies (und bereits nach wenigen Minuten vom Versuchstier abgestreift wurde) und kleinere Größen nicht verfügbar waren, wurde im weiteren Verlauf auf eine weitere Anwendung des zusätzlichen Verbandes verzichtet.

2.5 Auswertung der Versuche

Die Auswertung der einzelnen Versuche fand in mehreren Schritten, jeweils nach dem Ende der Durchgänge, statt.

Die gesamte Auswertung und Beurteilung fand am Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz statt.

2.5.1 Makroskopische Beurteilung

Zur makroskopischen Beurteilung der Wundareale wurden regelmäßige Sichtkontrollen durchgeführt. Dabei wurde das Augenmerk auf den Allgemeinzustand der Tiere und etwaige (lokale oder systemische) Entzündungszeichen gelegt.

Im ersten Versuchsdurchgang wurden in regelmäßigen Abständen Fotografien zu Dokumentationszwecken angefertigt.

Da dies für die Tiere jedoch eine zusätzliche Stresssituation bedeutete und sich negativ auf die physiologische Verfassung auswirkte, wurde in den weiteren Durchläufen auf dieses Vorgehen verzichtet, und Fotos nur mehr nach der Euthanasierung der Tiere angefertigt. Eine regelmäßige Sichtkontrolle bezüglich Entzündungszeichen und Allgemeinzustand durch das Tierpflegepersonal erfolgte weiterhin wie bisher.

2.5.2 Mikroskopische Beurteilung

Für die mikroskopische Aufarbeitung und Beurteilung wurden die Wundbereiche nach erfolgter Euthanasierung als Biopsien entnommen, vor Ort mittels Formollösung vorfixiert und nach entsprechender Durchfixierung (etwa 3 Tage) zur weiteren Verarbeitung in Paraffin eingebettet. Zur Beurteilung kamen zwei Färbemethoden sowie die Analyse mittels Immunhistochemie zur Anwendung.

2.5.2.1 Biopsieentnahme, Fixierung, Herstellung der Schnitte

Für die Probenentnahme wurde zunächst mit einem Skalpell rund um die Wundareale ein viereckiger, durch die gesamte Hauttiefe reichender, Schnitt durchgeführt. Anschließend wurde mit einer feinen Spitzpinzette ein Eck des

umschnittenen Bereichs gefasst und die Biopsie mittels einer Schere entlang der anatomischen Schichtung entnommen.

Das so gewonnene Präparat wurde unmittelbar in Formollösung eingelegt und mithilfe von Zupfnadeln entfaltet. Nach wenigen Minuten war das Präparat ausreichend stabil, sodass es für etwa 3 weitere Tage bei Raumtemperatur in der genannten Lösung fertig vorfixiert wurde.

Anschließend zur definitiven Fixierung und weiteren Aufarbeitung wurde es in Paraffin eingebettet.

Vor der Einbettung wurde das Formol in einer aufsteigenden/absteigenden Alkoholreihe ausgeschwemmt, um anschließend durch Paraffin ersetzt zu werden.

Die nach der Einbettung entstandenen Paraffinblöcke wurden (nach ausreichender Kühlung der Blöcke, für ein verbessertes Schneideverhalten) mittels Mikrotom in 5µm dicke Scheiben geschnitten und meist in Anordnungen von 2 bis 3 Schnitten auf Objektträger aufgebracht.

Die Färbung erfolgte in Gruppen von 10 bis 20 Objektträgern in den Laboren und nach den Protokollen des Instituts für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz.



Abb. 4: Rechteckiger Schnitt zur Entnahme der Biopsie // Schnellfixierung der Biopsien

2.5.2.2 Färbemethoden und –protokolle

Die Entscheidung welche Färbemethoden und -protokolle für die vorliegende Arbeit zur Anwendung kommen sollten, wurde basierend auf langjährigen Erfahrungswerten und bereits erfolgreich publizierten Arbeiten des Instituts für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz getroffen.

Zu einem großen Teil erfolgte die Beurteilung der Präparate in der Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung, einer Standardfärbemethode in der Histologie. Bei einem Teil der Präparate wurde die Masson-Goldner Trichrom Färbung verwendet.

Die H.E. Färbung ist eine bereits jahrzehntelang erprobte Färbemethode und dient in vielen Fachbereichen als Übersichtsfärbemethode. In der Pathologie aber auch in der Histologie ist sie die wahrscheinlich am häufigsten angewandte Färbung. Dabei erscheinen basophile Strukturen, wie z.B. Zellkerne, durch das basische Hämalan blau bzw. bläulich. Die basischen respektive acidophilen Strukturen wie etwa Zytoplasma, Mitochondrien oder auch Kollagenfasern erscheinen rötlich bzw. blass rot bis rosa.

Zur besseren Beurteilung vielversprechender Präparate (basierend auf der Beurteilung in der H.E. Färbung) wurden mehrere Schnitte mittels einer Masson Goldner Trichrom (MT)Färbung betrachtet. Diese Methode erlaubt aufgrund der Anwendung von drei Färbestoffen eine nähere Differenzierung der einzelnen Gewebe und Strukturen. So dient sie eigentlich vor allem als Bindegewebsfärbemethode. Die Farben der einzelnen Strukturen können sich je nach Kit unterscheiden.

Der in diesem Fall verwendete Kit sollte Zellkerne dunkelbraun bis schwarz färben, tatsächlich erschienen diese jedoch dunkelrot. Zytoplasma und Muskulatur färbten sich ziegelrot, Bindegewebe und saure Mukosubstanzen grün, Erythrozyten orange.

Vor jeder Färbung ist es notwendig, die Präparate zu entparaffinisieren und zu rehydrieren. Vor allem der Vorgang der Entparaffinisierung muss gewissenhaft durchgeführt werden, da es ansonsten zu unzureichenden Färbungen kommen kann.

Im Anschluss an den Färbevorgang wird das Präparat mittels aufsteigender Alkoholreihe wieder dehydriert, fixiert und mit einem Deckglas versehen.

Eine Übersicht über die einzelnen Schritte der Färbeprotokolle liefern die Tabellen 6 und 7.

Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbeprotokoll	
Entparaffinieren / Entwässern	Arbeitsanweisung
Tissue Clear 1a / 1b	Je 5 min (10 min)
Tissue Clear 2a / 2b	Je 5 min (10 min)
Tissue Clear /100% Alkohol Mischung 1:1	Schwenken und auf Papier abrinnen lassen
100% EtOH	Schwenken und auf Papier abrinnen lassen
96% EtOH	Schwenken und auf Papier abrinnen lassen
70% EtOH	Schwenken und auf Papier abrinnen lassen
50% EtOH	Schwenken und auf Papier abrinnen lassen
Aqua dest.	Mehrmals mit frischem A.dest.
Färben	
Saures Hämalaun.nach Mayer, Romeis	10´
Aqua dest.	2 – 3 x wechseln bis keine Farbe mehr ausgeschwemmt wird
Ammoniumwasser / (NH ₃) Wasser (2,5ml Ammoniak / 1l Aqua dest.)	einige Sekunden bis Kerne blau erscheinen
Aqua dest.	2 x wechseln
Eosin gelblich 1%	5 ´´ - 60´´
96% EtOH, 2 Chargen (96%/1, 96%/2)	Kurz differenzieren bis keine Farbwolken mehr abgehen
100% EtOH	kurz
100% EtOH / Tissue Clear (1:1)	kurz
Tissue Clear 2b	Mindestens 10´
permanent eindecken	Horizontal trocknen lassen

Tab. 6: H.E. Färbeprotokoll für Paraffinschnitte

Masson-Goldner-Trichrom (MT) Färbeprotokoll	
Entparaffinieren / Entwässern	Arbeitsanweisung
Tissue Clear 1a, 1b	Je 5 min (10 min)
Tissue Clear 2a, 2b	Je 5 min (10 min)
Tissue Clear /100% Alkohol Mischung 1:1	Schwenken und auf Papier abrinnen lassen
100% EtOH	Schwenken und auf Papier abrinnen lassen
96% EtOH	Schwenken und auf Papier abrinnen lassen
70% EtOH	Schwenken und auf Papier abrinnen lassen
50% EtOH	Schwenken und auf Papier abrinnen lassen
Aqua dest.	Mehrmals mit frischem A.dest.
Färben	
Weigerts Eisenhämatoxylin Färbelösung	8 Minuten
Fließendes Leitungswasser	10 Minuten
Essigsäure 1%	ca. 30 sec.
Azophloxin-Lösung	10 Minuten
Essigsäure 1%	ca. 30 sec.
Phosphorwolframsäure Orange G-Lsg.	2 Minuten
Essigsäure 1%	ca. 30 sec.
Lichtgrün SF-Lösung	2 min
Essigsäure 1%	ca. 30 sec.
70% EtOH	Kurz
96% EtOH	Kurz
100% EtOH	kurz
100% EtOH / Tissue Clear (1:1)	kurz
Tissue Clear 2b	Mindestens 10´
permanent eindecken	Horizontal trocknen lassen

Tab. 7: MT Färbeprotokoll für Paraffinschnitte

2.5.2.3 Immunhistochemie

An besonders repräsentativen Schnitten wurde mit entsprechenden Antikörpern eine Immunhistochemie (IHC) durchgeführt.

Die immunhistochemische Markierung wurde entsprechend den Protokollen des Instituts für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

Als Marker für Humane mesenchymale- und Endothelzellen kam der monoklonale Maus Anti-Human AK Vimentin zur Anwendung.

Zur Sichtbarmachung von Maus Endothelzellen wurde der monoklonale endotheliale Ratten Anti-Maus Zellmarker CD31 eingesetzt. Als Sekundär-AK wurde biotinylierter Hasen Anti-Ratten IgG verwendet.

Makrophagen vom Ursprung Maus wurden mittels biotinyliertem Ratten Anti-Maus Antikörper CD45 detektiert.

Zur Markierung von glatten Muskelzellen in den Wänden von Gefäßen sowohl in humanem als auch in Mäusegewebe wurde der Maus Anti-Human AK smA (smooth muscle actin) eingesetzt.

Als Kontrollmedien wurde für Vimentin IgG1, für smA IgG2 und für CD31 humane in Paraffin eingebettete Plazenta verwendet.

Eine Übersicht über die für die IHC verwendeten Antikörper mit Angaben zu Antigenretrieval, Hersteller und Verdünnung findet sich in Tabelle 8.

Immunhistochemie				
Marker	"Wirt"/Isotyp	Konzentration [µg/ml]	Hersteller	Antigen Retrieval Lösung
Vimentin	Maus anti human IgG1	0.078	Dako	pH 9 (Dako)
CD 31	Ratten anti Maus IgG2a	4	Dianova	pH 6 (Citratpuffer)
CD45 (biotinyliert)	Ratten anti Maus IgG2b	2.5	RD	pH 9 (Dako)
smA	Maus anti human IgG2a	0.071	Dako	pH 9 (Dako)

Tab. 8: Übersicht verwendeter AK für IHC

3 Ergebnisse

Da die Ausarbeitung und Beurteilung der Präparate in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. Pichlsberger stattfand, und die Auswertung aller 79 Wunden den Rahmen für eine Diplomarbeit sprengen würde, werden die Ergebnisse des Tierversuchs in zwei parallel laufenden Arbeiten präsentiert.

Daher fokussiert sich die vorliegende Arbeit im weiteren Verlauf auf die Ergebnisse und Erkenntnisse, bzw. auf die Auswertung der Tiere, bei denen die AMSC38 (alleinig oder in Kombination mit PLAEC) zur Anwendung kamen.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von lokal applizierten Stammzellen auf die Wundheilung und im Besonderen auf die (Neo-)Angiogenese bei Vollhautdefekten in einem Tierversuch mit Mäusen zu beobachten.

Um eine Adaptierung und Optimierung des Versuchsaufbaus und der Arbeitsvorgänge zu ermöglichen, wurde als erster Durchgang ein sog. Vorversuch durchgeführt.

Aufbauend auf den Erkenntnissen aus dem ersten (Vor-)Versuch wurden die weiteren drei Durchläufe mit leicht adaptiertem Aufbau durchgeführt.

Die Erkenntnisse aus dem Vorversuch sowie die daraus abgeleiteten Adaptationen sind in Kapitel 3.1 ersichtlich.

3.1 Vorversuch

Im Vorversuch wurden 5 Mäuse behandelt. Stammzellen wurden in diesem Durchlauf noch nicht eingebracht.

Die Stanzgröße variierte zwischen 4mm, 6mm und 8mm Durchmesser.

Bei Maus 01 wurden 3 Stenzen gesetzt. Kranial mittig wurde mit 4mm gestanzt, rechts und links im hinteren Bereich des Rückens mit jeweils 8mm. Die Wunden wurden ohne weitere Therapie mit Tegaderm™ verbunden.

Bei Maus 02 wurden mittig am Rücken rechts und links jeweils 8mm große Stanzen gesetzt. Die Läsionen wurden mit jeweils 50µl Matrigel bedeckt und mit Tegaderm™ versorgt.

Bei der dritten Maus wurden 4 Stanzen mit 8mm durchgeführt. Es wurde wiederum je 50µl Matrigel aufgebracht und mit Tegaderm™ verbunden.

Bei Maus 04 erfolgte das Stanzen ebenfalls mit 8mm Durchmesser. Es wurden 4 Stanzen durchgeführt, die mit MatriDerm® bedeckt wurden und mit Tegaderm™ verbunden. Lokalisiert waren die Wunden jeweils rechts und links im oberen bzw. unteren Bereich des Rückens.

Bei der letzten Maus im Vorversuch, Maus M05, wurden 4 Stanzen mit 6mm Diameter gesetzt. Die Versorgung der Wunden erfolgte ident zu Maus 04.

Das eingebrachte MatriDerm® wurde bei beiden Tieren mit jeweils 50µl PBS befeuchtet.

Bereits nach wenigen Tagen zeigten alle 5 Mäuse Probleme mit den Augen im Sinne einer Augenentzündung. Dies wurde nach Rücksprache mit den Veterinärmediziner*innen mit Gentamycin-hältiger Augensalbe behandelt, worauf sich eine deutliche Besserung einstellte.

Für die weiteren Versuche wurde diesbezüglich eine prophylaktische Therapie mit Gentamycin festgelegt.

Maus 02 musste am Tag 4 aufgrund deutlicher lokaler Entzündungszeichen und stark reduziertem AZ aus dem Versuch genommen werden.

Am Tag 8 nach Operation mussten Maus 01 und Maus 03 wegen eines stark reduzierten AZ euthanasiert werden.

Maus 04 und Maus 05 konnten problemlos bis zum geplanten Vorversuchsende am Tag 14 geführt werden.

Aufgrund der hohen Ausfallsquote und des teils schlechten Zustands der Mäuse wurden in Rücksprache mit den betreuenden Tierärzten und dem Tierpflegepersonal folgende Adaptierungen für die weiteren Versuche beschlossen.

- Zur Stressreduktion wurden die Tiere zu zweit bzw. zu dritt untergebracht;
- Jegliche Manipulation (mit Ausnahme des Fütterns) wurde während der Versuchsdauer unterlassen, d.h. Beurteilung der Wunden erfolgte erst nach Euthanasierung;
- es erfolgte die frühzeitige prophylaktische Behandlung mit Schmerzmittel, sowie Umstellen des Schmerzmittels von Novalgin auf Naproxen;
- Verabreichung von Gentamycin zur Vermeidung der Augenproblematik;
- Begrenzung der Stanzen auf 2 pro Tier;
- Besonderes Augenmerk auf die Sterilität während der Operationen sowie eine möglichst kurze Operationsdauer;

Mithilfe der genannten Anpassungen konnten die Tiere in den Hauptversuchen komplikationslos und in gutem Zustand bis zu den geplanten Endpunkten gebracht werden.

3.2 Hauptversuche

Die Zahl der für diese Arbeit relevanten Tiere, d.h. die mit AMSC38 behandelten Mäuse, betrug insgesamt in den Hauptversuchen (Anm.: Versuchsdurchgang I-III) 13 Stück. Zur Übersicht siehe Tabelle 2: M06 – M13, sowie Tabelle 4: M32 – M36.

Davon wurden 4 Mäuse mit Matrigel und 9 mit MatriDerm® behandelt.

Bei den 4 Matrigel-Mäusen und 4 der MatriDerm®-Mäusen wurde jeweils eine Stanze nur mit dem Matrigel bzw. MatriDerm® leer behandelt und die zweite Seite mit zusätzlich eingebrachten AMSC38. Von diesen 8 Tieren wurde die Hälfte (2 Matrigel-Mäuse, 2 MatriDerm®-Mäuse) nach 4 Tagen geplant aus dem Versuch genommen, die anderen Tiere nach 8 Tagen.

Bei den restlichen 5 Tieren wurden eine Seite mit MatriDerm®+AMSC38 behandelt und die zweite Läsion mit MatriDerm®+AMSC38+PLAEC. Die Versuchsdauer betrug für alle fünf Mäuse 8 Tage.

Zur Übersicht siehe Abbildung 5.

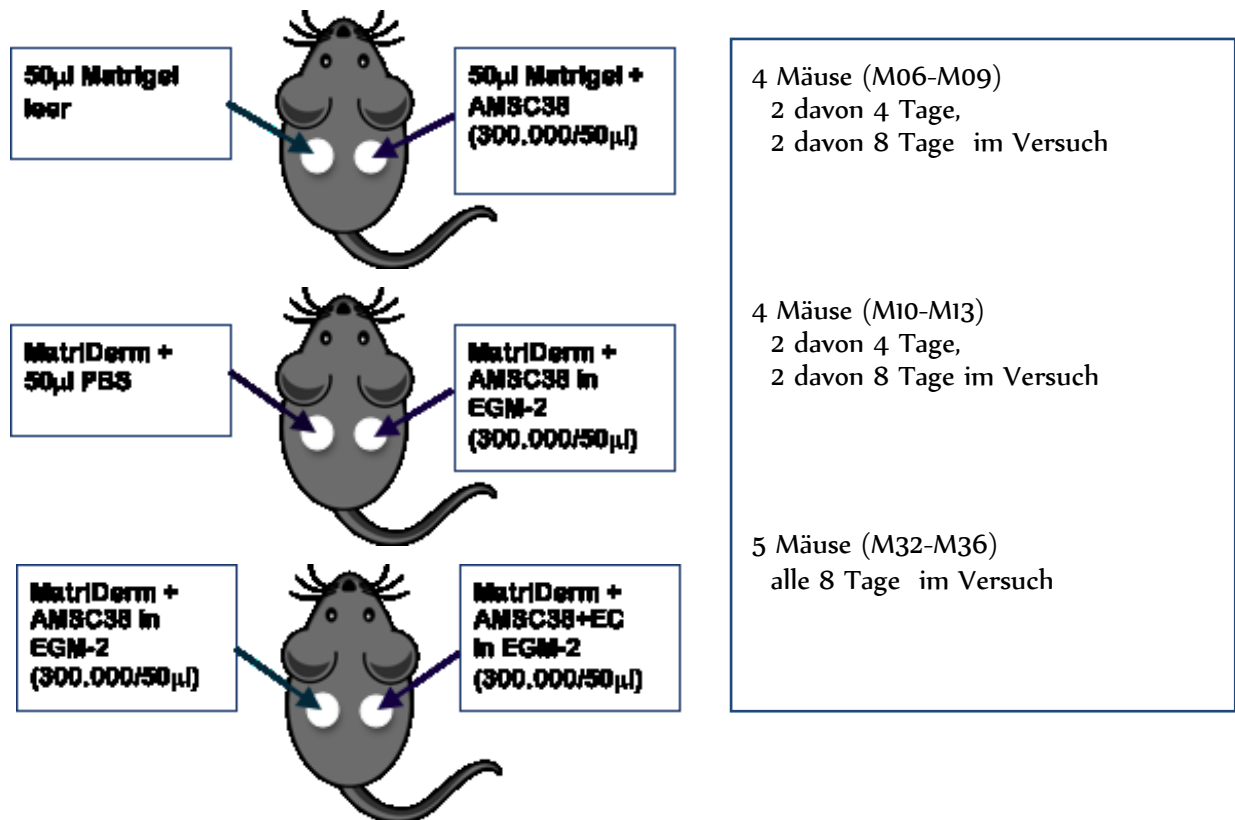


Abb. 5: Schema der mit AMSC38 behandelten Mäuse

3.2.1 Makroskopische Beurteilung

Eine makroskopische Beurteilung der Wunden erfolgte in den Hauptversuchen erst nach dem Exitus der Tiere, da der Vorversuch gezeigt hatte, dass jegliche Manipulation an den lebenden Mäusen für diese eine enorme Stresssituation bedeutete, was einen deutlichen negativen Einfluss auf den Gesundheitszustand der Tiere zeigte.

In der postmortalen makroskopischen Begutachtung der Wunden wurde grob die Größe der Wunden beurteilt, sowie der Status hinsichtlich lokaler Entzündungszeichen oder sonstiger Auffälligkeiten.

Makroskopisch waren die Wunden in den Hauptversuchen alle bland und es zeigten sich keine lokalen Entzündungszeichen oder Wundheilungsproblematiken. Bei den Tieren die am Tag 4 euthanasiert wurden, zeigte sich noch keine sichtbare Wundheilung. Das MatriDerm® war teilweise noch erkennbar, das Matrigel konnte nicht mehr abgegrenzt werden.

Bei den am Tag 8 aus dem Versuch genommenen Mäusen, zeigte sich bereits eine deutliche Reduktion der Wundgröße und ein vom Rand her beginnender Wundverschluss.

Zentral gelegen zeigte sich eine Art Wundschorf, bzw. leicht fibrinöse Auflagerung, wobei eine Abgrenzung zu den eingebrachten Medien (Anm.: Matrigel bzw. MatriDerm®) nicht möglich war. Eine signifikante Größendifferenz im Seitenvergleich war nicht eindeutig auszumachen.

Das aufgebrachte Tegaderm™ war bei den Tieren von Tag 4 teilweise abgelöst. Die Wundbereiche waren jedoch noch vollständig bedeckt. Siehe dazu Abb. 3.

Bei den Mäusen die erst am 8. Tag euthanasiert wurden, war das Tegaderm™ bereits vollständig abgelöst. Die Wunden waren jedoch bland und zeigten keine Entzündungszeichen.

Die Entnahme des Probematerials (der Biopsien), wie beschrieben, gestaltete sich unproblematisch.

Zur Übersicht der Wunden nach 4 bzw. 8 Tagen siehe Abbildungen 6 bis 9.

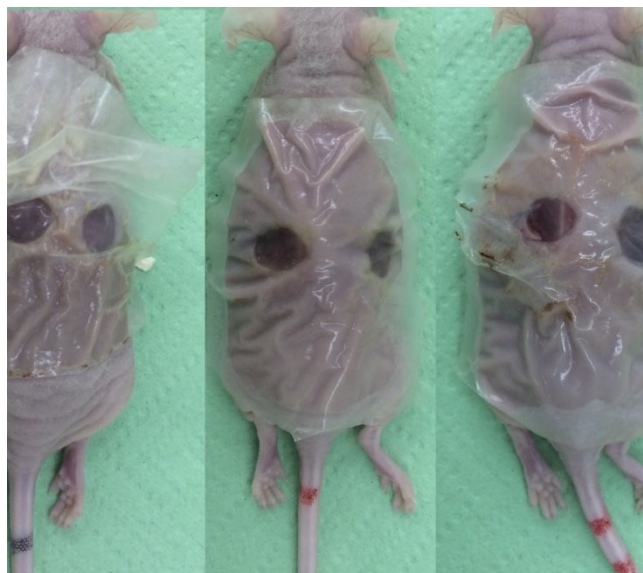


Abb. 6: Mäuse nach 4 Tagen, repräsentative Beispiele;

In den Randbereichen löst sich das Tegaderm™ ab, bedeckt jedoch noch vollständig die Wunden



Abb. 7: Wunden nach 4 Tagen, mit Matrigel behandelt;



Abb. 8: Wunden nach 4 Tagen, mit MatriDerm® behandelt;

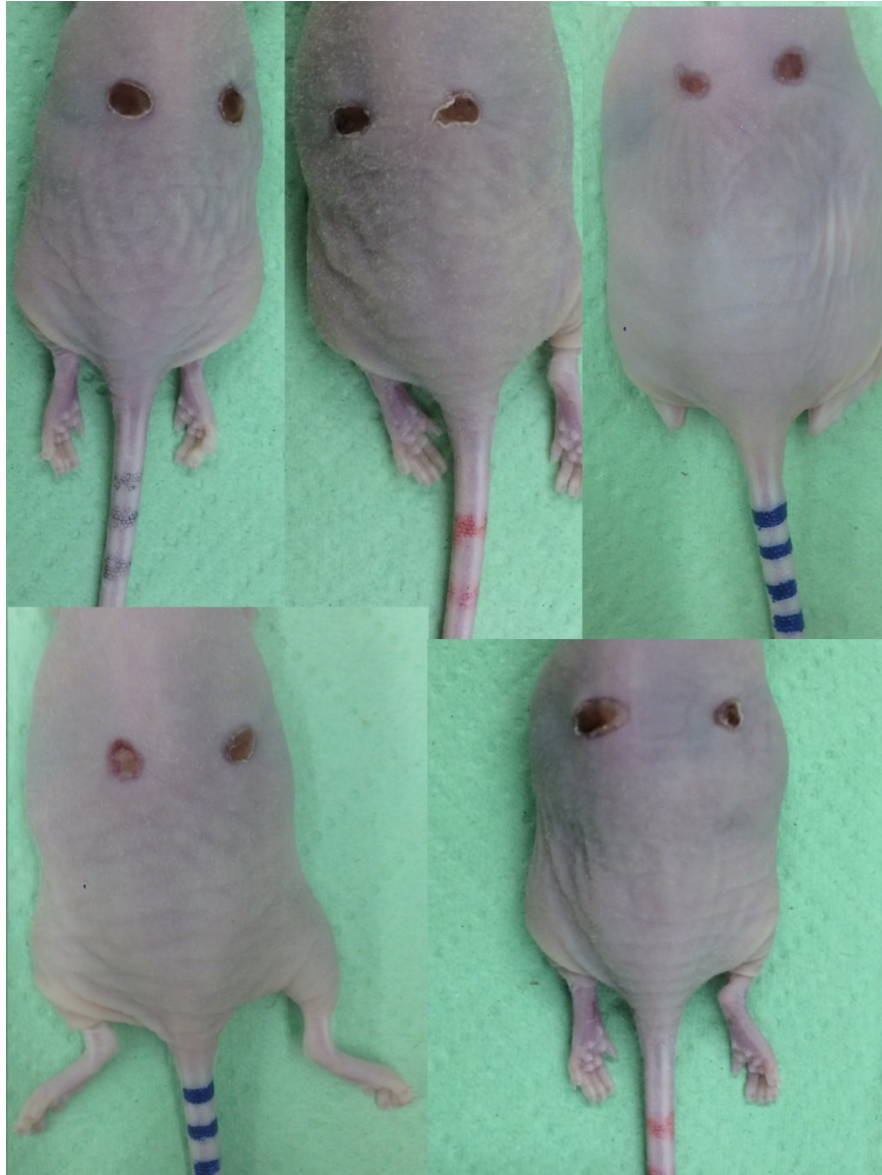


Abb. 9: Tag 8, Wunden mit MatriDerm® behandelt; Auswahl repräsentativer Tiere;

3.2.2 Mikroskopische Beurteilung

Die mikroskopische Beurteilung erfolgte mithilfe der beschriebenen Färbungen und Methoden. Sämtliche diesbezügliche Arbeiten, wie etwa das Herstellen der Schnitte, das Färben und das Fotografieren am Lichtmikroskop und auch die Auswertung fanden am Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der

Medizinischen Universität Graz unter Aufsicht von und Betreuung durch Fr. Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Lang-Olip statt.

Beurteilt wurde zum einen das neu entstandene Epithel hinsichtlich Aufbau und Ausbreitung, zum anderen vorhandene Blutgefäße hinsichtlich Größe und Anzahl. Weiters wurde versucht, eine Klassifizierung von Zellen in den auf- bzw. eingebrachten Medien und im Stanzbereich durchzuführen. Diesbezüglich von wesentlicher Bedeutung waren die eingebrachten Zellen (Anm.: AMSC38 und PLAEC), aber ebenso auch die im Wundgebiet vorhandenen Maus-eigenen Zellen (Makrophagen, Endothelzellen, u.ä.).

Bei der histologischen Auswertung der mit Matrigel (MG) behandelten Tiere zeigte sich, dass sich das Gel meist nicht gleichmäßig dem Wundgrund anlegt. So war das MG bei der Betrachtung oft in einzelnen „Klumpen“ zu finden. Die Wunden der nach 4 Tagen aus dem Versuch genommenen Tiere wiesen nur mehr in den Randbereichen einzelne „Klumpen“ des aufgetragenen Matrigels auf. Oft ist das MG in den Randbereich, und ins gesunde Gewebe gewandert. Im Matrigel finden sich vereinzelt Zellen, welche jedoch nicht näher klassifiziert werden konnten. Am ehesten dürfte es sich bei den betreffenden Zellen um eingewanderte Maus-Epithelzellen handeln. Diese scheinen im Matrigel eingeschlossen. Stellenweise ist das Matrigel von einer dünnen Epithelschicht bedeckt, jedoch besteht eine deutliche Abgrenzung. Es finden sich im groben Überblick keine Gefäße im Wundbereich. Siehe dazu Abb. 10, Bild A.

Bei den 8-Tage Stanzen war im Stanz-/Wundbereich kein Matrigel mehr zu finden. Reste zeigen sich im Gewebe bzw. aufgelagert auf dem umliegenden Epithel im Randbereich der Wunde. Das MG scheint dicht mit Zellen durchzogen, die nicht eindeutig zu identifizieren sind.

Vom Rand her ist eine beginnende Epithelialisierung zu beobachten. Gefäße im Wundbereich sind nicht zu sehen. Siehe dazu Abb.10, Bild B.

Bei den mit Matrigel+AMSC38 versorgten Stanzen zeigt sich bezüglich der Verteilung des Matrigel ein ähnliches Bild wie bei den Matrigel-leer Wunden. Das MG liegt in „Klumpen“ auf der Wunde bzw. im Gewebe.

Nach 4 Tagen sind die Zellen im MG gut zu erkennen, jedoch inhomogen verteilt und scheinen auch nicht auszuwandern. Auf der Wundoberfläche hat sich ein

dünnes aber mehrschichtiges Epithel gebildet. Darunter liegend zeigt sich lockeres BGW ohne erkennbare Gefäße. Siehe dazu Abb. 10, Bild C.

Nach 8 Tagen finden sich nur mehr wenige Zellen im Matrigel. Das Matrigel ist nur mehr im ursprünglichen Mausgewebe zu finden und imponiert abgegrenzt. Der Fortschritt der Wundheilung entspricht ansonsten dem der Matrigel-leer Wunde nach 8 Tagen. Ein repräsentatives Bild einer 8-Tage Matrigel+AMSC38 Wunde zeigt Abb.10, Bild D.

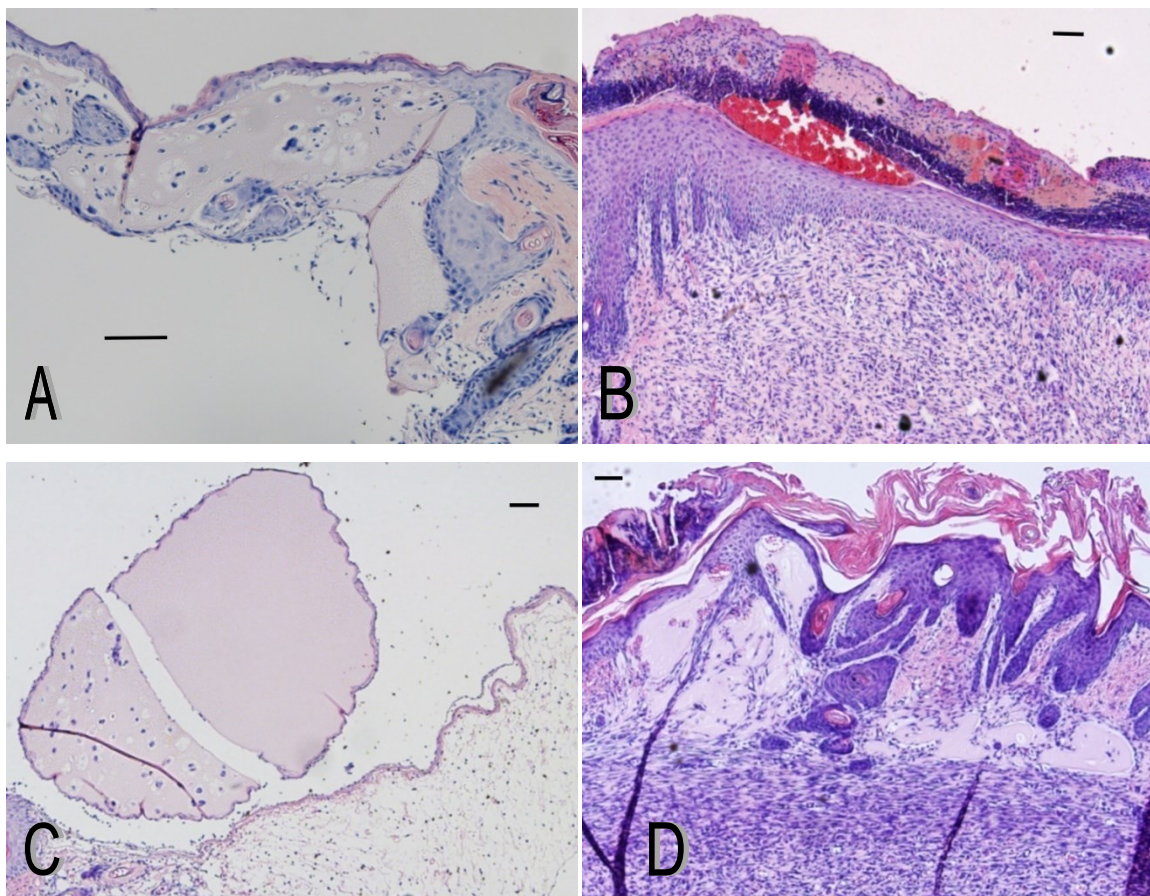


Abb. 10: Matrigel, HE-Färbung; Markierung: 100µm;

A) Matrigel (MG) leer, 4 Tage; MG nur im Randbereich der Wunde, teilweise im intakten Gewebe, keine geschlossene Decke im Wundbereich; einzelne Zellnester (Mauszellen) im MG, kein Einwachsen von Mausgewebe ins MG; dünnes Epithel vom Rand her legt sich teilw. über MG; **B)** Matrigel leer, 8 Tage; unter MG intaktes Epithel (Bild nicht im Wundbereich?) mit fragl. Entzündungsherd bzw. Blutansammlung; MG massiv von Zellen durchsetzt; **C)** Matrigel mit MSC, 8 Tage; MG nicht in direktem Kontakt mit Mausgewebe, Zellen scheinen eingeschlossen; inhomogene Verteilung der Zellen; **D)** Matrigel mit MSC, 8 Tage; MG nur mehr im intakten Gewebe (Randbereich) vorhanden; nur einzelne Zellen im Matrigel;

Das eingebrachte MatriDerm® (MD) wurde im Vorfeld der Behandlung unter sterilen Bedingungen auf die entsprechende Größe zugeschnitten (mittels einer Einwegstanze) und konnte so intraoperativ problemlos passgenau in die Wunden eingebracht werden. Das MatriDerm® erscheint in der mikroskopischen Auswertung großteils dem Wundgrund gut anliegend, die Spalten zwischen MD und Mausgewebe sind am ehesten im Rahmen der Fixierung bzw. des Schneidevorgangs zustande gekommen und als Artefakte zu betrachten.

Die kollagenen Fasern und die Struktur des MD sind in der HE Färbung gut erkennbar. Zwar ist das MatriDerm® stets gut abgrenzbar, scheint jedoch in manchen Bereichen mit dem Mausgewebe fast zu verwachsen.

Bei den MatriDerm®-leer Wunden zeigt sich nach 4 Tagen noch kein neues Epithel. Im MatriDerm® sind einzelne Zellen zu erkennen. Das BGW im Stanzbereich erscheint aufgelockert. Gefäße sind nicht zu identifizieren. Siehe Abb.11, Bild A.

Bei den am Tag 8 euthanasierten Tieren präsentieren sich die Wunden in einem ähnlichen Zustand. Die Struktur des MD ist nicht mehr so deutlich erkennbar, einzelne Zellen finden sich darin. Im Grenzbereich zwischen MD und BGW kommt es zu einer dichten Anhäufung von Zellen, die nicht sicher bestimmt werden können. Das darunter befindliche BGW ist deutlich aufgelockert, es zeigen sich noch keine klar erkennbaren Gefäße. Siehe Abb. 11, Bild B.

Bei zusätzlich applizierten AMSC38 präsentiert sich das MD nach 4 Tagen deutlich zellreicher. Auch das BGW im Stanzbereich imponiert dichter und organisierter. Eine vom Rand her beginnende Epithelbildung ist klar erkennbar. Ersichtlich in Abbildung 11, Bild C.

Nach 8 Tagen zeigt sich ein fast identes Bild, jedoch sind zusätzlich bereits klar erkennbare Gefäße vorhanden. Das BGW ist zellreich, die Kapillaren zeigen eine deutliche Orientierung Richtung Wundoberfläche und reichen beinahe bis ans MatriDerm®. Siehe Abb. 11, Bild D.

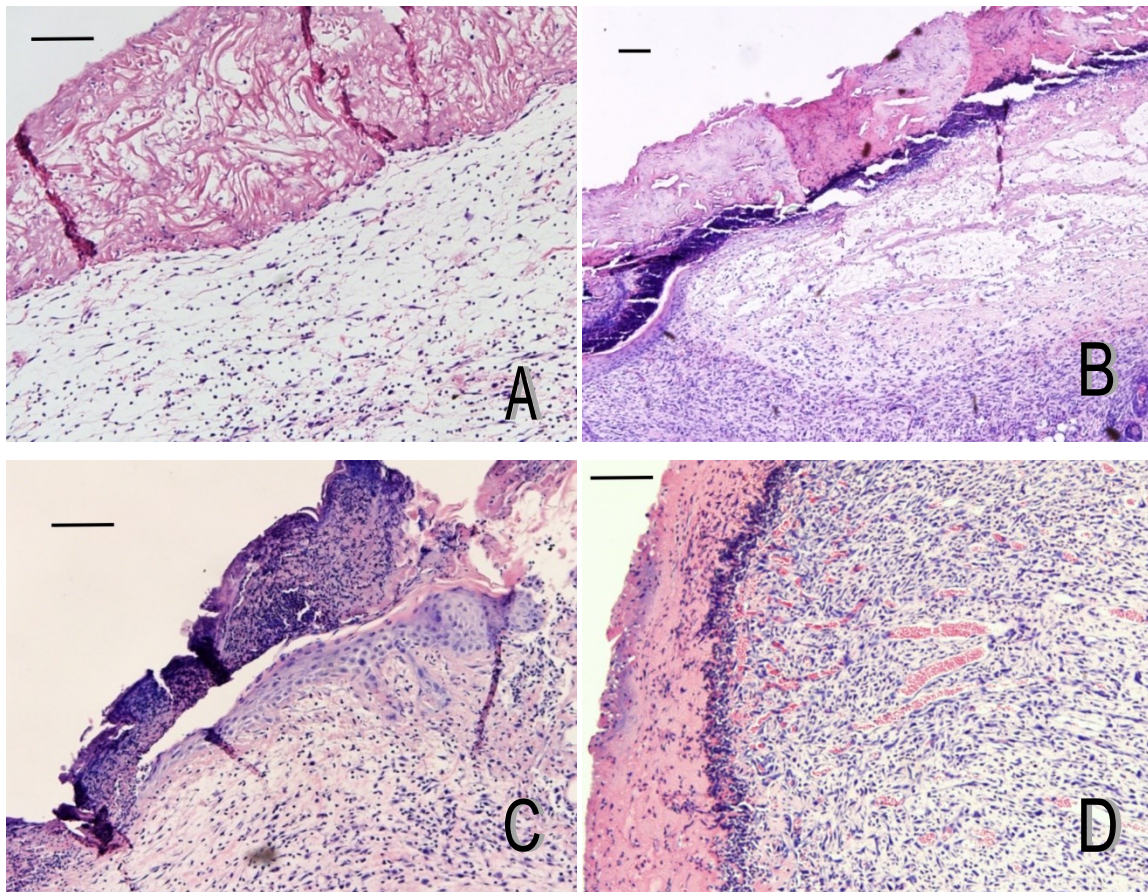


Abb. 11: MatriDerm®, HE-Färbung; Markierung: 100µm;

A) MatriDerm® (MD) leer, 4 Tage; MD liegt dem Gewebe gut an; im MatriDerm® einige Zellen eingewandert; noch keine beginnende Epithelialisierung erkennbar; keine bedeutende Vaskularisierung im Wundbereich unter MD; **B)** MatriDerm® leer, 8 Tage; vom Rand beginnende Epithelbildung; unter MatriDerm® aufgelockertes Bindegewebe; die „zerrissene“ Charakteristik am ehesten als Artefakt aus dem Schneide-/Färbeprozess resultierend; **C)** MatriDerm® mit AMSC, 4 Tage; MatriDerm® dicht von Zellen besiedelt, darunter vom Wundrand einwachsendes Epithel, keine Vaskularisierung im Stanzbereich erkennbar; **D)** MatriDerm® mit AMSC, 8 Tage; MatriDerm® deutlich von Zellen besiedelt; im Grenzbereich massive Zellanhäufung, kein Epithel, deutlich erkennbare Kapillaren im Wundbereich, bis an die Wundoberfläche heranreichend; Grenze zwischen MatriDerm® und Mausgewebe zwar gut erkennbar, Mausgewebe scheint jedoch ins MD teilw. einzuwachsen;

Um die applizierten Zellen eindeutig zu identifizieren und eine etwaige Wanderung ins Gewebe zu analysieren wurde die Markierung mit Vimentin durchgeführt.

Bei der Wunde mit Matrigel+AMSC38 nach 4 Tagen sind im MG eindeutig positive Zellen zu sehen. Eine Wanderung ins Gewebe ist nicht zu beobachten. Die Verteilung im MG erscheint regelmäßig, dennoch ist eine eher inhomogene Verteilung im Rahmen der Suspension der Zellen zu vermuten, da sich einzelne Bereiche des Matrigels zellfrei zeigen.

Nach 8 Tagen sind weder im Matrigel noch im umliegenden Gewebe positive Zellen (AMSC) zu finden. Abb. 12, Bild A und B.

Zur leichteren Identifizierung und Quantifizierung von Gefäßen im Wundbereich wurde die IHC mit CD31 durchgeführt. Dieser Marker lässt Endothelzellen der Maus rot bis schwarz erscheinen. Dabei zeigen sich bei der Behandlung mit Matrigel+AMSC nach 4 Tagen keine erkennbar positiven Zellen. Nach 8 Tagen sind im BGW Gefäße erkennbar. Jedoch ist davon auszugehen, dass es sich hierbei nicht um neu entstandene Kapillaren handelt, da sich das MG offenbar in ursprünglichem Mausgewebe befindet, worauf die vorhandenen Haarfollikel und das Drüsengewebe hindeuten. Ersichtlich in Abb. 12 Bild C (4 Tage) und Bild D (8 Tage).

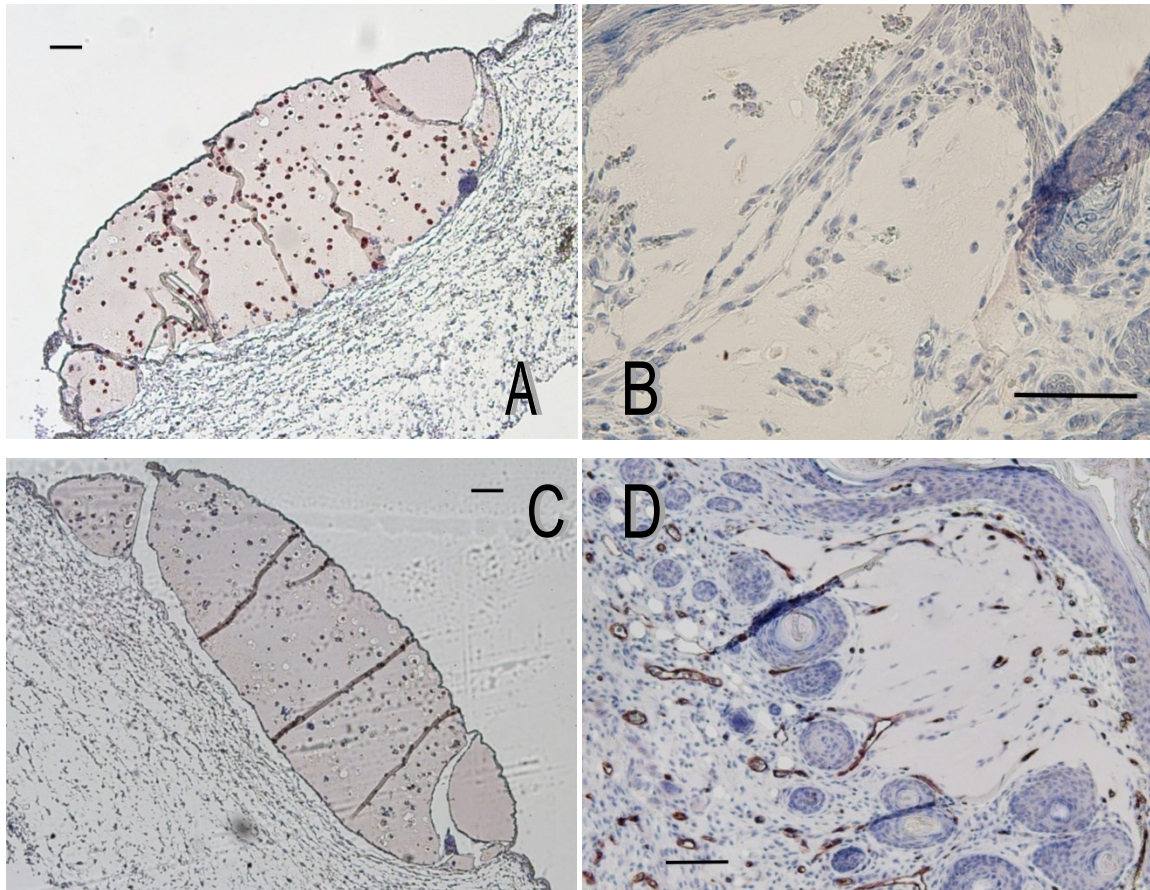


Abb. 12: Matrigel mit AMSC, Vimentin// CD31; Markierung: 100μm

A) Matrigel mit AMSC, 4 Tage, Vimentin; deutlich positive Zellen (humane MSC) im Matrigel; keine hAMSC im umliegenden Gewebe, keine Epithelialisierung im Wundbereich; **B)** Matrigel mit AMSC, 8 Tage, Vimentin; nur vereinzelte Zellen im MG, keine positiven Zellen im MG oder Mausgewebe; MG liegt nicht im Wundbereich, sondern außerhalb im gesunden Mausgewebe bzw. Randbereich; **C)** Matrigel mit AMSC, 4 Tage, CD31; keine positiven Zellen erkennbar, d.h. keine Maus-Endothelzellen; **D)** Matrigel mit AMSC, 8 Tage, CD31; einige positive Zellen im Gewebe (Maus Blutgefäße); keine positiven Zellen im MG; MG wiederum nicht dem Wundbereich aufliegend, sondern im Gewebe im Randbereich verteilt;

Bei der Behandlung mit MatriDerm®+AMSC sind in der IHC mit Vimentin weder nach 4 noch nach 8 Tagen positive Zellen zu finden. Der Verbleib der applizierten AMSC ist nicht eindeutig zu klären. Repräsentative Bilder hierzu in Abb. 13, Bild A und B.

In der CD31 Färbung zeigen sich bei den MatriDerm®+AMSC38 4 Tage Wunden noch keine nennbaren Gefäße. Abb. 13, Bild C.

Nach 8 Tagen sind zahlreiche positive Zellen, d.h. Endothelzellen, erkennbar. Die Gefäße im Stanzbereich reichen bis ans MatriDerm® heran. Siehe Abb. 13, Bild D.

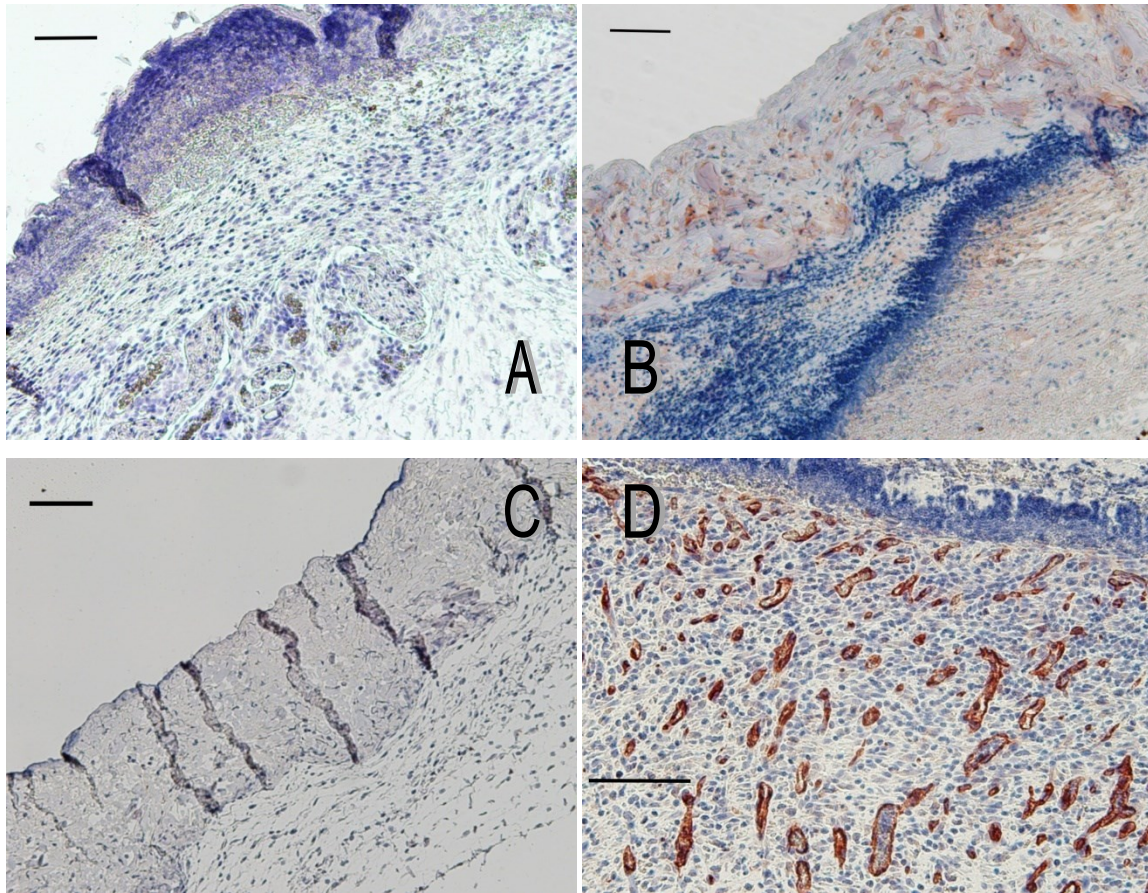


Abb. 13: MatriDerm® mit AMSC, Vimentin // CD31; Markierung: 100µm

A) MatriDerm® mit AMSC, 4 Tage, Vimentin; MD dicht mit Zellen besiedelt; keine positiven Zellen erkennbar; keine Gefäße im Wund- (Stanz-)bereich erkennbar; **B)** MatriDerm® mit AMSC, 8 Tage, Vimentin; dichte Zellansammlung im Grenzbereich zwischen MD und Mausgewebe; keine positiven Zellen erkennbar; vom Rand her beginnende Epithelbildung; **C)** MatriDerm® mit AMSC, 4 Tage, CD31; keine positiven Zellen, d.h. keine Maus-Epithelzellen erkennbar; im Wundbereich lockeres Bindegewebe (BGW); keine Epithel im Wundbereich; keine Vaskularisierung erkennbar; **D)** MatriDerm® mit AMSC, 8 Tage, CD31; zahlreiche positive Zellen im Mausgewebe, d.h. Vielzahl von Blutgefäßen von Maus-Ursprung, bis an die Wundoberfläche (bis ans MatriDerm®) heranreichend; beginnende Epithelialisierung im Grenzbereich;

Die Präparierung der Objektträger mit CD45 wird angewendet, um in der Immunhistochemie Makrophagen zu markieren und damit sichtbar zu machen.

Eine hohe Dichte von Makrophagen würde auf eine Aktivierung des Immunsystems hinweisen und wäre eine mögliche Erklärung für die bereits nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisbaren AMSC.

Wie in Abbildung 14 zu sehen, sind nur sehr vereinzelt CD45-(schwach)positive Zellen zu sehen. Dabei ist kein Unterschied zu beschreiben zwischen den mit Matrigel und den mit MatriDerm® behandelten Stanzenbereichen. Auch in den

Wunden mit eingebrachten AMSC zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens von Maus-Makrophagen im Gewebe.

Die in der Abbildung 14 vorhandenen Pfeile zeigen möglich positive Zellen, jedoch ist aufgrund der schwachen Reaktion eher davon auszugehen, dass es sich dabei zu einem überwiegenden Teil um Färbeartefakte handelt.

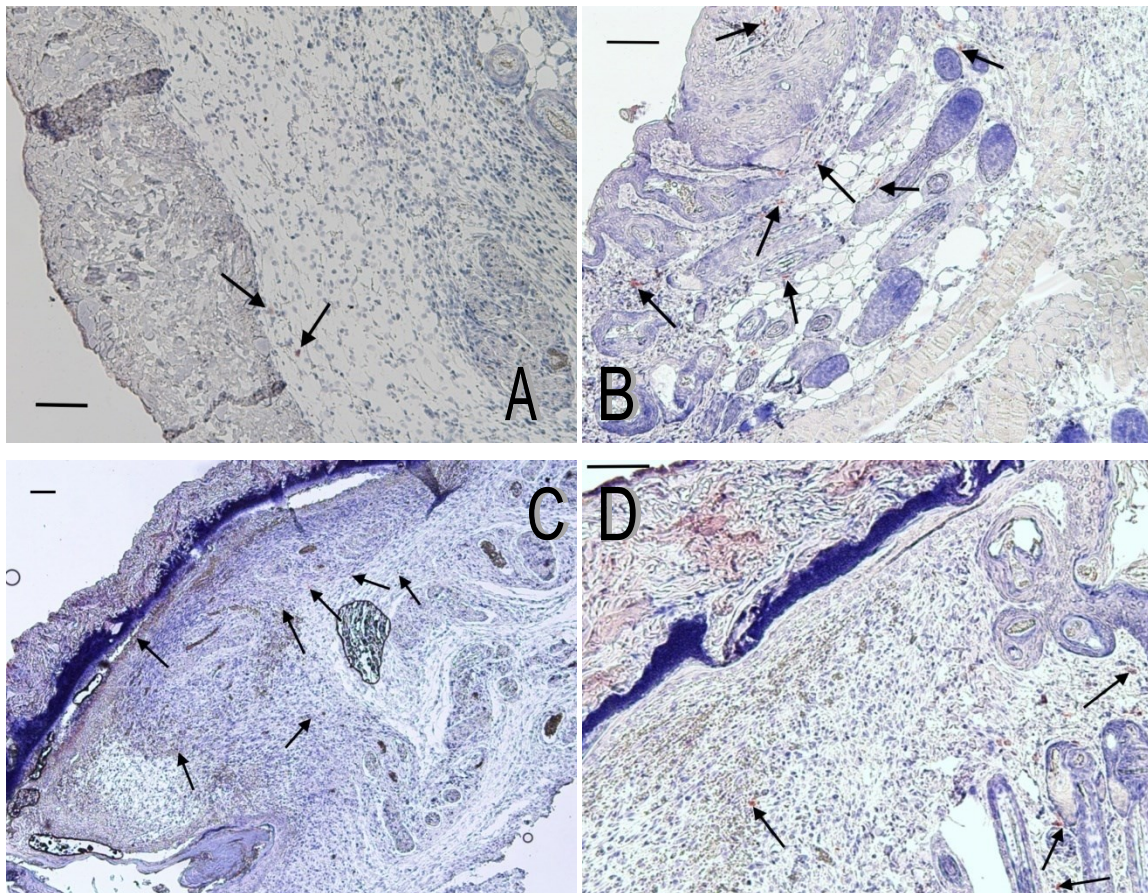


Abb. 14: MatriDerm®, CD45; Markierung: 100µm

Insgesamt konnten in den Versuchen nur sehr vereinzelt CD45-positive Zellen gefunden werden; wobei anzumerken ist, dass die vereinzelt aufgefundenen positiven Zellen möglicherweise als Artefakte zu werten sind;

A) MatriDerm® leer, 4 Tage; nur vereinzelt fraglich positive Zellen (Maus-Makrophagen);

B) MatriDerm® AMSC, 4 Tage; nur vereinzelt fragl. positive Zellen;

C) MatriDerm® AMSC, 8 Tage; nur einzelne fragl. positive Zellen;

D) MatriDerm® AMSC, 8 Tage; ebenfalls kaum (fragl.) positive Zellen vorhanden;

Im direkten Vergleich zwischen den mit Matrigel leer bedeckten und den mit MatriDerm® leer behandelten Wunden ist hinsichtlich des Grades der

Epithelisierung und des Auftretens einer (Neo-)Angiogenese kein signifikanter Unterschied erkennbar.

Sowohl in den Matrigel leer-, als auch in den MatriDerm® leer-Wunden finden sich nach 4 Tagen noch keine erkennbaren Gefäße. Nach 8 Tagen finden sich bereits einige Kapillaren im Stanzbereich und dem umliegenden Gewebe.

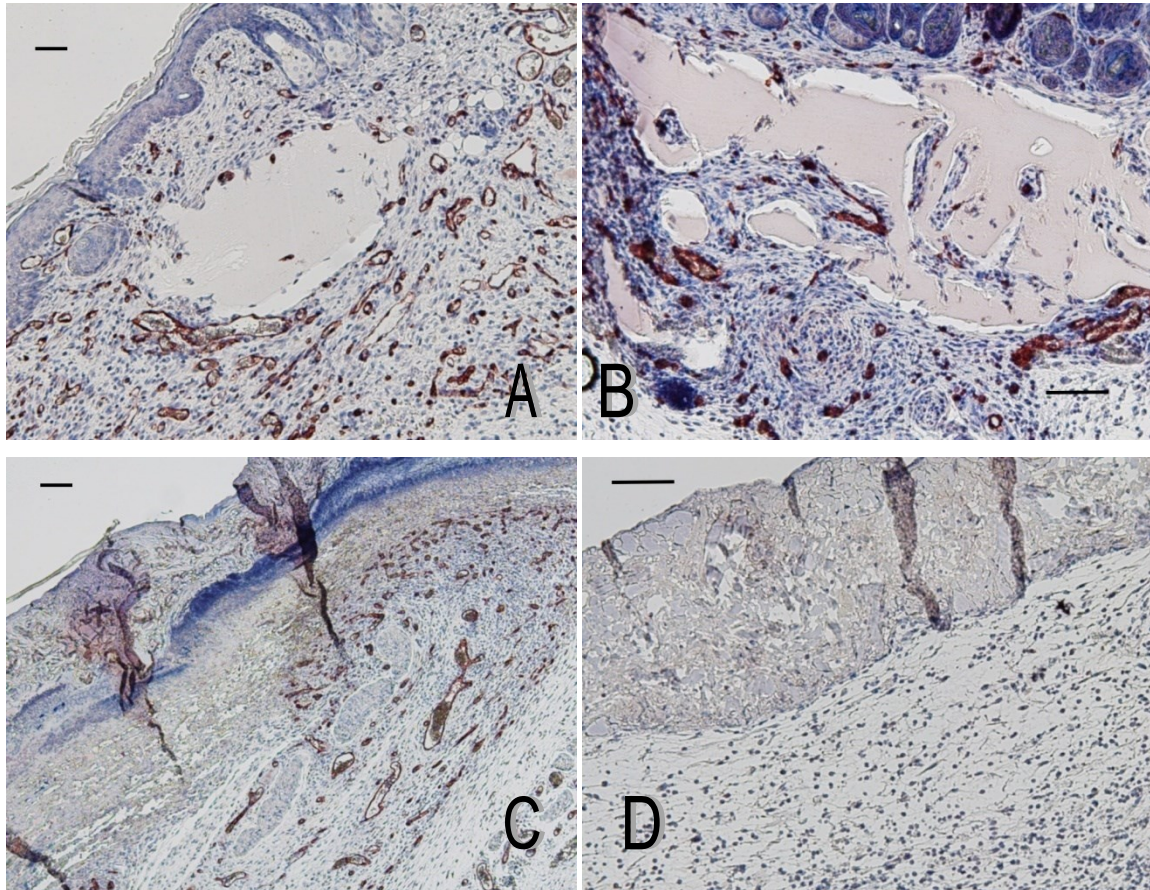


Abb. 15: Matrigel leer / MatriDerm® leer, CD31; Markierung: 100µm

A) Matrigel leer, 8 Tage; MG im gesunden Gewebe befindlich; im Gewebe gleichmäßig verteilt positive Zellen, als Maus-Endothelzellen zu werten, d.h. gute Vaskularisierung; **B)** Matrigel leer, 8 Tage; MG wiederum nur im ursprünglichen Gewebe vorhanden; um das MG positive Zellen, als Gefäße mit unterschiedlichem Kaliber zu werten; **C)** MatriDerm® leer, 8 Tage; MD dem Wundgrund gut aufliegend, im Randbereich deutlich positive Zellen, als Gefäße Maus-Ursprungs zu werten; Gefäße scheinen in Richtung Stanzbereich zu ziehen; keine Kapillaren im Wundbereich; **D)** MatriDerm® leer, 4 Tage; keine positiven Zellen im Wund-/Stanzbereich; keine Vaskularisierung im Wundbereich erkennbar;

Um den postulierten Einfluss von hAMSC auf die Wundheilung zu überprüfen, bzw. zu veranschaulichen, wurden Schnitte von Leerwunden (auch ohne Matrigel oder MatriDerm®), Präparaten von Wunden die nur mit MatriDerm® versorgt

wurden und Schnitte von mit MatriDerm®+AMSC behandelten Wunden direkt miteinander verglichen.

Siehe Abb. 16.

Bei der Leerwunde nach 8 Tagen ist zwar bereits Epithel zu erkennen, jedoch scheint es unphysiologisch verdickt. Das darunter liegende BGW scheint ungeordnet und zellarm. Bei der nur mit MatriDerm® versorgten Wunde nach 14 Tagen scheint das BGW geordneter und zellreicher. Es zeigen sich zahlreiche Gefäße, die jedoch nicht bis an die Oberfläche reichen. Bei der mit MatriDerm®+AMSC behandelten Wunde nach 8 Tagen präsentiert sich der Wundbereich mit zahlreichen Gefäßen durchzogen, die bis ans MatriDerm heranreichen. Das BGW erscheint zellreich und geordnet.

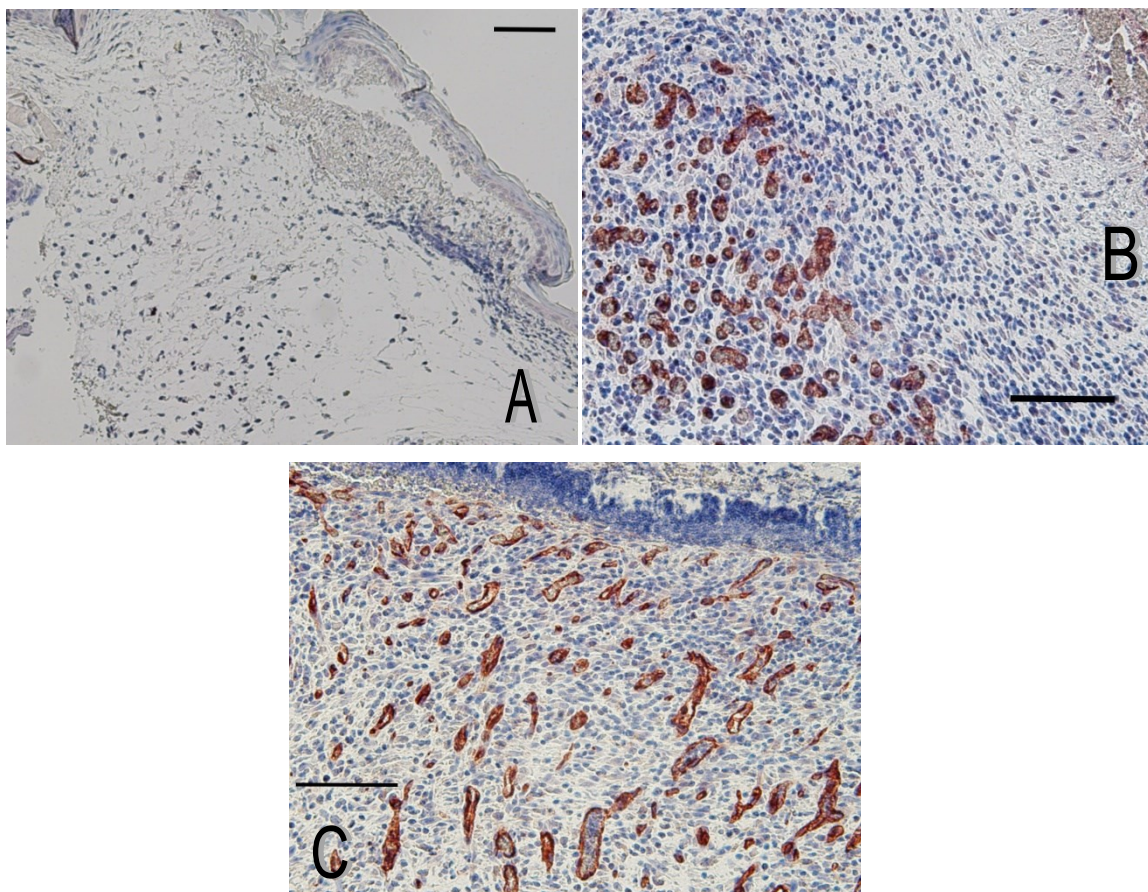


Abb. 16: Wunden mit Unterschiedlicher Behandlung im direkten Vergleich; Markierung: 100µm

A) Leerwunde, 8 Tage, CD31; **B)** MatriDerm® leer, 14 Tage, CD31; **C)** MatriDerm®+AMSC, 8 Tage, CD31;

Die beeindruckendsten Ergebnisse hinsichtlich (Neo-)Angiogenese konnte bei den mit MatriDerm®+AMSC und MatriDerm®+AMSC+EC präparierten Wunden, der nach 8 Tagen aus dem Versuch genommenen Tiere beobachtet werden. Ersichtlich in Abbildung 14.

Bei der Färbung mit CD31 zeigt sich nach 8 Tagen ein dichtes Netzwerk aus Gefäßen. Das MatriDerm® liegt dem Wundgrund durchgehend an und ist mit einigen Zellen besiedelt. Im Grenzbereich zwischen MD und darunter liegendem BGW zeigen sich dichte Zellnester.

Sowohl bei den Präparaten mit MatriDerm®+AMSC als auch bei den Wunden die mit MatriDerm®+AMSC+EC behandelt wurden, zeigen sich Gefäße mit unterschiedlichem Kaliber. So finden sich im tiefer gelegenen Wundbereich bereits deutlich größere Blutgefäße, wogegen in den oberflächennahen Bereichen ein feines aber dichtes Kapillarnetz bis ans MatriDerm® zieht.

Das BGW erscheint großteils physiologisch strukturiert und organisiert. Vom Rand her beginnt regelrechtes Epithel einzuwachsen.

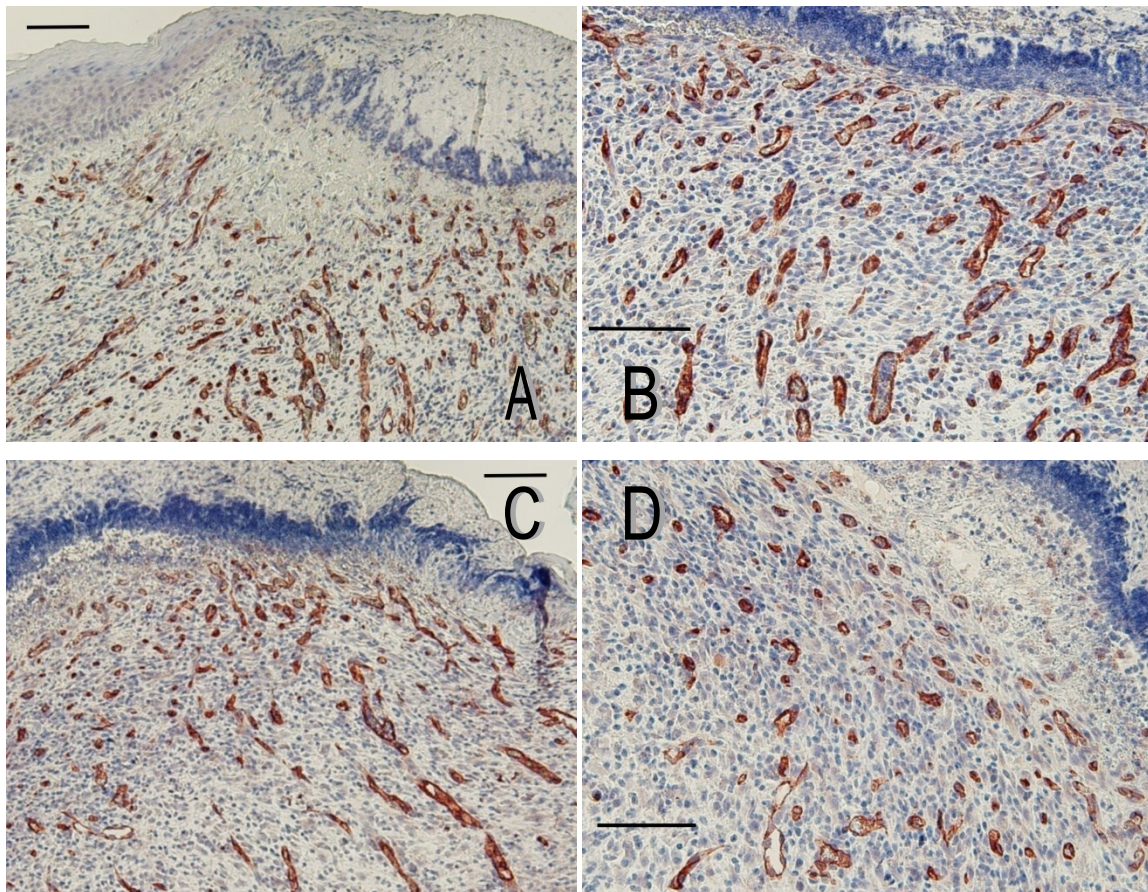


Abb. 17: MatriDerm® mit AMSC // AMSC+EC; CD31; Markierung: 100µm

A) MatriDerm® mit AMSC, 8 Tage; Vielzahl positiver Zellen im Stanzbereich; MD gut anliegend und im Grenzbereich dicht mit Zellen besiedelt; deutlich erkennbare Gefäße unterschiedlichen Kalibers, Orientierung in Richtung Wundoberfläche, keine Gefäße (d.h. keine positiven Zellen) ins MD einwachsend; regelrechte Epithelisierung vom Wundrand beginnend; **B)** MatriDerm® mit AMSC, 8 Tage; beinahe identes Bild wie A); deutlich erkennbare bis ans MD heranreichende Gefäße; **C)** MatriDerm® mit AMSC+EC, 8 Tage; zahlreiche positive Zellen, im Sinne von Blutgefäßen, Richtung Wundoberfläche orientiert; **D)** MatriDerm® mit AMSC+EC, 8 Tage; in der Vergrößerung sieht man, dass die Gefäße bis fast an die Oberfläche reichen, jedoch nicht bis ins MatriDerm®, im Grenzbereich bereits Epithel zu erkennen;

Um die zahlreichen Kapillaren im Stanz-/Wundbereich hinsichtlich eines „Anschlusses“ an das Gefäßsystem der Maus analysieren zu können, wurden die aussagekräftigsten Bilder mittels MT-Färbekit bearbeitet.

Die Kapillaren imponieren dicht mit Erythrozyten gefüllt was darauf schließen lässt, dass es sich bei den Gefäßen um voll entwickelte Teile des Maus-Gefäßsystems handelt.

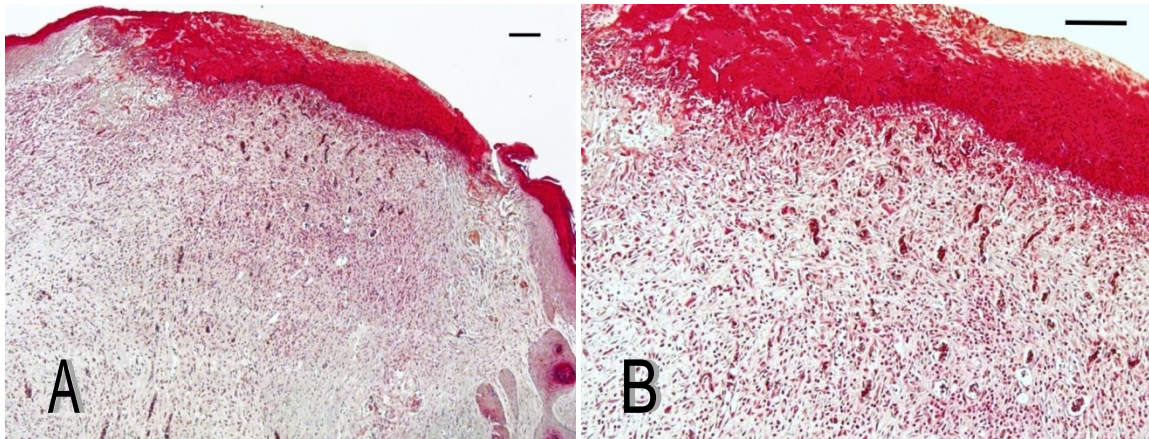


Abb. 18: MatriDerm® mit AMSC, nach 8 Tagen; MT-Färbung; Markierung: 100µm

Die Erythrozyten sind in der MT-Färbung gut anfärbbar. Daher wird diese Färbung gerne verwendet um den Status neu entstandener Gefäße evaluieren zu können.

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine Behandlung mit hAMSC einen positiven Effekt auf die Angiogenese in Vollhautwunden zeigt. Dies zeigt der direkte Vergleich von Leerwunden mit den mit Stammzellen behandelten Wunden sehr deutlich. Siehe Abb. 16.

Dabei scheinen die mit MatriDerm®+AMSC behandelten Wunden die höchste Dichte an (neu entstandenen) Kapillaren aufzuweisen, auch im Vergleich zu den mit Matrigel+AMSC behandelten Stanzen. Eine zusätzliche Applikation von PLAEC scheint keine signifikante Verbesserung mit sich zu bringen.

Die Analyse der Wunden bezugnehmend auf die Epithelialisierung der Wunde zeigte, dass Wunden mit Matrigel und Leerwunden früher Epithelgewebe aufweisen, dieses jedoch oft verdickt und unregelmäßig erscheint.

Bei den mit MatriDerm® versorgten Wunden beginnt die Epithelialisierung mit etwas Verzögerung. Das vom Rand einwachsende Epithel zeigt sich regelmäßig und physiologisch strukturiert.

4 Diskussion

Stammzell-basierte Therapien sind aktuell in aller Munde und für viele die Zukunft in der Heilung unterschiedlichster Erkrankungen und Verletzungen. In vielen Bereichen konnten bereits erfolgreich Studien über die Eigenschaften und die Effekte von Stammzellen, auch hinsichtlich ihres großen Potentials für eine zukünftige klinische Anwendung, durchgeführt werden. (26)

Nach Betrachtung der Ergebnisse kann die vorliegende Studie, als Ergänzung der aktuellen Forschung, einen weiteren Schritt in der Entwicklung klinisch anwendbarer Stammzell-basierter Therapien in der Wundheilung darstellen.

Eine Hürde in der Stammzellforschung stellt oftmals die Gewinnung der Zellen dar.

Die ersten Forschungsergebnisse wurden fast ausschließlich mit aus dem Knochenmark gewonnenen Stammzellen erzielt.

Diese Bone-marrow derived MSC (BM-MSK) stellen in der Forschung den Prototypen der adulten Stammzellen dar und gelten nach wie vor als Gold-Standard für die Gewinnung von MSC zur klinischen Applikation, auch wenn sie diesbezüglich zeitnah durch Stammzellen aus alternativen „Quellen“ abgelöst werden dürften. Siehe dazu die Arbeit von El Omar et al, 2014, „Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies?“. (54)

Die Anwendung von BM-MSK für stammzell-basierte Therapien scheint aus mehrerlei Gründen limitiert. Die Gewinnung der Zellen erfordert einen invasiven Eingriff, was aus ethischer Sicht als problematisch gesehen wird und für den Spender eine schmerzhafteste Prozedur darstellt. Weiters wird postuliert, dass das Proliferations- und Differenzierungspotential der BM-MSK mit dem Alter des Spenders abnimmt. (55)(56)

Die intensive Suche nach besser geeigneten Stammzellquellen rückte schließlich das sogenannte extraembryonale Gewebe als gute Alternative in den Mittelpunkt der aktuellen Stammzellforschung. Diese Möglichkeit beinhaltet u.a. sowohl die

Plazenta (hier vor allem das Amnion), als auch die Nabelschnur (hier vor allem die Whartonsche Sulze) als mögliche Quelle.

Da diese Gewebe üblicherweise einfach entsorgt werden, beinahe unbegrenzt verfügbar sind, und auch die Extraktion von Zellen daraus einfach möglich und aus ethischer Sicht unbedenklicher ist, scheint dies eine gute Alternative darzustellen. (57) Daher scheinen die daraus gewonnen Zellen eine ideale Basis für mögliche stammzell-basierte Therapien darzustellen.

Die multipotente Charakteristik ist dabei als weiterer Vorteil gegenüber der oft nur als eingeschränkt-multipotent geltenden BM-MSC zu werten. (58)

Inzwischen sind sowohl Stammzellen aus der Wharton Sulze (WJ-MSC) als auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten AMSC aus dem Amnion vielfach erforscht.

Sowohl bei in vitro als auch bei in vivo Studien konnte das beeindruckende Potenzial von MSC bereits beobachtet und beschrieben werden.

So konnte bspw. in der Arbeit von Sakuragawa et al., 2000, „Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver“ (59) in einer in vivo Studie nachgewiesen werden, dass in die Leber einer immundefizienten Maus transplantierte hAMSC u.a. die Albumin Synthese Kapazität positiv beeinflussten, was hinsichtlich der Behandlung akuter Lebererkrankungen vielversprechend erscheint. (59)

Zhao et al., 2005, zeigten in ihrer Studie „Human Amniotic Mesenchymal Cells Have Some Characteristics of Cardiomyocytes“ (60), dass hAMSC in frische Infarktareale von Rattenherzen implantiert, mindestens 2 Monate vor Ort im Narbengewebe überlebten und sogar in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen differenzierten. (60)

Ähnliches wurde von Liu et al., 2008 in ihrer Arbeit „Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery conclusion model“ (61) am Beispiel eines Schlaganfalls gezeigt. Sie transplantierten hAMSC in den ischämischen Bereich im Cerebrum von Ratten, was zu einem signifikant geringerem ischämischen Schaden und zu einer deutlichen Besserung von Verhaltensauffälligkeiten führte. (61)

Die Haut als größtes Organ des Menschen hat nicht nur lebenswichtige Schutz- und Barrierefunktion, sondern ist auch im Laufe des Lebens am häufigsten von

Verletzungen betroffen. Daher ist die Wundheilung in der Medizin ein sehr zentrales Thema.

Verzögerte oder gestörte Wundheilung und daraus folgende chronische Wunden stellen für den Patienten eine oft massive Belastung und Einschränkung der Lebensqualität dar. Ebenso chronische Wunden infolge systemischer Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, PAVK, u.ä.) die etwa mit einer Minderdurchblutung des Gewebes einhergehen.

Für das medizinische Personal bedeuten derartige Wunden oft einen großen Aufwand in der Behandlung und weiterführenden Versorgung. Nebenbei stellt das Wundmanagement chronischer und problematischer Wunden eine nicht unbeträchtliche finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem dar.

Ein grundlegender Faktor für eine aus medizinischer Sicht zufriedenstellende Wundheilung ist eine ausreichende Versorgung des Wundareals u.a. mit Sauerstoff und Nährstoffen oder kurz gesagt, eine suffiziente Blutzufuhr.

Dies ist auch notwendig, damit die für den weiteren Verlauf der Wundheilung notwendigen Zellen in das betroffene Areal gelangen können.

Grundvoraussetzung dafür ist eine ausreichende Anzahl an funktionstüchtigen Arterien respektive Kapillaren.

Um dies wiederum zu gewährleisten, ist es notwendig, dass im verletzten Gebiet eine (Neo-)Angiogenese stattfindet bzw. noch vorhandene Gefäße stabilisiert werden.

In der aktuellen Forschung wird für Stammzellen, genauer gesagt für mesenchymale Stammzellen, eine große Bandbreite an Eigenschaften und Fähigkeiten postuliert, die positiven Einfluss auf den komplexen und fein abgestimmten Vorgang der Wundheilung mit sich bringen sollen.

So zum Beispiel in der Arbeit von Arno et al., 2014 „Human Wharton's jelly-mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling“ (32), wo in vitro nachgewiesen werden konnte, dass WJ-MSC die Proliferation von humanen Fibroblasten der Haut steigern und gleichzeitig die Apoptoserate der Fibroblasten nicht beeinflussen. Dabei ist anzumerken, dass eine gesteigerte Apoptoserate Hinweis für die Entwicklung einer Wundheilungsstörung sein kann und eine stark erniedrigte Apoptoserate das Risiko von Keloidbildung erhöht. In derselben Arbeit konnte in einem in vivo Maus-Versuch nachgewiesen werden, dass WJ-MSC u.a. eine schnellere Epithelialisierung, eine höhere Zelldichte in neu

entstandenem Granulationsgewebe und eine bessere Organisation der ECM fördern. (32)

Sasaki et al., 2008 konnten in ihrer Publikation „Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type“ (62) in einem in vivo Maus-Versuch nachweisen, dass MSCs durch spezifische Chemokine in Wundareale rekrutiert werden, und dort u.a. zu Keratinozyten, Endothelzellen, Perizyten und Monozyten differenzieren können. Dabei ist allerdings anzumerken, dass es sich bei den verwendeten MSCs um mauseigene zirkulierende MSCs handelt. Ob BM-MSC oder WJ-MSC ähnliche Fähigkeiten besitzen, bleibt noch zu klären. (62)

Eine gute Übersicht über die aktuelle Forschungslage hinsichtlich MSC in der Wundheilung liefern u.a. die Arbeit von Isakson et al., 2015, „Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential“ (9) oder die von Zahorec et al., 2014, „Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy“. (63)

Weitere, in der Arbeit von Ilancheran et al., 2009, „Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair?“ postulierte wesentliche Merkmale, die jene aus den extra-embryonalen Geweben extrahierten Zellen zu einer vielversprechenden Option für zukünftige Stammzell-basierte Therapien machen, sind u.a. die niedrige Antigenität und ein antiinflammatorischer Effekt.

So verursachen in unterschiedlichen immunkompetenten Tieren (Affen, Hasen und Meerschweinchen) xeno-transplantierte Zellen aus dem Amnion keine Abstoßungsreaktion und keine akute Immunantwort. Auch die Injektion von humanen amniotischen Epithelzellen bei gesunden Freiwilligen führte zu keiner Akutreaktion oder anti-HLA Antikörper- oder Lymphozytenreaktion.

Betreffend die antiinflammatorischen Eigenschaften zeigten Ilancheran et al. in ihrer Arbeit, dass Epithelzellen aus dem Amnion durch sogenannte Migrations-hemmende Faktoren (MIF) u.a. die Migration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ins Wundgebiet hemmen, und zusätzlich weitere antiinflammatorische Faktoren sezernieren. Ein Vorteil aus dieser Eigenschaft ist u.a. eine verminderte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fibrosen. (64)

Das proangiogenetische Potential von WJ-MSC wurde neben vielen anderen von Choi et al., 2013, in ihrer Studie „Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels“ (36) untersucht. Dabei konnte in vitro gezeigt werden, dass in Matrigel eingebrachte WJ-MSC zwar nicht selbst die Fähigkeit besitzen, Kapillar-ähnliche Strukturen zu bilden, zusätzlich applizierte Endothelzellen jedoch darin unterstützen, derartige Strukturen zu bilden. Dabei dürften von WJ-MSC sezernierte Cytokine und Wachstumsfaktoren über parakrine Mechanismen die entscheidende Rolle spielen. In vivo wurde bei Mäusen mit einer Ischämie einer Gliedmaße gezeigt, dass die Ischämie-induzierte Neoangiogenese durch die Anwesenheit von WJ-MSC verbessert wurde. Ebenso die Wiederherstellung der Funktion nach Ischämie. Dabei zeigte sich auch eine deutlich erhöhte Gefäßdichte in der mit WJ-MSC behandelten Gliedmaße. (36)

Eine im Aufbau beinahe idente Studie mit hAMSC kam zu den gleichen Ergebnissen. Kim et al., 2012 verglichen dabei in ihrer Publikation „Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia“ das angiogenetische Potential von hAMSC gegen Stammzellen aus dem Fettgewebe, sog. adipose tissue derived MSCs (AT-MSC). (30)

Vor allem die proangiogenetischen Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen konnten auch in dem dieser Arbeit zugrunde liegenden in vivo Versuch, respektive in den mit hAMSC behandelten Wunden, reproduziert werden.

Zwar konnten im Mausgewebe keine hAMSC nachgewiesen werden, dennoch zeigte sich in den mit den Stammzellen versehenen Wunden eine deutlich höhere Dichte an neu entstandenen Kapillaren.

Dies ist besonders deutlich im direkten Vergleich der Wunden in der Abbildung 16 zu erkennen.

Im Vergleich der Anwendung von Matrigel und MatriDerm® konnte ein zumindest geringer Unterschied im Fortschritt und der Qualität der Wundheilung beobachtet werden, vor allem bei gleichzeitiger Applikation von hAMSC.

Hinsichtlich der Angiogenese im Stanz-/Wundbereich konnte dabei eine Differenz zugunsten des MatriDerm® ausgemacht werden. Aus diesem Grund und auch

aufgrund der einfacheren Handhabung wurde ab Versuch II nur mehr MatriDerm® zur Versorgung der Wunden angewendet. Gründe dafür sind wie genannt die funktionellere Handhabung sowie zusätzlich die bereits vielfach klinisch erprobte Anwendung von MatriDerm® zur Deckung von Hautdefekten. (49)(50)(51)(65)

Hier allerdings ausschließlich, wie vom Hersteller empfohlen, in Verbindung mit Spalthaut bzw. Hauttransplantaten. (52,53)

Diese Empfehlung könnte eine weitere Erklärung für die scheinbar reduzierte bzw. verzögerte Epithelialisierung im Bereich des MatriDerm® sein. Die erst später und langsamer einsetzende Epithelialisierung bei den mit MatriDerm® versorgten Wunden könnte also an der Matrix selbst liegen, und sogar teilweise gewünscht sein. Etwa um die Gefahr einer möglichen Wundkontraktion durch zu rasche (überschießende) Epithelbildung zu reduzieren. Unter Umständen ist eine Epithelialisierung nicht nötig, da das MatriDerm® üblicherweise mit Haut bedeckt wird.

Matrigel ist zwar ein vielfach erprobtes, beinahe ideal erscheinendes Nährmedium für Zellen (47,48), dennoch erscheint im Vergleich dazu das MatriDerm® die Migration der Zellen ins umliegende Gewebe, und damit die Entfaltung der Wirkung zu erleichtern. Die gefundenen Ergebnisse legen diese These nahe.

Überraschend war die fast völlige Abwesenheit von Makrophagen im Wundgebiet. Mögliche Ursachen dafür könnten zwar die weiter oben angesprochenen antiinflammatorischen Eigenschaften der MSC sein, dann müssten allerdings in den Leerwunden Makrophagen zu finden sein, was nicht der Fall war. Daher ist es nahe liegend, dass die Absenz von Makrophagen mit der Immundefizienz der verwendeten Tiere in Verbindung steht.

5 Schlussfolgerung

In der durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass die lokale Applikation von mesenchymalen Stammzellen einen positiven Effekt auf die Angiogenese im Wundgebiet hat.

Eine Kombination mit Endothelzellen scheint dabei keine signifikante Verbesserung mit sich zu bringen.

Hinsichtlich eines schnelleren Wundverschlusses im Sinne einer rascheren Epithelialisierung zeigte sich keine Verbesserung durch die Applikation von hAMSC oder hAMSC+EC.

Auch wenn in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Wundheilung zwischen den mit MatriDerm® und den mit Matrigel versorgten Läsionen festgestellt werden konnten, erscheint die Versorgung mit MatriDerm® in der klinischen Anwendbarkeit vielversprechender. Auch wenn Matrigel ein ideales Kultur- und Nährmedium darstellt, scheint die Migration von Zellen bei MatriDerm® erleichtert zu sein. Ebenso dürfte sich das Handling von MatriDerm® im Vergleich zu Matrigel im klinischen Alltag als praktikabler präsentieren.

Aufbauend auf die Ergebnisse und Erkenntnisse aus diesem Versuch sollte die Verwendung von hAMSC für die Behandlung von kutanen (chronischen) Wunden in Kombination mit kollagenen Matrizen bzw. Hautersatzmaterialien (wie etwa das verwendete MatriDerm®) als gute Option für die Zukunft in der Wundversorgung in Betracht gezogen werden. Eine Kombination mit Endothelzellen erscheint als nicht notwendig.

Weitere präklinische (Tier-)Versuche mit hAMSC und bspw. MatriDerm®, eventuell mit großflächigeren bzw. tiefer reichenden Wunden und über einen längeren Beobachtungszeitraum angesetzt, als nächste Schritte zur Entwicklung einer klinisch anwendbaren Stammzell-basierten Therapie für die Versorgung und Behandlung problematischer- und oder chronischer Wunden sollten in Betracht gezogen werden.

Referenzen

1. Fong C-Y, Tam K, Cheyyatraivendran S, Gan S-U, Gauthaman K, Armugam A, u. a. Human Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds. J Cell Biochem. Februar 2014;115(2):290–302.
2. Tam K, Cheyyatraviendran S, Venugopal J, Biswas A, Choolani M, Ramakrishna S, u. a. A nanoscaffold impregnated with human wharton's jelly stem cells or its secretions improves healing of wounds. J Cell Biochem. April 2014;115(4):794–803.
3. Vogt PM. Praxis der plastischen Chirurgie: plastisch-rekonstruktive Operationen, plastisch-ästhetische Operationen, Handchirurgie, Verbrennungschirurgie; Berlin: Springer Medizin; 2011. 869 S.
4. Heinlin J, Schreml S, Babilas P, Landthaler M, Karrer S. [Cutaneous wound healing. Therapeutic interventions]. Hautarzt Z Für Dermatol Venerol Verwandte Geb. Juli 2010;61(7):611–26; quiz 627.
5. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur. 2012;49(1):35–43.
6. Henne-Bruns D, Duale Reihe - Chirurgie.4. Aufl. Stuttgart [u.a]: Thieme; 2012.
7. Edwards SS, Zavala G, Prieto CP, Elliott M, Martínez S, Egaña JT, u. a. Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration. Angiogenesis. 13. April 2014;
8. Anderhuber F, Fanghänel J, Nitsch R, Pera F, Waldeyer A. Waldeyer - Anatomie des Menschen. Berlin: de Gruyter; 2012.

9. Isakson M, de Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJP. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells Int.* 2015;2015:831095.
10. Sun BK, Siprashvili Z, Khavari PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science.* 21. November 2014;346(6212):941–5.
11. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 15. Mai 2008;453(7193):314–21.
12. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* Mai 2007;127(5):998–1008.
13. Schreml S, Szeimies R-M, Prantl L, Landthaler M, Babilas P. Wound healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol.* November 2010;63(5):866–81.
14. Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* September 1998;30(9):1019–30.
15. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 5. Juni 1992;267(16):10931–4.
16. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* Juli 2003;83(3):835–70.
17. Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 1. Mai 1999;13(9):1055–66.
18. Risau W. Angiogenic growth factors. *Prog Growth Factor Res.* 1990;2(1):71–9.
19. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie. 4., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. 680 S.

20. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2004;22(4):487–500.
21. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, u. a. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
22. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. September 1976;4(5):267–74.
23. Manini I, Gulino L, Gava B, Pierantozzi E, Curina C, Rossi D, u. a. Multipotent progenitors in freshly isolated and cultured human mesenchymal stem cells: a comparison between adipose and dermal tissue. *Cell Tissue Res*. April 2011;344(1):85–95.
24. Rodriguez A-M, Elabd C, Amri E-Z, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. Januar 2005;87(1):125–8.
25. Villaron EM, Almeida J, López-Holgado N, Alcoceba M, Sánchez-Abarca LI, Sanchez-Guijo FM, u. a. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. Dezember 2004;89(12):1421–7.
26. Kmiecik G, Niklińska W, Kuć P, Pancewicz-Wojtkiewicz J, Fil D, Karwowska A, u. a. Fetal membranes as a source of stem cells. *Adv Med Sci*. 2013;58(2):185–95.
27. Antoniadou E, David AL. Placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 10. September 2015;

28. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, u. a. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol.* Januar 2010;25(1):91–8.
29. Magatti M, De Munari S, Vertua E, Nassauto C, Albertini A, Wengler GS, u. a. Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. *Cell Transplant.* 2009;18(8):899–914.
30. Kim S-W, Zhang H-Z, Kim CE, An HS, Kim J-M, Kim MH. Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res.* 1. März 2012;93(3):525–34.
31. Bailo M, Soncini M, Vertua E, Signoroni PB, Sanzone S, Lombardi G, u. a. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation.* 27. November 2004;78(10):1439–48.
32. Arno AI, Amini-Nik S, Blit PH, Al-Shehab M, Belo C, Herer E, u. a. Human Wharton's jelly-mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem Cell Res Ther.* 24. Februar 2014;5(1):28.
33. Aguilera V, Briceño L, Contreras H, Lamperti L, Sepúlveda E, Díaz-Perez F, u. a. Endothelium trans differentiated from Wharton's jelly mesenchymal cells promote tissue regeneration: potential role of soluble pro-angiogenic factors. *PloS One.* 2014;9(11):e111025.
34. Kinzer M, Hingerl K, König J, Reinisch A, Strunk D, Huppertz B, u. a. Mesenchymal stromal cells from the human placenta promote neovascularization in a mouse model in vivo. *Placenta.* Juli 2014;35(7):517–9.
35. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells Dayt Ohio.* Oktober 2007;25(10):2648–59.

36. Choi M, Lee H-S, Naidansaren P, Kim H-K, O E, Cha J-H, u. a. Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *Int J Biochem Cell Biol.* März 2013;45(3):560–70.
37. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, u. a. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med.* August 2007;1(4):296–305.
38. Lang I, Pabst MA, Hiden U, Blaschitz A, Dohr G, Hahn T, u. a. Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur J Cell Biol.* April 2003;82(4):163–73.
39. König J, Huppertz B, Desoye G, Parolini O, Fröhlich JD, Weiss G, u. a. Amnion-derived mesenchymal stromal cells show angiogenic properties but resist differentiation into mature endothelial cells. *Stem Cells Dev.* 20. Mai 2012;21(8):1309–20.
40. Mori R, Power KT, Wang CM, Martin P, Becker DL. Acute downregulation of connexin43 at wound sites leads to a reduced inflammatory response, enhanced keratinocyte proliferation and wound fibroblast migration. *J Cell Sci.* 15. Dezember 2006;119(Pt 24):5193–203.
41. Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* September 2007;87(9):858–70.
42. Metz CN. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. *Cell Mol Life Sci CMLS.* Juli 2003;60(7):1342–50.
43. Lysy PA, Smets F, Sibille C, Najimi M, Sokal EM. Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatol Baltim Md.* November 2007;46(5):1574–85.

44. Haniffa MA, Wang X-N, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, u. a. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. August 2007;179(3):1595–604.
45. Kinzer M. In vivo effects of fibroblasts and mesenchymal stromal cells on angiogenic processes in a mouse model. 2013.
46. BD Biosciences Matrigel.pdf [Internet]. [zitiert 11. Februar 2016]. Verfügbar unter: <http://bd.com/resource.aspx?IDX=17841>
47. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*. Mai 2010;10(9):1886–90.
48. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*. Oktober 2005;15(5):378–86.
49. Haslik W, Kamolz L-P, Manna F, Hladik M, Rath T, Frey M. Management of full-thickness skin defects in the hand and wrist region: first long-term experiences with the dermal matrix Matriderm. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS*. Februar 2010;63(2):360–4.
50. Haslik W, Kamolz L-P, Nathschläger G, Andel H, Meissl G, Frey M. First experiences with the collagen-elastin matrix Matriderm as a dermal substitute in severe burn injuries of the hand. *Burns J Int Soc Burn Inj*. Mai 2007;33(3):364–8.
51. Heckmann A, Radtke C, Rennekampff HO, Jokuszies A, Weyand B, Vogt PM. Einzeitige Defektdeckung von denudiertem Knochen und freiliegenden Sehnen mittels MATRIDERM® und Spalthaut: Möglichkeiten und Grenzen. *Unfallchirurg*. Dezember 2012;115(12):1092–8.

52. MatriDerm 2015 - MatriDerm_2015.pdf [Internet]. [zitiert 2. Dezember 2015].
Verfügbar unter:
http://www.sorbionaustria.at/fileadmin/Bibliothek/Fortbildungen_AT/Praesentationen_fuer_FB/MatriDerm_2015.pdf
53. MatriDermBroschuere_2014.pdf [Internet]. [zitiert 26. November 2015].
Verfügbar unter:
http://www.sorbionaustria.at/fileadmin/Bibliothek/pdf_Dokumente/MatriDermBroschuere_2014.pdf
54. El Omar R, Beroud J, Stoltz J-F, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev.* Oktober 2014;20(5):523–44.
55. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev.* März 2008;129(3):163–73.
56. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* Dezember 2003;33(6):919–26.
57. Marcus AJ, Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *J Cell Mol Med.* Juni 2008;12(3):730–42.
58. Batsali AK, Kastrinaki M-C, Papadaki HA, Pontikoglou C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* März 2013;8(2):144–55.
59. Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, u. a. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet.* 2000;45(3):171–6.

60. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. Transplantation. 15. März 2005;79(5):528–35.
61. Liu T, Wu J, Huang Q, Hou Y, Jiang Z, Zang S, u. a. Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. Shock Augusta Ga. Mai 2008;29(5):603–11.
62. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. J Immunol Baltim Md 1950. 15. Februar 2008;180(4):2581–7.
63. Zahorec P, Koller J, Danisovic L, Bohac M. Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy. Cell Tissue Bank. März 2015;16(1):19–26.
64. Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? Placenta. Januar 2009;30(1):2–10.
65. Böttcher-Haberzeth S, Biedermann T, Schiestl C, Hartmann-Fritsch F, Schneider J, Reichmann E, u. a. Matriderm® 1 mm versus Integra® Single Layer 1.3 mm for one-step closure of full thickness skin defects: a comparative experimental study in rats. Pediatr Surg Int. Februar 2012;28(2):171–7.