

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HALS-NASEN-UND-OHRENHEILKUNDE
PROF. DR. MED. CHRISTOPHER BOHR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effekte von plättchenreichem Plasma
auf Schlüsselzellen der kutanen
Wundheilung nach externer
Bestrahlung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Humanmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nadine Katharina Schuster

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HALS-NASEN-UND-OHRENHEILKUNDE
PROF. DR. MED. CHRISTOPHER BOHR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effekte von plättchenreichem Plasma
auf Schlüsselzellen der kutanen
Wundheilung nach externer
Bestrahlung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Humanmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nadine Katharina Schuster

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. med. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Frank Haubner

2. Berichterstatter: Prof Dr. Dr. med. Lukas Prantl PhD

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	6
1.1 Physiologische Phasen der kutanen Wundheilung	6
1.2 Wundheilungsstörungen	11
1.2.1 Lokale Faktoren	11
1.2.2 Systemische Faktoren	12
1.2.3 Auswirkungen der Strahlentherapie.....	14
1.2.3.1 Akute Strahleneffekte.....	15
1.2.3.2 Chronische Strahleneffekte.....	16
1.2.4 Fettstammzellen als Therapieansatz.....	18
1.3 Lösliche Mediatoren der Wundheilung im Überblick	20
1.3.1 Wachstumsfaktoren.....	20
1.3.1.1 Basic Fibroblast Growth Factor	20
1.3.1.2 Platelet-Derived Growth Factor	21
1.3.1.3 Vascular Endothelial Growth Factor	21
1.3.2 Interleukin-6.....	22
1.3.3 Adhäsionsmoleküle: soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 und soluble Vascular Cellular Adhesion Molecule-1	23
1.4 Vaskuläre Mikroarchitektur und Gefäßbildung	24
1.4.1 Angiogenesestudien mittels Tube Formation Assay	24
1.4.2 Gefäßbildung	25
1.5 Plättchenreiches Plasma	26
1.5.1 Freisetzung der Wachstumsfaktoren und Wirkung von plättchenreichem Plasma.....	27
1.5.2 Anwendungsbereiche.....	28
1.6 Ziel der Arbeit	29
2. Material	30
2.1 Zelllinien und Thrombozytenkonzentrat	30
2.2 Nähr- und Einfriermedien	31
2.3 Chemikalien und Lösungen	32
2.4 Kits und Antikörper	34
2.5 Verbrauchsmaterial und Pipettierhilfen	36

2.6	Geräte	37
3.	Methoden	38
3.1	Zellkultur	38
3.1.1	Steriles Arbeiten mit Zellkulturen.....	38
3.1.2	Auftauen der Zellen	38
3.1.3	Passagieren/Splitting/Trypsinieren der Zellen.....	39
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl	39
3.1.4.1	mittels Hämozytometer (Neubauer Zählkammer).....	39
3.1.4.2	mittels Casy® Zellzählautomat	40
3.1.5	Einfrieren der Zellen	40
3.2	Plättchenreiches Plasma	40
3.2.1	Kooperation mit der Blutbank.....	41
3.2.2	Herstellung von plättchenreichem Plasma/Releasat.....	41
3.3	Zellkulturexperimente	41
3.3.1	Aufbau und Ablauf des Bestrahlungsversuches	42
3.3.1.1	Ansatz des Bestrahlungsversuches.....	42
3.3.1.2	Bestrahlung.....	43
3.3.1.3	Zugabe von plättchenreichem Plasma	44
3.3.1.4	Abnahme des Bestrahlungsversuches.....	45
3.3.1.5	Vorversuch zur Etablierung des Versuchsprotokolls.....	45
3.3.1.6	Etabliertes Versuchsprotokoll	46
3.3.2	Angiogenese-Assay (<i>Tube Formation-Assay</i>)	46
3.3.2.1	Ansatz des Versuches	46
3.3.2.2	Bestrahlung und PRP-Zugabe.....	47
3.4	Immunhistochemie	47
3.4.1	Fixierung.....	47
3.4.2	CD31-Färbung.....	47
3.5	Proteinexpressionsanalyse mittels ELISA	49
3.6	Statistische Auswertung	50
3.6.1	Statistische Auswertung des Bestrahlungsversuches	50
3.6.2	Statistische Auswertung des Tube Formation-Assay's.....	51
4.	Ergebnisse	53
4.1	Viabilität der Zellen im Vorversuch zum Bestrahlungsversuch	53
4.2	Zellzahlen im Bestrahlungsversuch	55

4.2.1	Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungsdosen auf die Zellviabilität	55
4.2.2	PRP-Effekt auf die Zellzahlen im Bestrahlungsversuch	56
4.3	Einfluss externer Bestrahlung auf die Proteinexpression löslicher Mediatoren	59
4.3.1	Einfluss zunehmender Strahlenintensität auf die Proteinexpression von hASC und HDMEC.....	59
4.3.2	Einfluss von PRP auf die Expression löslicher Mediatoren nach externer Bestrahlung.....	62
4.4	Auswirkungen von Bestrahlung auf die Bildung tubulärer Komplexe im Tube Assay	68
5.	Diskussion	72
5.1	Zellzahlen im Bestrahlungsversuch	72
5.1.1	Auswirkungen zunehmender ionisierender Strahlung auf die Viabilität	72
5.1.2	Auswirkungen von 5% bzw. 10% PRP auf die Zellzahl von hASC und HDMEC in Mono- und Ko-Kultur	74
5.2	Proteinexpression im Bestrahlungsversuch nach Bestrahlung und PRP- Behandlung	76
5.3	Auswirkungen ionisierender Strahlung auf die Fähigkeit von HDMEC kapillar ähnliche Strukturen zu bilden	83
6.	Zusammenfassung	85
7.	Anhang	88
7.1	Abbildungsverzeichnis	88
7.2	Tabellenverzeichnis	91
7.3	Abkürzungsverzeichnis	92
8.	Referenzen	95

1. Einleitung

1.1 Physiologische Phasen der kutanen Wundheilung

Grenzflächen des menschlichen Körpers zur Außenwelt stellen potentielle Eintrittspforten für Bakterien und andere Pathogene dar. Neben dem Darm und den Schleimhäuten trägt vor allem die Haut als schützender Mantel zur körpereigenen Abwehr bei ¹. Bei Verletzungen dieser natürlichen Barriere ist der gesunde Körper durch komplexe Regenerations- und Reparaturmechanismen in der Lage, zuverlässig und schnell für eine physiologische Wundheilung zu sorgen. Diese verläuft grundsätzlich in drei dynamischen, sich zeitlich überlappenden Phasen, die in den unterschiedlichen Hautschichten simultan stattfinden ^{2,3}. Die Phasen werden unterteilt in die Entzündungs- oder exsudative Phase, die Proliferations-/ Granulationsphase und die Reparations- oder Epithelisierungsphase ³ (Abb.1).

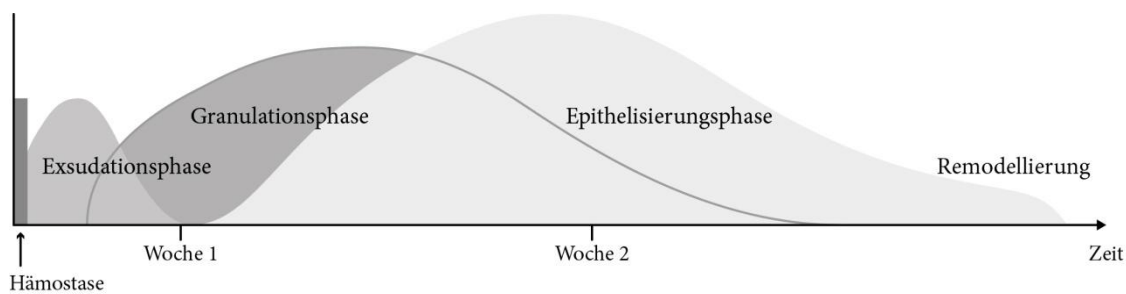


Abbildung 1: Phasen der kutanen Wundheilung im zeitlichen Verlauf

Die erste Phase beginnt unmittelbar mit Eintreten der Verletzung und dauert bis zum 4.-6. Tag nach an. Sie ist gekennzeichnet durch Hämostase und eine nachfolgende Entzündungsreaktion (exsudative Phase) ⁴. Im Zuge eines Traumas kommt es zum Zerreißen von Blutgefäßen und damit zur Freilegung von subendotheliale Kollagen, sowie weiteren Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM), die die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten auslösen. Gleichzeitig wird die Gerinnungskaskade initiiert, wodurch zum einen das Komplementsystem aktiviert wird ⁵ und zum anderen Fibrinogen durch Thrombin enzymatisch zu Fibrin umgesetzt wird. Es entsteht ein Fibrinpfropf, der die Wunde ausfüllt und neben anderen vasoaktiven Substanzen, wie Thromboxan A₂, zur Hämostase beiträgt ³. Zusätzlich stellt der Fibrinpfropf, hauptsächlich bestehend aus Thrombozyten, Fibrin und Fibronectin, die provisorische Matrix für die spätere Zellmigration beispielsweise aus

dem Blut in den Wundbereich dar ⁶. Zytokine, wie Interleukin (IL) -1, Tumornekrosefaktor (TNF), *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) und Plättchen Faktor-4 (PF-4) wirken chemotaktisch auf Leukozyten, die für die Infektabwehr und Reinigung der Wunde von Detritus notwendig sind ⁷⁻⁹.

Einen weiteren Schritt der Wundheilungskaskade stellt die Aktivierung des Endothels der angrenzenden Mikrogefäße mit nachfolgender Extravasation der Leukozyten dar. Um Makrophagen und Granulozyten zur Migration aus dem Intravasalraum zu aktivieren, induzieren TNF, IL-1 oder Bakterienbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1), *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) oder E-Selektin auf Endothelzellen ¹⁰⁻¹². Leukozyten adhäreren über Liganden auf ihrer Oberfläche an das aktivierte Endothel und wandern dann in das Interstitium aus (Diapedese). *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) aus aktivierten Makrophagen sorgt für eine verstärkte Vasodilatation, wodurch zum einen die Fließgeschwindigkeit des Blutes abnimmt und zum anderen Lücken für die Diapedese entstehen ¹³. Proteasen, die aus den Granula von Leukozyten freigesetzt werden, tragen zur Reinigung der Wunde von Zelldetritus bei ⁹. Anfangs bilden neutrophile Granulozyten den Hauptanteil der eingewanderten Leukozyten ¹⁴. Gegen Ende der exsudativen Phase erfolgt die Phagozytose der Leukozyten durch Makrophagen ¹⁵. Sowohl durch die aktivierten Thrombozyten im Fibrinpfropf, als auch durch aktivierte Monozyten (Makrophagen), werden schon zu Beginn der Entzündungsphase kontinuierlich Wachstumsfaktoren freigesetzt ^{3,16}. Im wesentlichen handelt es sich um *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), TGF-β ¹⁶ und VEGF ¹⁷, die aus den α-Granula der Thrombozyten sezerniert werden (siehe Abb.2). Zusammen mit gewebeabbauenden Enzymen aus Makrophagen, wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Elastase, induzieren sie den Übergang von der katabolen Entzündungsphase zur anabolen Proliferationsphase ¹⁵.

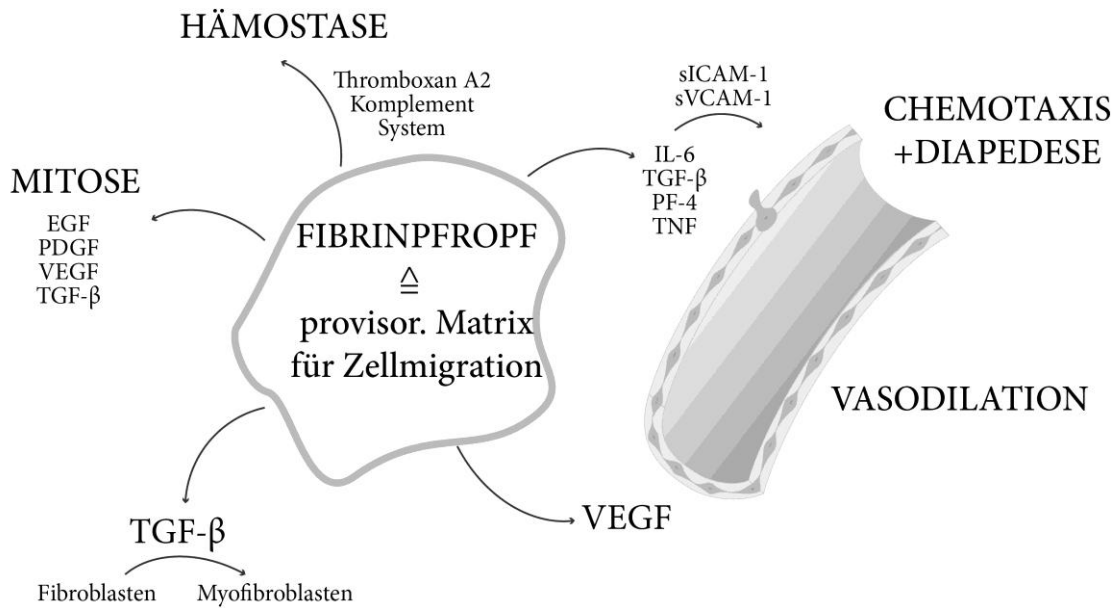


Abbildung 2: Fibrinpfropf mit freigesetzten Mediatoren

Die proliferative Phase (Tag 4-14) wird geprägt durch eine vom Wundrand ausgehende Re-Epithelialisierung, Angiogenese, der Bildung von Granulationsgewebe und dem Beginn der Kollagensynthese³. Zytokine, wie TNF, IL-1 und IL-6 geben den initialen Stimulus zur vermehrten Expression und Sekretion von Wachstumsfaktoren. So sezernieren beispielsweise aktivierte ortständige Fibroblasten vor allem *Keratinocyte Growth Factor* (KGF)¹⁸, um Epidermiszellen zur Proliferation anzuregen und die Wunde vom Rand aus reißverschlussartig zu schließen. Aktivierte Thrombozyten hingegen setzen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, wie z.B. *Epidermal Growth Factor* (EGF), PDGF-AB, VEGF und TGF-β frei, die diesen Vorgang unterstützen¹⁹. Außerdem werden dadurch weitere Keratinozyten, Angioblasten und Fibroblasten in das Wundgebiet gelockt und zur Proliferation angeregt²⁰. Fibrinolytische Substanzen, wie z.B. Plasminogen-Aktivator, die von Makrophagen und Fibroblasten synthetisiert wurden, führen zum Abbau der provisorischen Matrix des Fibrinpfropfs²¹. Um den immensen Sauerstoff- und Nährstoffbedarf des lokalen Metabolismus zu gewährleisten, ist eine suffiziente Gefäßversorgung unentbehrlich. Der Neovaskularisierung kommt daher eine zentrale Bedeutung in der proliferativen Phase zu. Endothelzellen spielen als Organisatoren und Regulatoren der Wundheilung eine Schlüsselrolle²². Angiogene Wachstumsfaktoren, wie *acidic Fibroblast Growth Factor* (aFGF), *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF/FGF-2) oder VEGF, die von Makrophagen und Endothelzellen

sezerniert werden, bewirken die Migration von Endothelzellen aus intakten Venolen durch die Gefäßwand und stimulieren die Proliferation und Gefäßneubildung^{23,24}. Gleichzeitig induzieren z.B. Plasminogen-Aktivatoren und Kollagenasen durch Abbau von Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen der EZM das Aussprossen neuer Gefäße in die Wundregion^{25,26}. So entstehen helle Gefäßknospen auf einem gut durchbluteten Untergrund, was 1787 zur Namensgebung des Granulationsgewebes führte. Fibroblasten stellen, neben den Endothelzellen, die weiteren Schlüsselzellen der proliferativen Phase dar²⁰. Durch PDGF, FGF, TGF- β und Zytokine angezogen und aktiviert, proliferieren sie und produzieren EZM-Bestandteile bis der Wunddefekt wieder aufgefüllt ist²⁷. Nach Wundverschluss werden die verbliebenen Fibroblasten durch Apoptose oder Phagozytose entfernt und zellreiches Granulationsgewebe wird durch azelluläres Narbengewebe ersetzt³.

Bereits ab dem 8. Tag der Wundheilung setzt die Reparationsphase ein. Kennzeichen dieser letzten Phase der Wundheilung sind die korrekte Einlagerung der Kollagenfibrillen, sowie das Remodelling des Narbengewebes³. Unverletztes Gewebe besteht zu 80-90% aus Kollagen Typ I und zu 10-20% aus Kollagen Typ III. Im Vergleich dazu enthält Granulationsgewebe durchschnittlich 30% Kollagen Typ III, während in Narbengewebe nur noch ca. 10% Kollagen Typ III vorhanden ist²⁷. Wechselnde Konzentrationsspiegel von TGF- β , IL-1, EGF und PDGF, wie auch das Gleichgewicht zwischen abbauenden MMP und deren Gegenspielern den *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs), sind entscheidend für eine ungestörte Wundheilung²⁸. Das Remodelling verläuft noch Wochen und Monate nach Beginn der Wundheilung²⁹. Zudem wandeln sich ortsständige Fibroblasten, die nicht mehr zur Kollagensynthese benötigt werden, unter TGF- β -Einfluss zu Myofibroblasten um und treiben dadurch die Kontraktion der Wundränder bzw. den Wundverschluss aktiv voran³⁰. Zuletzt wird die Wundoberfläche vollständig epithelialisiert und die Wunde verschlossen. Anfangs zeigen sich Narben oft erhaben und leicht gerötet, blassen dann jedoch bei normalem Verlauf deutlich ab und fügen sich ins Hautniveau ein³.

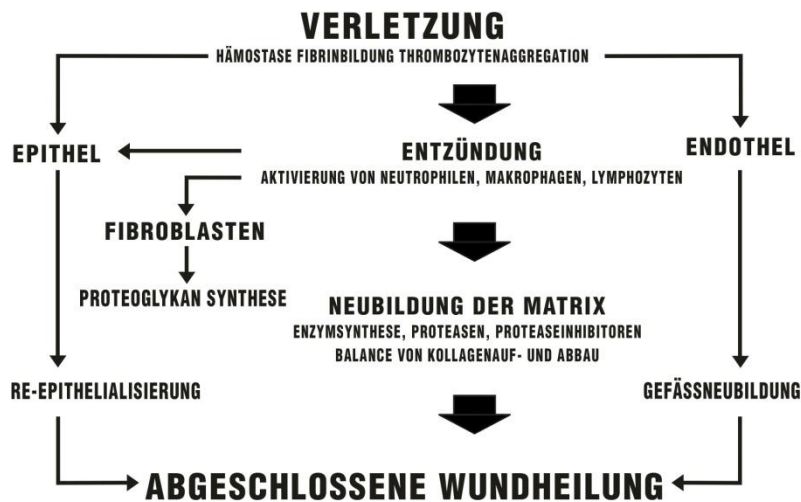


Abbildung 3: Schema der physiologischen Wundheilung von der Wundsetzung bis zur abgeschlossenen Wundheilung adaptiert von Haubner³¹

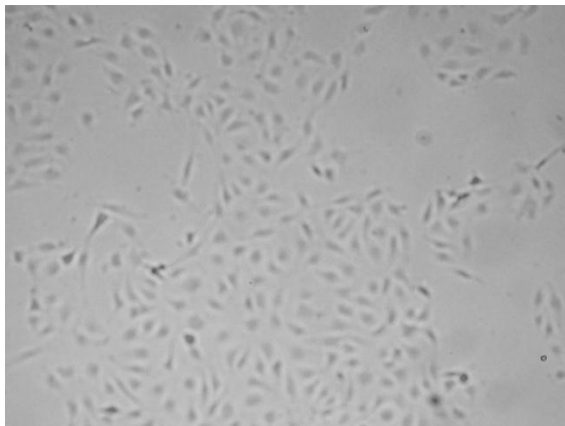


Abbildung 4: lichtmikroskopische Aufnahme der humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) der Passage 4 mit 5-facher Vergrößerung.

Endothelzellen

- Extravasation und Diapedese von Leukozyten und Makrophagen über Adhäsionsmoleküle (Exsudativen Phase)
- Migration aus intakten Venolen zur Gefäßneubildung (proliferative Phase)

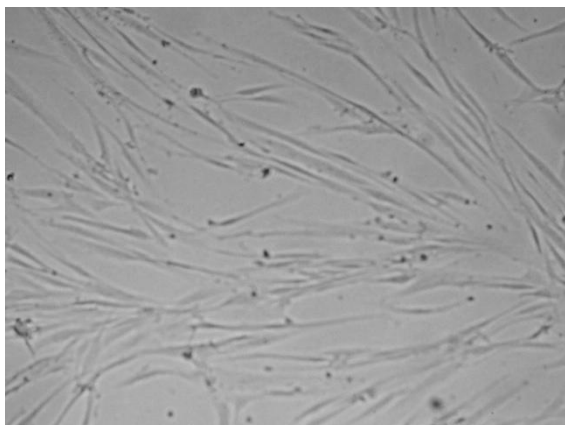


Abbildung 5: lichtmikroskopische Aufnahme von pulmonalen Fibroblasten der Passage 7 mit 10-facher Vergrößerung

Fibroblasten

- Synthese von fibrinolytischen Substanzen zum Abbau der provisorischen Matrix (proliferativen Phase)
- Auffüllung des Wunddefekts (proliferative Phase)
- Umwandlung in Myofibroblasten zur aktiven Adaptation der Wundränder (Reparationsphase)

Abbildung 4 und 5 sollen die Hauptaufgaben von Endothelzellen und Fibroblasten in der Wundheilung nochmals zusammenfassen. Sie stellen unter anderen die Schlüsselzellen der kutanen Wundheilung dar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Wundheilung eine Abfolge komplexer biochemischer Prozesse darstellt, in die zahlreiche Zelltypen, Wachstumsfaktoren und weitere lösliche Mediatoren eingebunden sind. Grundlage dafür ist ein koordiniertes Ineinandergreifen fein aufeinander abgestimmter Mechanismen (siehe Abb.3).

1.2 Wundheilungsstörungen

Störungen des sensiblen Gleichgewichts der verschiedenen Wundheilungsprozesse einer akut ablaufenden, physiologischen Wundheilung können zu Verzögerungen oder einem chronischen Verlauf führen³². Im Allgemeinen können diese Störungen in lokale und systemische Faktoren eingeteilt werden²⁹.

1.2.1 Lokale Faktoren

Grundsätzlich spielen Ausdehnung, Tiefe, Morphologie (Sehnen-/Knochengewebe), Verschmutzungsgrad und Lokalisation der Wunde eine große Rolle im Heilungsprozess. Wunden im Kopf-/Halsbereich heilen aufgrund der besseren Durchblutung und des niedrigeren Infektionsrisikos schneller als beispielsweise Wunden in der Inguinalregion. Gewebeschonendes Vorgehen bei Operationen, Schnittführung entlang von Spannungslinien, Verwendung von Saugdrainagen, sowie Nahttechnik und –material können die Wundheilung positiv beeinflussen. Allerdings können in die Wunde eingebrachte Fremdkörper, wie Nahtmaterial oder Implantate, auch als Nährboden für Bakterien dienen und eine Infektion weiter unterhalten³³. Nahezu alle Wunden sind mit mikrobiellen Organismen kolonialisiert. Dies führt per se jedoch noch nicht zu Heilungsverzögerungen, da die Entzündung einen wichtigen Abschnitt der physiologischen Wundheilung darstellt und die Anwesenheit subinfektiöser Bakterienmengen die Heilung bisweilen sogar

beschleunigt. Eine Keimzahl von über 100.000 Bakterien pro Gramm Gewebe wird indes als Wundinfektion bezeichnet und gehört mit zu den häufigsten lokalen Faktoren von Wundheilungsstörungen³⁴. Pathogene bakterielle Bestandteile, wie beispielsweise LPS aus der Zellmembran, führen zur Ausschüttung großer Mengen proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, TNF), wodurch es zu einer gesteigerten Synthese von MMP, bei gleichzeitig erniedrigter Produktion von TIMPs, kommt. Dadurch wird insgesamt die Entzündungsphase verlängert und die nachfolgenden Phasen verzögert^{35,36}. Das Resultat der pathologischen exsudativen Phase ist eine nicht heilende Wunde, die zu einer weiteren Zunahme der Entzündung führt³⁷.

Akute Wundheilung	chronische Wundheilung
<ul style="list-style-type: none"> • normale mitogene Aktivität • normale MMP/TIMP Ratio • EZM-Ablagerung • selbstlimitierende Entzündung • normale Konzentration an Wachstumsfaktoren • Wundheilung < 3 Monate 	<ul style="list-style-type: none"> • wenig mitogene Aktivität • schnell alternde Fibroblasten • hohe MMP-Spiegel, niedrige TIMP-Konzentration • EZM-Degradierung • unkontrollierte Entzündung • verminderte Konzentration an Wachstumsfaktoren • keine Heilungstendenz > 8 Wochen

Abbildung 6: Merkmale der akuten und chronischen Wundheilung³⁷

1.2.2 Systemische Faktoren

Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Stress, Medikamenteneinnahme, hohes Lebensalter, Alkoholismus, nutritive Defizite und maligne Neoplasien sind nur einige Beispiele, die das Risiko einer chronischen Wundheilungsstörung erhöhen^{29,33}.

Diabetes mellitus oder Nikotinabusus führen allgemein zur Entwicklung von Durchblutungsstörungen, die eine dauerhaft mangelnde Oxygenierung des Gewebes bewirken und so die Wundheilung negativ beeinflussen. Kurzzeitige Hypoxie, wie sie in der initialen Phase der Entzündungsreaktion vorkommt, ist wichtig, da sie die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, die Angiogenese, sowie die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* (ROS)) stimuliert. ROS selbst regen in niedriger Konzentration die Neovaskularisierung an und wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Sie tragen daher zur

Infektionsprävention bei ³⁸. In chronischen Wunden wurde eine anhaltende Hypoxie nachgewiesen, wodurch dem Metabolismus weniger Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zur Verfügung steht ²⁹. Bei Diabetes mellitus wird der ATP-Mangel zusätzlich noch verstärkt, da durch fehlendes Insulin kaum Glukose als Energielieferant verstoffwechselt werden kann. Die entstehende Hyperglykämie verursacht eine Dysfunktion der Phagozytose durch Makrophagen und erhöht damit die Gefahr einer Wundinfektion ³⁹. Weiterhin verursacht Diabetes mellitus die Freisetzung hoher MMP-Konzentrationen, Defekte in der T-Zell Immunität, die erniedrigte Freisetzung von Wachstumsfaktoren und die Fehlfunktion von Fibroblasten und Epidermiszellen ²⁹. 15% der Patienten mit Diabetes mellitus weisen daher schlecht oder nicht heilende Fußulzera auf, die in 85% der Fälle zur Amputation führen ⁴⁰.

Während Diabetes mellitus vorrangig Mikrozirkulationsstörungen verursacht, wird durch Nikotinabusus und Stress eher eine generelle Vasokonstriktion durch Katecholaminausschüttung induziert ^{41,42}. Rauchen sorgt für eine Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff, da das aufgenommene Kohlenstoffmonoxid den Sauerstofftransport des Hämoglobin hemmt ⁴². Bei Stress werden neben Katecholaminen auch vermehrt Glukokortikoide ausgeschüttet, die die Fibroblastenproliferation supprimieren. Es kommt zu einer mangelhaften Ausbildung von Granulationsgewebe, als Folge einer verminderten Kollagensynthese ²⁹. Den gleichen Effekt haben auch therapeutisch angewandte Glukokortikoide, wie z.B. Dexamethason, die außerdem über eine Hemmung des *Hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) die Bildung von VEGF stören ⁴³. Wundheilungsstörungen können auch durch eine Reihe anderer Medikamente begünstigt werden. Nichtsteroidale Antirheumatika (*non-steroidal anti inflammatory drugs*, NSAID) hemmen z. T. irreversibel die Thrombozytenaggregation und greifen damit in die Hämostase ein ⁴⁴. Auch die Synthese wichtiger Prostaglandine wird über die Applikation von NSAID eingeschränkt, was bei Langzeiteinnahme zu einer herabgesetzten Immunantwort führen kann ⁴⁵.

Veränderungen in der Wundheilung werden zudem mit einem erhöhten Lebensalter (>60 Jahren) assoziiert ^{29,33}. Die Wundheilungsstadien laufen zwar weiterhin in korrekter Reihenfolge ab, sind in sich jedoch verzögert. Desweiteren wurden auch auf zellulärer Ebene Unterschiede festgestellt. Eine höhere Anzahl an Makrophagen

wandert in der exsudativen Phase in den Wundgrund ein, zeigen aber eine deutlich verringerte Phagozytoseleistung⁴⁶. Tierexperimentell konnte in alten Mäusen außerdem eine Prolongation in der Neovaskularisierungsphase, der Kollagensynthese und der Re-Epithelialisierung festgestellt werden^{47,48}. Das entstandene Narbengewebe war mit dem von jüngeren Patienten vergleichbar³³.

Weiterhin hat sich gezeigt, dass sich nutritive Defizite ebenfalls negativ auf den Heilungsprozess auswirken können. Insbesondere nach Traumen oder Operationen kann eine Nährstoffdefizienz schwerwiegende Folgen im Rahmen der Wundheilung haben. Die wichtigste Rolle im Bereich der Ernährung spielen Proteine. Die Aminosäuren Arginin und Glutamin sind unentbehrlich für die Kollagensynthese und die Bildung neuer Gefäße, sie sorgen für Wundfestigkeit und schützen vor Wundinfektionen indem sie T-Zellen stimulieren^{29,49}. Die Ernährungssituation spielt auch bei Krebspatienten eine wichtige Rolle, besonders bei der chirurgischen Behandlung von Rezidiven. Patienten mit malignen Neoplasien weisen oft einen katabolen Stoffwechsel auf und können daher kachektisch werden³³. So sind beispielsweise bis zu 57% der Patienten mit Kopf- und Halstumoren von Mangelernährung betroffen⁵⁰. Eventuell vorbestehende nutritive Defizite werden nicht allein durch die Lokalisation des Tumors, sondern auch durch weitere Symptome, wie Trismus, Odyno- und Dysphagie verstärkt, die die Nahrungsaufnahme erschweren. Die therapeutisch angewandten Methoden bei Kopf- und Halstumoren verursachen häufig zusätzlich Ernährungsprobleme. Neben zum Teil ausgedehnten chirurgischen Eingriffen im Bereich des Aerodigestivtrakts, führt insbesondere die adjuvante Strahlentherapie zu Komplikationen in der Wundheilung⁵⁰.

1.2.3 Auswirkungen der Strahlentherapie

Die Strahlentherapie zählt zwar zu den lokalen Faktoren, die die Wundheilung beeinflussen³³, sie hat aber zusätzlich auch systemische Auswirkungen auf den Organismus wie z.B. durch Induktion einer Immunsuppression²⁹. Etwa 70% aller Tumorpatienten erhalten in einer Phase ihrer Erkrankung Strahlentherapie⁵¹. Trotz des kontinuierlichen Fortschritts im Therapieregime ist es bisher jedoch noch nicht möglich Tumorgewebe zu bestrahlen, ohne Nebeneffekte am angrenzenden

gesunden Gewebe hinnehmen zu müssen. Hierbei unterscheidet man die direkten Schäden ionisierender Strahlung auf die Desoxyribonukleinsäure (DNS) von den indirekten Schäden, die durch Hydroxylradikale (OH^-) entstehen^{52,53}. Desweiteren können die Folgen der strahleninduzierten Schäden in akute und chronische Effekte eingeteilt werden. Auftretenszeitpunkt, Dauer und Schwere der Strahleneffekte hängen sowohl von therapiebezogenen (Höhe der Einzel- und Gesamtdosis, Therapieschema, Gewebeart und Volumen des zu bestrahlenden Gewebes) als auch von patientenbezogenen Faktoren ab (z.B. genetische Erkrankungen, die DNS-Reparaturmechanismen betreffen)⁵¹.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich auf Effekte der Strahlentherapie bei Kopf- und Halstumoren eingegangen. Diese betreffen hauptsächlich Veränderungen im Bereich der Haut, der Schleimhäute und der Speicheldrüsen, aber auch die des Knochengewebes⁵⁴.

1.2.3.1 Akute Strahleneffekte

Die frühen oder akuten Effekte der Strahlentherapie werden vorwiegend an Geweben beobachtet, die einen schnellen Zellzyklus aufweisen. Dazu gehören neben dem Knochenmark und den Zellen des Gastrointestinaltrakts auch die Haut und die Schleimhäute⁵⁵. Noch während der Strahlentherapie kommt es innerhalb dieser Gewebe zu einer kompensatorischen Proliferationssteigerung, die meist noch vor Abschluss der Behandlung zum Abklingen der Symptome führt⁵⁴. Die Haut reagiert auf ionisierende Strahlung mit einer Entzündungsreaktion, die klinisch in vier Grade eingeteilt werden kann⁵⁶. Grad 1 ist verbunden mit dem Auftreten von Erythemen, Juckreiz, Haarausfall und trockener Schuppung. Im Verlauf entwickelt sich daraus eine in Hautfalten auftretende, feuchte Desquamation, begleitet von ödematösen Erythemen (Grad 2). Grad 3 umfasst die fortgeschrittene feuchte Desquamation anderer Hautareale, die letztendlich in Nekrosen und Ulzera endet (Grad 4)⁵⁶. Neben der Haut können auch die gesunde Mundschleimhaut, sowie die Speicheldrüsen durch die Strahlentherapie geschädigt werden. Hieraus resultiert in den meisten Fällen eine Xerostomie, die nicht nur die Lebensqualität der Patienten massiv einschränkt, sondern über Karies auch zu Infektionen des Kiefers und letztendlich zu Osteoradionekrosen führen kann^{54,57}.

Auf zellulärer Ebene kommt es nach externer Radiatio zu einer Überproduktion pro-inflammatorischer Zytokine und gestörten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Zu den involvierten Zytokinen und Wachstumsfaktoren gehören IL-1, -6, -8, TNF und TGF- β ⁵⁸. Persistiert die Überproduktion, entsteht eine unkontrollierte Anhäufung von EZM mit einer anschließenden Fibrosierung des Gewebes. Im Bereich der Gefäße aktiviert Bestrahlung über Zytokine Endothelzellen und vermindert über eine Hochregulation der Endothelzelladhäsionsmoleküle (wie ICAM, VCAM und E-Selektin) die Fließgeschwindigkeit der Leukozyten in den Gefäßen. Vor allem neutrophile Granulozyten interagieren so vermehrt mit Endothelzellen und bewirken dadurch die Entstehung einer vaskulären Dysfunktion⁵⁹. Desweiteren leitet ionisierende Strahlung die Proliferation von Zellen der Gefäßinnenwand (Tunica Intima) ein, was die Thrombosierung der kleinen Gefäße zur Folge hat.

1.2.3.2 Chronische Strahleneffekte

In Bezug auf chronische Strahleneffekte lassen fehlende Feedbackmechanismen, sowie veränderte Konzentrationsspiegel von TGF- β , Fibroblasten kontinuierlich proliferieren, was die Entstehung einer Fibrose stark fördert und die Bildung neuer Gefäße supprimiert⁵². Die langsam entstehende Bindegewebsfibrose verstärkt zusätzlich die Obliteration der Mikrogefäße und vermindert die Diffusion von Sauerstoff ins Gewebe, wodurch es zur Hypoxie kommt⁵³. Klinische Zeichen der Gewebhypoxie sind Teleangiektasien, die durch Vasodilatation verbliebener, noch funktionstüchtiger Kapillaren entstehen und zu den chronischen Strahleneffekten gezählt werden⁵¹. Weitere späte Effekte sind Pigmentierungsstörungen, Hypohidrosis sowie Hautatrophien und –ulzera, die teilweise erst Monate bis Jahre nach Abschluss der Strahlentherapie auftreten können^{31,56}. Insgesamt werden weniger pro-angiogene und proliferative Faktoren freigesetzt, während die Konzentrationen von Matrixmetalloproteinasen ansteigen, die, wie unter 1.2.1 bereits erwähnt, Wundheilungsstörungen hervorrufen können⁶⁰. Störungen der Wundheilung zählen auch zu den Spätfolgen externer Bestrahlung. Dabei muss man unterscheiden, in welcher zeitlichen Abfolge Wundsetzung und Strahlenexposition zueinander stehen. Neoadjuvante Strahlentherapie, wie sie beispielsweise in der Behandlung von Darmkrebs angewendet wird, erhöht das Risiko einer

Wundinfektion, der Wunddehiszenz und der Bildung von Fisteln oder der Entstehung von Nekrosen durch die oben beschriebenen Folgen der Gewebehypoxie⁵¹. Stark geschädigte Fibroblasten synthetisieren weniger Kollagen und reagieren schwächer auf Wachstumsfaktoren. Als Resultat kommt es zur Hautatrophie. Re-Epithelialisierungs- und Pigmentierungsstörungen entstehen aufgrund von geschädigten Keratinozyten und Melanozyten⁶¹. Erfolgt die Bestrahlung nach der Wundsetzung als adjuvante Therapie, sind besonders die ersten beiden Phasen der Wundheilung betroffen. Die betroffenen Zellen, wie Leukozyten, sind hochproliferativ und daher sehr strahlensensibel. Bestrahlung verringert so die Anzahl der Leukozyten, wirkt aber ebenfalls auf Fibroblasten, die entweder zur Apoptose gebracht werden oder nur noch wenig Kollagen Typ I und III synthetisieren⁵¹. Nach Bestrahlung können Wunden dadurch leichter infiziert werden und sich zu chronischen, nicht heilenden Wunden entwickeln. Fibroblasten aus den Wundrändern chronischer Wunden zeigten in Studien ein vermindertes Ansprechen auf Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β ^{62,63}. Dies kann ein Grund für fehlerhafte oder mangelhafte Produktion extrazellulärer Matrix sein und damit den Wundverschluss verzögern.

Neben etablierten Therapien der chronischen Wundbehandlung, zu denen die Optimierung des Wundbetts durch Débridement, die Reduktion des Wundödems und der Bakterienlast oder die Anwendung von hyperbarem Sauerstoff gehören^{64,65}, wurden in den letzten Jahren vermehrt Studien mit mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSC) als Therapie durchgeführt, die vielversprechende Ergebnisse lieferten. Speziell die aus dem Knochenmark stammende mesenchymale Stammzellpopulation (*bone marrow derived mesenchymal stem cells*, BM-MSC) wurde initial verstärkt untersucht. Markierte BM-MSC konnten in Blutgefäßen und Talgdrüsen von abgeheilten Verletzungen nachgewiesen werden⁶⁶, ein Beweis dafür, dass Stammzellen aus dem Knochenmark emigrieren und an der Wundheilung beteiligt sind. Topische Anwendung der BM-MSC, mittels Injektion in die Wundränder chronischer Wunden, zeigte bei allen Probanden eine signifikant erhöhte Hautdicke und vermehrte Vaskularisierung des Wundbetts mit nachfolgender Abheilung⁶⁷. In einer anderen Studie wurden die Gliedmaßen von immundefizienten Mäusen mit 30 Gy bestrahlt, was zu einer akuten Strahlendermatitis Grad 4 bei unbehandelten Mäusen führte. Mäuse, denen 24 Stunden nach Bestrahlung humane BM-MSC

intravenös injiziert wurden, zeigten hingegen eine deutlich schwächer ausfallende Hautreaktion mit beschleunigter Wundheilung und der Präsenz der transplantierten Zellen in den bestrahlten Gebieten ⁶⁸.

Mesenchymale Stammzellen wirken pro-angiogen, anti-apoptotisch und mitogen. Sie sezernieren Wachstumsfaktoren, wie EGF, *Insulinlike Growth Factor* (IGF-1), KGF, VEGF und Angiopoetin ^{66,69}. Sie modulieren das Immunsystem über Herabregulation von TNF und Interferon- (INF) γ sowie die Hochregulation anti-inflammatorischer Interleukine, wie IL-4 und IL-10 ⁷⁰. MSC sind selbst erneuernd und können in verschiedene Zelllinien (z.B. Epithelzellen, Keratinozyten) differenzieren ⁶⁵. Die Gewinnung von MSC aus dem Knochenmark stellt jedoch eine schmerzhaft, aufwendige Prozedur dar, die nicht jedem Patienten zugemutet werden kann ⁷¹. Desweiteren beeinflusst das Alter des Spenders die Ausbeute an mesenchymalen Stammzellen ⁷².

1.2.4 Fettstammzellen als Therapieansatz

Als alternative Quelle für adulte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark gelten Fettstammzellen (*human adipogenic stem cells*, hASC/*adipose derived stroma/stem cells*, ADSC). Studien zufolge sind mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe den Stammzellen aus dem Knochenmark in Transkriptionsphänotyp und Regenerationspotential sehr ähnlich ⁷³. Sie weisen eine fibroblastoide Morphologie auf und exprimieren die für MSC typischen Oberflächenproteine. Die Isolation der Fettstammzellen ist aber deutlich weniger invasiv und kann deshalb bei einem Großteil der Patienten mit einer Erfolgsquote von fast 100% durchgeführt werden ⁷⁴. Humane ASC sind altersunabhängig in großer Zahl im Fettgewebe vorhanden, lassen sich bei Standardbedingungen leicht kultivieren und haben das Potential in multiple mesodermale Zelllinien (Fett-, Knorpel-, Knochen- und Muskelgewebe) zu differenzieren ⁷⁵. Unter anderem werden hASC als therapeutische Option bei Muskelerkrankungen wie der Duchenne Muskeldystrophie untersucht ⁷⁶. Weiterhin haben hASC auch die Kapazität sich zu Zellen endodermalen Ursprungs (Endothelzellen) ^{77,78} und ektodermalen Ursprungs (Zellen der Epidermis und neuronale Zellen) zu entwickeln ^{73,79}. Bei der physiologisch ablaufenden Wundheilung kommt daher dem Zusammenspiel von endogenen Fettstammzellen

mit dermalen Fibroblasten, Keratinozyten und sezernierten Wachstumsfaktoren eine tragende Rolle zu.

Wie unter dem Kapitel 1.2.3 beschrieben, sind die fehlerhafte oder verminderte Kollagenablagerung durch Fibroblasten, sowie die gestörte Neovaskularisierung und Re-Epithelialisierung die größten Probleme bei der Wundheilung strahleninduzierter Wunden. Zu den positiven Effekten von exogen applizierten, adipogenen Stammzellen auf die Wundheilung gibt es zahlreiche publizierte Studien. So konnte beispielsweise der Einsatz von Fettstammzellen bei der Antifaltentherapie zeigen, dass durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), IGF, PDGF und TGF- β dermale Fibroblasten aktiviert werden und dadurch die Kollagensynthese erhöht wird⁸⁰. Im Tiermodell verringerte sich durch die Integration von hASC in einem topisch appliziertem Kollagengel die Wundgröße signifikant und beschleunigte die Re-Epithelialisierung⁸¹. Auch die Injektion von Fettstammzellen in Wundränder von gesunden oder an Diabetes mellitus erkrankten Ratten erbrachte eine vermehrte Bildung von Granulationsgewebe mit schnellerem Wundverschluss durch Induktion der Vaskulogenese und beschleunigte Re-Epithelialisierung⁷⁹. Der pro-angiogene Effekt der adipogenen Stammzellen wird vermutlich eher durch die Sekretion von HGF als durch die Sekretion von VEGF vermittelt⁸². Andere Autoren legten sowohl durch *in vitro* Experimente⁸³ als auch durch *in vivo* Tierexperimente dar, dass hASC die Fähigkeit besitzen, zu Keratinozyten zu differenzieren⁸⁴. Infolgedessen wird vermehrt KGF sezerniert, was zur Aktivierung von dermalen Fibroblasten führt. Der positive Effekt der adipogenen Stammzellen auf Migration und Proliferation der Keratinozyten scheint weiterhin effizienter als der durch transplantierte dermale Fibroblasten⁷¹. Exogen applizierte hASC konnten auch in einer klinischen Pilotstudie an Patientinnen mit chronischen, irreversiblen Strahlenschäden im Brustbereich Verbesserungen der Vaskularisierung im geschädigten Gebiet induzieren^{85,86}. Dies wurde zum einen auf die Fähigkeit der Fettstammzellen zu Endothelzellen zu differenzieren zurückgeführt und zum anderen wurden pro-angiogene Faktoren identifiziert, die über Induktion der Mikrogefäßbildung zu einer verbesserten Oxygenierung des Gewebes führten. Dadurch wirken sich hASC nicht nur pro-angiogen, sondern auch antifibrotisch und anti-inflammatorisch auf das umliegende Gewebe aus.

1.3 Lösliche Mediatoren der Wundheilung im Überblick

Wie bereits erwähnt, ist die Wundheilung ein komplexer Prozess koordinierter Abläufe, der eine Vielzahl an Zellen und löslichen Mediatoren involviert. Neben den bereits dargestellten Aufgaben einiger Schlüsselzellen (Endothelzellen, Fibroblasten und Fettstammzellen), sollen hier nun die Wachstumsfaktoren, Zytokine und Adhäsionsmoleküle kurz beschrieben werden, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurden.

1.3.1 Wachstumsfaktoren

1.3.1.1 Basic Fibroblast Growth Factor

Bisher wurden über 20 Mitglieder der *Fibroblast Growth Factor*-Familie entdeckt, von denen FGF-2 oder bFGF, FGF-7 (*Keratinocyte Growth Factor-1/KGF-1*) und FGF-10 (*Keratinocyte Growth Factor-2/KGF-2*) bei Vorgängen der Wundheilung die wichtigste Rolle zugeschrieben wird. Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Mastzellen produzieren FGF⁸⁷. Aktivierte Makrophagen sezernieren bFGF unter Hypoxie²³. Gespeichert wird der Wachstumsfaktor teils in den Zellen selbst, wie z.B. den Endothelzellen oder Fibroblasten oder in der umgebenden EZM⁸⁸. Bei der Wundsetzung werden diese Speicher passiv freigesetzt^{24,89}, sodass der Wachstumsfaktor von Beginn an für den Prozess der Wundheilung zur Verfügung steht. Endothelzellen werden durch bFGF zur Sekretion von Urokinase-ähnlichem Plasminogen Aktivator angeregt⁹⁰, einer Protease, die den Endothelzellen in der proliferativen Phase die Migration in die EZM ermöglicht und so zur Bildung von Granulationsgewebe beiträgt. Als sehr potenter angiogener Faktor stimuliert es vor allem in Anwesenheit von VEGF die Angiogenese durch Aktivierung der Endothelzellen⁸⁹. Auf Fibroblasten und Zellen ektodermalen Ursprungs (z.B. Keratinozyten) wirkt FGF chemotaktisch und proliferativ und bewirkt damit in späteren Phasen der Wundheilung, eine verbesserte und früher einsetzende Re-Epithelialisierung. In einer Studie an Schweinen führte schon die einmalige Anwendung von FGF zur einer Beschleunigung der Wundheilung um 20%⁹¹.

1.3.1.2 Platelet-Derived Growth Factor

PDGF besteht aus vier Polypeptidketten, aus denen sich fünf dimerische Isoformen ableiten lassen (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD) ⁹². PDGF wird vor allem durch Thrombozyten, aber auch durch Fibroblasten, Endothelzellen oder glatte Muskelzellen der Gefäße gebildet ⁹³. Der Signalweg von PDGF verläuft über zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren (PDGFR- α und PDGFR- β), an die die Isoformen mit unterschiedlicher Affinität binden und über die unterschiedliche Wirkungen erzielt werden. So wirkt die Aktivierung von PDGFR- β chemotaktisch auf Fibroblasten, Monozyten und Granulozyten, während die Aktivierung des PDGFR- α die Chemotaxis von Fibroblasten und Monozyten inhibiert ⁹⁴. Als eines der stärksten Mitogene wird PDGF direkt nach der Wundsetzung aus den α -Granula der aktivierten Thrombozyten freigesetzt ⁹⁵. Zu den klassischen Zielzellen gehören Fibroblasten und Gefäßmuskelzellen. Auch Hypoxie, Thrombin sowie verschiedene Wachstumsfaktoren wirken als Stimulus für die Sekretion ⁹³. Während der Exsudationssphase der Wundheilung ist der PDGF- β Rezeptor für die Rekrutierung, Proliferation und Funktionalität der Fibroblasten und Perizyten wichtig ⁹⁶. Endothelzellen an der Spitze neu aussprossender Gefäße (sogenannte Tip-Cells) stimulieren über PDGF-BB die glatte Gefäßmuskulatur und Perizyten, die zur Stabilisierung der Kapillarstruktur notwendig sind ⁹⁷. In einer Studie von Pierec et al. konnte außerdem beobachtet werden, dass PDGF die Produktion der extrazellulären Matrix stimuliert, Makrophagen zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren aktiviert sowie indirekt Einfluss auf die Prokollagensynthese hat ⁹⁸. Desweiteren fördert es die Bildung von Granulationsgewebe, die Wundkontraktion und zeigte tierexperimentell und am Patienten nach topischer Anwendung Verbesserungen bei der Vaskularisierung und Re-epithelialisierung von Wunden ⁹³. Eine überschießende Aktivität von PDGF steht allerdings in Verbindung mit Atherosklerose, Lungen-, Nieren- oder Leberfibrose sowie der Ausbildung von Neoplasien ^{93,99}.

1.3.1.3 Vascular Endothelial Growth Factor

Die Bildung neuer Gefäße spielt bei der Wundheilung eine entscheidende Rolle. VEGF ist neben bFGF einer der stärksten pro-angiogen wirkenden

Wachstumsfaktoren und daher essentiell für die Wundheilung. Das Isomer VEGF-A vermittelt dabei die stärksten Effekte. VEGF wird von aktivierten Thrombozyten, Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Makrophagen und glatten Muskelzellen gebildet und bindet hauptsächlich an zwei strukturell ähnliche Rezeptoren (VEGFR-1/VEGFR-2)⁸⁷. Die Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren führt jedoch über unterschiedliche Wege der Signaltransduktion zu verschiedenen Reaktionen¹⁰⁰. VEGFR-1 wirkt chemotaktisch und proliferationsfördernd auf Endothelzellen und stimuliert diese außerdem zur Differenzierung. VEGFR-2 vermittelt die Permeabilitätssteigerung der Gefäße, die Expression von Matrixmetalloproteinasen und die Organisation der Angiogenese⁸⁷. Beides ist unabdingbar für die Bildung von Kapillaren im Granulationsgewebe. Wie schon bei PDGF und bFGF wirken die Wundsetzung selbst sowie die nachfolgende Hypoxie als Stimulus für die Freisetzung des VEGF. Desweiteren induzieren auch Wachstumsfaktoren, wie EGF, FGF-7 und TGF über die Aktivierung von Keratinozyten die Sekretion von VEGF¹⁰¹. In der Entzündungsphase verstärkt VEGF durch vasodilatative Effekte und die Expression von Selektinen und Adhäsionsmolekülen die Rekrutierung pro-inflammatorischer Zellen aus dem Intravasalraum¹⁰². Eine Überexpression hingegen führt zu verstärkter Narbenbildung¹⁰¹ und Thrombozytenadhäsion¹⁰³. Pathologien wie die Rheumatoide Arthritis, Retinopathien, Psoriasis und die Bildung von Neoplasien stehen mit vermehrter Gefäßbildung in Zusammenhang¹⁰⁴.

1.3.2 Interleukin-6

Bei IL-6 handelt es sich um ein klassisches pro-inflammatorisches Zytokin. Zu den physiologischen Prozessen auf die IL-6 Einfluss nimmt, gehört die Hämatopoese, das Zellwachstum, Akute-Phase- und Immunreaktion, sowie die Initiierung der Entzündungsreaktion¹⁰⁵. Induziert wird seine Freisetzung durch Viren und LPS, wie auch durch IL-1, TNF, EGF, PDGF und TGF- β ¹⁰⁶. Neben Zellen des Immunsystems (B-Zellen, T-Zellen und Monozyten), wird IL-6 außerdem von epidermalen Keratinozyten, dermalen Fibroblasten und Endothelzellen synthetisiert und bereits in der ersten Phase der Wundheilung freigesetzt¹⁰⁷. IL-1 und IL-6 können gegenseitig ihre Sekretion induzieren, was über IL-1 zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1/VCAM-1) auf Endothelzellen führt¹⁰⁸. IL-6 moduliert

dadurch indirekt die Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in den Wundbereich ¹⁰⁹. Synergistisch dazu verstärkt IL-6 die Sekretion von Chemokinen aus Makrophagen ¹¹⁰. Weitere Studien ergaben, dass die VEGF-Synthese durch IL-6 in einem ähnlichem Maße wie durch Hypoxie stimuliert wird ¹¹¹. In einem Experiment mit IL-6 defizienten Mäusen wurde eine verringerte Neovaskularisierung nach Wundsetzung beobachtet ¹⁰⁸. Weiterhin beeinflusst IL-6 die Expression von MMP und TIMPs ¹¹² und stimuliert dermale Fibroblasten zur Kollagensynthese. Über die Steigerung der TGF- β -Sekretion bewirkt IL-6 die Re-Epithelialisierung von kutanen Wunden ^{108,113,114}.

1.3.3 Adhäsionsmoleküle: *soluble Intercellular Adhesion Molecule-1* und *soluble Vascular Cellular Adhesion Molecule-1*

Die löslichen Varianten der Adhäsionsmoleküle *ICAM-1* (*soluble ICAM-1*, sICAM-1) und *VCAM-1* (*soluble VCAM-1*, sVCAM-1) sind in Bezug auf die Wundheilung vorwiegend an der Extravasation von Leukozyten beteiligt. Strukturell handelt es sich um transmembranöse Glykoproteine, die zur Superfamilie der Immunglobuline gehören ^{115,116}. Ihre Expression wird durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1 β und INF- γ ¹⁰, aber auch durch zellulären Stress, bakterielle und virale Zellbestandteile stimuliert ¹¹⁷. Weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-4 und IL-10 oder TGF- β können dagegen die Expression der Adhäsionsmoleküle vermindern ^{117,118}. Die membranständigen Formen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 werden von Endothelzellen, Leukozyten, Fibroblasten, Epithelzellen und Keratinozyten exprimiert ¹¹⁹. Insbesondere in der exsudativen Phase der Wundheilung sind Adhäsionsmoleküle wichtig für die Vermittlung der transendothelialen Leukozytenmigration aus postkapillären Venolen ¹²⁰. Durch pro-inflammatorische Stimuli kommt es dabei zur Expression von Selektinen auf aktivierten Endothelzellen. Diese stellen instabile Verbindungen mit Leukozyten her, sodass Leukozyten an den Gefäßwänden langsam entlanggleiten (*Leukocyte Rolling*). ICAM-1 und VCAM-1 sorgen daraufhin für ein stabiles Anhaften der Leukozyten am Endothel, was eine Voraussetzung für die anschließende Migration darstellt ¹²⁰. Andererseits steht ihre Überexpression auch in Zusammenhang mit Endothelzellfunktion und daher mit Atherosklerose, Asthma bronchiale und

entzündlichen Erkrankungen, wie Multipler Sklerose oder Morbus Crohn ^{117,121}. Die Konzentration von sICAM-1 und sVCAM-1 wird deshalb auch als Indikator für die Funktionalität von Endothelzellen bzw. zur Bestimmung der Krankheitsaktivität genutzt ^{122,122,123}.

1.4 Vaskuläre Mikroarchitektur und Gefäßbildung

Veränderungen in der Endothelzellfunktion, sowie Störungen der Neovaskularisierung spielen bei vielen Krankheiten eine wichtige Rolle, allen voran bei der Ausbildung und dem Wachstum von Neoplasien. Die genaue Kenntnis der molekularen und zellulären Abläufe, wie auch deren Auswirkungen auf die vaskuläre Mikroarchitektur können entscheidenden Einfluss auf Therapieregime und –erfolg der Patienten haben. Mittels *in vitro* Angiogenese-Assays können unterschiedliche Substanzen auf ihre pro- oder anti-angiogene Wirkung getestet werden, einzelne Abschnitte der Angiogenese näher untersucht, sowie die verschiedenen beteiligten Endothelzellpopulationen näher charakterisiert werden ¹²⁴. Als eines der am besten untersuchten Angiogenese Assay Verfahren gilt der *Tube Formation-Assay*.

1.4.1 Angiogenesestudien mittels Tube Formation Assay

Der Tube Formation-Assay untersucht die Fähigkeit von Endothelzellen in einer ausgewählten Matrix *in vitro* dreidimensionale, kapillarähnliche Strukturen auszubilden ¹²⁵. Großes Interesse am Tube Assay wurde geweckt, als Lawley und Kubota zeigen konnten, dass eine Matrix aus Matrigel mit einem hohen Anteil an Laminin, die Differenzierung von Endothelzellen zu tubulären Strukturen massiv beschleunigt ¹²⁶. Bei Matrigel handelt es sich um eine gelartige Proteinmischung, die von murinen Zellen des Engelbreth-Holz-Swarm Sarkoms produziert und sezerniert wird, zu deren Hauptkomponenten das Strukturprotein Laminin gehört. Die Basalmembran von Endothelzellen stellt eine weitere Quelle für Laminin dar ¹²⁷. Ungeachtet vieler Vorteile, vernachlässigt dieses Tube Formation-Assay-Modell den physiologischen Einfluss nicht-vaskulärer Zellen auf die Angiogenese. In der Wundheilung zählen zu diesen vorwiegend Fibroblasten, die in die EZM einwandern.

Eine Vielzahl von Studien beschäftigt sich deshalb mit Ko-Kulturen aus Endothelzellen und Fibroblasten als Grundlage für den Tube Formation-Assay. Bishop und seine Mitarbeiter beschrieben u.a., dass diploide dermale Fibroblasten in der Ko-Kultur mit humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) dazu fähig sind, die notwendigen Matrixkomponenten zu synthetisieren um innerhalb von 14 Tagen ein feines kapillarähnliches Gefäßnetz zu bilden¹²⁸. Verglichen mit tubulären Strukturen aus Tube Formation Assays mit normalem und an Wachstumsfaktoren reduziertem Matrigel als künstliche Matrix, wurden deutliche Unterschiede offensichtlich. Die Wells der Ko-Kulturen zeigten ein heterogenes Bild aus kurzen und langen tubulären Strukturen, die teilweise miteinander verbunden waren, während sich in den Wells mit Matrigel homogene, kurze Tubes ausbildeten¹²⁹. Desweiteren unterstützen und modulieren dermale Fibroblasten auch die Migration von Endothelzellen, wie ein Versuch mit dreidimensionalen, sphäroiden Ko-Kulturen demonstrierte¹³⁰. Insgesamt kommen diese Modelle den Verhältnissen der physiologischen Gefäßbildung sehr nahe.

1.4.2 Gefäßbildung

Die Gefäßbildung kann eingeteilt werden in die pränatale Vaskulogenese aus dem Mesoderm und die postnatale Neovaskularisierung. Die Neubildung von Gefäßen nach der Geburt kann demnach durch Ausprossen neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen (Angiogenese) oder durch endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark erfolgen, die wie die pränatale Vaskulogenese zu einer *de novo* Gefäßbildung führt (postnatale Vaskulogenese). Bei der pränatalen Vaskulogenese handelt es sich um die *de novo* Bildung von Gefäßen im Embryo, aus dem sich entwickelnden mittleren Keimblatt. Postnatal findet man Vaskulogenese häufig in Zusammenhang mit ischämischen Erkrankungen¹³¹. Endotheliale Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark werden durch Stimuli ins Blut ausgeschwemmt und an den Ort der Hypoxie gelockt. Dort proliferieren und differenzieren sie und bilden vaskuläre Strukturen aus. Diese Strukturen, zum Beispiel Kollateralgefäße, fusionieren mit vorbestehenden Blutgefäßen und werden damit zu funktionellen Gefäßen¹³². Eine andere Form der Neovaskularisierung ist die Angiogenese.

Mit Angiogenese wird meist das abluminale Aussprossen neuer Gefäßäste aus vorbestehenden Gefäßen beschrieben, sogenanntes "sprouting". Es findet aber auch durch longitudinale Spaltung der Gefäße aufgrund von Scherkräften (bridging) oder infolge von Muskeldehnung (*intussusceptive growth*) statt ¹³³. Wie die Wundheilung kann auch der Vorgang der Angiogenese in nacheinander ablaufende Phasen eingeteilt werden. Man unterscheidet dabei die stille Phase, die Aktivierungsphase und die Resolutionsphase. In der stillen Phase bestehen reife, funktionelle Gefäße aus ruhenden Endothelzellen (Phalanxzellen), umhüllt von Perizyten, mit denen sie sich eine Basalmembran teilen ¹³⁴. Werden die Endothelzellen durch pro-angiogene Faktoren aktiviert, werden darüber gleichzeitig auch proteolytische Prozesse initiiert. Diese führen zum Ablösen der Perizyten, zur Auflösung der Basalmembran und einer Permeabilitätssteigerung ¹³⁴. Angeführt von der sogenannten Tip-Zelle, einer hoch polarisierten Endothelzelle an der Spitze der Gefäßknospe, migrieren Endothelzellen anschließend in Richtung des chemotaktischen Gradienten. Die ihr folgenden, proliferierenden Endothelzellen werden als Stielzellen (*stalk cells*) bezeichnet und sind für die Verlängerung des Gefäßastes verantwortlich ¹³⁵. In der Resolutionsphase erfolgt dann zuletzt die Reifung der neuen Gefäße, indem sich eine neue Basalmembran bildet und Perizyten angelockt werden. Gefäßknospen, die keinen Anschluss an bestehende Gefäße gefunden haben, entwickeln sich zurück ¹³⁴. Endothelzellen werden zum Schluss inaktiv. Nach Hanahan und Folkman könnte der Konzentrationspiegel von pro- und anti-angiogenen Faktoren über die Rückkehr der Endothelzellen in die stille Phase oder über die Fortsetzung der Proliferation entscheiden. Dies bezeichneten sie als *angiogenic switch* ¹³⁶.

1.5 Plättchenreiches Plasma

Bei plättchenreichem Plasma (PRP) handelt es sich um autologes Blutplasma, welches eine überdurchschnittlich hohe Konzentration an autologen Thrombozyten enthält ¹³⁷. Es wird steril aus Vollblut durch dessen Auftrennung in einzelne Blutbestandteile mittels Zentrifugalkraft gewonnen. Laut Marx sind zur sauberen Trennung zwei Durchgänge notwendig. Das erste Zentrifugieren separiert die Erythrozyten vom Rest, in welchem Thrombozyten, Leukozyten und Blutplasma enthalten sind. Die Erythrozyten können verworfen oder reinfundiert werden. Das

zweite Zentrifugieren trennt den sogenannten *Buffy-Coat* (Thrombozyten, Leukozyten, wenige Erythrozyten) von flüssigem Blutplasma. Der *Buffy-Coat* gelöst in einem kleinem Volumen Blutplasma bildet, das plättchenreiche Plasma (*platelet rich plasma*/PRP). Bei dem flüssigen Anteil handelt es sich um plättchenarmes Plasma (*platelet poor plasma*/PPP)¹³⁷. Um eine therapeutische Wirkung zu erzielen, sollte das PRP eine Arbeitskonzentration von 1.000.000 intakten Thrombozyten pro μl suspendiert in 5 ml Blutplasma nicht unterschreiten¹³⁷. Dies entspricht einer 4 bis 5-fachen Durchschnittskonzentration (200.000 Thrombozyten/ μl) an Thrombozyten in Vollblut¹³⁸.

1.5.1 Freisetzung der Wachstumsfaktoren und Wirkung von plättchenreichem Plasma

Plättchenreiches Plasma beinhaltet u.a. die Wachstumsfaktoren PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, TGF- β 1, TGF- β 2, VEGF, IGF-1, bFGF und EGF, welche in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert sind^{87,95,137,139}. Durch die Aktivierung der Thrombozyten mittels Kalzium und Thrombin, kommt es zur Verschmelzung der α -Granula mit der Thrombozytenmembran, was zur aktiven Freisetzung der Wachstumsfaktoren in bioaktiver Form führt¹³⁸. Die Menge der sezernierten Wachstumsfaktoren ist dabei abhängig von der Inkubationszeit mit einer Thrombinhaltigen Kalziumchlorid-Lösung¹⁴⁰, wobei sich die Freisetzungsdynamik der einzelnen Faktoren unterschiedlich gestaltet¹⁴¹. Innerhalb einer Stunde nach Aktivierung befindet sich bereits nahezu die gesamte Menge an gespeicherten Faktoren im PRP-Überstand¹³⁷. Nach der Aktivierung sezernieren Thrombozyten bis zu ihrem Absterben nach ca. acht Tagen, weiter kleinere Mengen an Wachstumsfaktoren¹³⁸. Außer durch Thrombin kann eine Aktivierung des PRP auch durch endogenes Kollagen Typ I erfolgen, wie es bei der Verletzung von Gewebe der Fall ist¹⁹. Im Gegensatz zu bovinem Thrombin, ist endogenes Kollagen Typ I nicht in der Lage allergische Reaktionen hervorzurufen oder Krankheiten zu übertragen. Einfluss auf die Sekretion von Wachstumsfaktoren hat unter anderem der pH-Wert. Eine Studie von Liu et al. zeigte, dass eine Vorinkubation der Thrombozyten (vor Aktivierung) in saurem Milieu zu höheren Konzentrationen an PDGF im Überstand führte, während die Konzentration von TGF- β nach Vorinkubation im alkalischen

Milieu abfiel ¹⁴². Es konnte jedoch kein positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl der Thrombozyten im PRP und der Menge an freigesetzten Wachstumsfaktoren hergestellt werden ^{140,141,143,144}. Ebenso korreliert weder das Alter noch das Geschlecht der Spender mit der Menge an sezernierten Faktoren ¹⁴³. In der Theorie wird durch die topische Anwendung von PRP am Wundgrund die lokale Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren, die die Wundheilung beeinflussen, erhöht. Die Aktivierung des PRP transformiert das Blutderivat in einen gelartigen, gelb-rötlich gefärbten Pfropf, hauptsächlich bestehend aus Thrombozyten, Leukozyten, Fibrin, Fibronectin und Vitronectin sowie den sezernierten Wachstumsfaktoren. In dieser Form werden die Wachstumsfaktoren langsam an umliegendes Gewebe abgegeben, sodass durch diese Verzögerung ihre chemotaktische, angiogene und mitogene Wirkung vorrangig auf Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten in der Umgebung verlängert wird. Zusätzlich liefert der Fibrinthrombus, wie bei der physiologischen Wundheilung *in vivo*, ein essentielles, dreidimensionales Gerüst für die Zell-Zell- und Protein-Protein-Interaktionen ¹⁴⁵. Es wird daher angenommen, dass PRP positive Auswirkungen auf die Geweberegeneration hat. Allerdings können interindividuelle Unterschiede, wie auch das Herstellungssystem von PRP die Konzentration der Wachstumsfaktoren und daher die Wirkung von PRP beeinflussen ¹⁴⁶.

1.5.2 Anwendungsbereiche

Im Jahr 1998 machte Robert E. Marx in einer klinischen Studie an 88 Patienten mit mandibulären Knochendefekten, auf das Regenerationspotential von PRP aufmerksam. Aufgrund der Aktivierung von Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen durch PRP, wurde sowohl die Knochenheilung, als auch die Knochenreifung beschleunigt ¹⁶. PRP wird deshalb in der Zahnheilkunde bei Sinusliftaugmentationen und knöchernen Kontinuitätsdefekten verwendet. Zudem spielt es bei der Versorgung von Gaumenspalten oder der Deckung enoraler Läsionen eine Rolle ¹³⁸.

In der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie findet PRP beispielsweise Anwendung bei der Behandlung diabetischer oder chronisch-venöser Beinulzera. Desweiteren wird es in Kombination mit autologem Fettgewebe, als *Lipofiller* zur Wiederherstellung der Gesichtskontur oder auch ohne zusätzliches Fettgewebe zur

Faltenreduktion verwendet ¹⁴⁷. Orthobiologika, wie PRP oder autologe Stammzelltherapien auch genannt werden, werden außerdem in der Orthopädie und Sportmedizin eingesetzt ¹⁴⁸. Die Injektion von PRP in akut verletzte Muskulatur (Muskelzerrung, -überdehnung oder -quetschung), resultierte in Studien an Mensch und Tier in einer verkürzten Regenerationszeit und der Verbesserung der kontraktile Funktion ¹⁴⁹. Weiterhin wird PRP aufgrund seiner anti-inflammatorischen und analgetischen Wirkung zur Behandlung von Insertionstendinopathien (Epikondylitis humeri lateralis/medialis), Achilles Tendinopathien, Bursitiden und Arthrose, wie auch zur Schmerzreduktion bei Fersensporn und Blockaden des Illiosakralgelenkes eingesetzt. Auf dem Gebiet des *Tissue engineering* werden derzeit außerdem die Effekte von PRP auf die Chondrogenese untersucht ¹³⁹.

1.6 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob plättchenreiches Plasma strahleninduzierten Zellschäden entgegenwirken kann. Dabei konzentriert sich der erste Teil darauf, in wieweit ionisierende Strahlung oder die Zugabe von PRP grundsätzlich Einfluss auf die Zellzahl von Schlüsselzellen der kutanen Wundheilung wie adipogene Stammzellen und HDMEC in Mono- und Ko-Kultur ausübt und wie beide getrennt voneinander die Freisetzung bestimmter Wachstumsfaktoren, Zytokine und Adhäsionsmoleküle durch diese Zellen verändern. Anschließend soll untersucht werden, wie die Addition von PRP zu vorher bestrahlten Zellkulturen deren Zellzahl und die Sezernierung von Wachstumsfaktoren, Zytokine und Adhäsionsmoleküle beeinflusst. Im zweiten Teil stehen die Etablierung des Angiogenese Assay und die Gefäßneubildung im Mittelpunkt. Anhand des *Tube Assay* soll auch hier der Effekt wiederholter Bestrahlung mit 2 Gy auf die Ko-Kultur aus pulmonalen Fibroblasten und HDMEC untersucht werden.

2. Material

2.1 Zelllinien und Thrombozytenkonzentrat

Tabelle 1: Zelltypen und Herkunft der verwendeten Zellen

Zelltyp	Firma/Herkunft
hASC, Passage 3-7	Applied Stem Cell Center (Zentrum für Plastische Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Regensburg, Prof. Dr. Lukas Prantl)
HDMEC-c adult (human dermal microvascular endothelial cell), Passage 3-6	PromoCell / Heidelberg Germany (Bestell-Nr. C-12212, CH-B1 0090705)
Pulmonale Fibroblasten, Passage 3-9	Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie Universitätsklinikum Regensburg (Prof. Dr. Karla Lehle)
Thrombozytenkonzentrat 1. $1,63 \times 10^9$ Thrombozyten/ml in 253 ml Volumen 2. $1,72 \times 10^9$ Thrombozyten/ml in 251 ml Volumen	Blutbank Universitätsklinikum Regensburg Institut für klinische Chemie (PD Dr. Norbert Ahrens)

2.2 Nähr- und Einfriermedien

Tabelle 2: verwendete Nähr- und Einfriermedien und ihre Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung	Firma/Herkunft
ASC-Nährmedium	Minimum essential Medium Eagle Alpha Modification	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
	20% fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen/Carlsbad, California, USA
	1% Penicillin/Streptomycin	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
	1% L-Glutamin	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
ASC-Einfriermedium	50% ASC-Nährmedium	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
	40% FKS	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
	10% Dimethylsulfoxide (DMSO)	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
Differenzierungsmedium für HDMEC		
Ascorbic Acid	Vitamin C	Lonza Clonetics EGM-2 Single Quots CC-4116A
GA-1000	Gentamicin Sulfate Amphotericin B	Lonza Clonetics EGM-2 Single Quots CC-4381A
Heparin		Lonza Clonetics EGM-2 Single Quots CC-4396A
Hydrocortison		Lonza Clonetics EGM-2 Single Quots CC-4112A
EBM-2	Endothelial Cell Basal Medium-2 (Endothelial Cell tested)	Lonza Clonetics Verviers, Germany
R3-IGF-1	Recombinant Insulin-like Growth Factor-1 in Aqueous solution	Lonza Clonetics EGM-2 Single Quots CC-4115A
Rh EGF	Recombinant Epithelial Growth Factor	Lonza Clonetics EGM-2 Single Quots CC-4317A
Rh FGF-B	Recombinant Basal Fibroblast Growth Factor	Lonza Clonetics EGM-2 Single Quots CC-4113A

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Lonza Clonetics EGM-2 Single Quots CC-4114A
FKS		Invitrogen/Carlsbad, California, USA
HDMEC-Nährmedium	Endothelial Cell Growth Medium MV (C-22020) Supplementmix (C-39225)	PromoCell, Heidelberg, Germany
HDMEC-Einfriermedium	95% HDMEC-Nährmedium 5% DMSO	PromoCell, Heidelberg, Germany SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
NHF-Nährmedium	DMEM/F-12 (1:1) 10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin	Gibco® Life Technologies/Carlsbad , California, USA Invitrogen/Carlsbad, California, USA SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
NHF-Einfriermedium	50% NHF-Nährmedium 40% FKS 10% DMSO	Gibco® Life Technologies/Carlsbad , California, USA Invitrogen/Carlsbad, California, USA SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA

2.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: verwendete Chemikalien und Lösungen und ihre Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung	Firma/Herkunft
2xUrea-Peroxid	38 mg Urea (Wasserstoffperoxid-Harnstoffaddukt, 97%) 40 mL Zitratpuffer	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA Roth/Karlsruhe, Germany
10X PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	Für 1 Liter in Aqua destille 80,145 g NaCl 2,0115 g KCl 11,502 g Na ₂ HPO ₄ 2,15 g KH ₂ PO ₄	Roth/Karlsruhe, Germany
0,4 M Zitratpuffer	4,72 g Na-Zitrat	

	3,36 g Zitronensäure-Monohydrat 3,12 g MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure) → Auf 40 g mit A. dest.	Roth/Karlsruhe, Germany
BSA (Bovines Serumalbumin), Fraktion V		Biomol/Hamburg, Germany
Blocking Buffer	1xPBS + 1% BSA, steril filtriert	
Fast Red	SIGMA FAST Fast Red TR/ Naphtol AS-MX Alkaline Phosphatase Substrate Tablets Set gelöst in A. dest.	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
Glycinalkohol (5mM Glycin)	Für 100 ml Glycinalkohol: 0,112g Glycin 30 ml A. dest 70 ml 100% Ethanol	
PBS steril	Dulbecco`s 1xPBS	The cell culture Company/Cölbe, Germany
Reagent Diluent (RD)	1% BSA in 1xPBS steril	Biomol/Hamburg, Germany The cell culture Company/Cölbe, Germany
Stop Solution	89,69 mL A. dest. 10,32 mL H ₂ SO ₄	Merck/Darmstadt, Germany
Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP)	50 µL Streptavidin-HRP in 10 mL PBS steril	R&D Systems/Minneapolis, USA
Substrat Solution	1 mL 2xUrea-Peroxid 1 mL A. dest. 40µL TMB Stock	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
Trypsin 0,04%/EDTA 0,03%		PromoCell/Heidelberg, Germany
Trypsin Neutralizing Solution (TNS)		PromoCell/Heidelberg, Germany
Thrombinpuffer	Thrombin 500 1 ml Verdünnungspuffer	Baxter/Deerfield, Illinois, USA

Trypsin		PromoCell/Heidelberg, Germany
0,05% Tween 20/PBS (Waschpuffer)	1,4 L PBS 700 µL Tween20	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA
Verdünnungspuffer für Thrombin	2,22 g Kalziumchlorid 1,5 g Glycin 5,0 g NaCl 500 ml A. dest.	
Waschpuffer	0,05% Tween20 in 1xPBS steril, (pH 7,2-7,4)	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA The cell culture Company/Cölbe, Germany

2.4 Kits und Antikörper

Tabelle 4: Kits und Antikörper

Bezeichnung	Zusammensetzung	Firma/Herkunft
ELISA-Kitsystem		R&D Systems/Minneapolis, USA
Human IL-6 R&D Duo Set DY 206	Interleukin-6	R&D Systems/Minneapolis, USA
Human FGF basic R&D Duo Set DY 233	Fibroblast growth factor	R&D Systems/Minneapolis, USA
Human ICAM-1 CD54 R&D Duo Set DY 720	Intercellular adhesion molecule-1	R&D Systems/Minneapolis, USA
Human VCAM-1 CD106 R&D Duo Set DY809	Vascular cell adhesion molecule-1	R&D Systems/Minneapolis, USA
Human VEGF R&D Duo Set DY 293B	Vascular endothelial growth factor	R&D Systems/Minneapolis, USA
Human PDGF-AB R&D Duo Set DY 222	Platelet derived growth factor	R&D Systems/Minneapolis, USA

Human TGF- β R&D Duo Set DY 240	Transforming growth factor	R&D Systems/Minneapolis, USA
Monoclonal Mouse Anti- Human CD31	verdünnt in Blocking Buffer 1:100	DakoCytomation
Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate developed in goat	verdünnt in Blocking Buffer 1:400	SIGMA-Aldrich/St. Louis, Missouri, USA

2.5 Verbrauchsmaterial und Pipettierhilfen

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial und Pipettierhilfen

Bezeichnung	Eigenname	Firma/Herkunft
6-Wellplatten	Cellstar	Greiner bio-one/ Frickenhausen, Germany
24-Wellplatten	Cellstar	Greiner bio-one/ Frickenhausen, Germany
96-Wellplatten		Nunc/ Roskilde, Denmark
Einfrierröhrchen	System 100 TM Cryogenic Vials	Nalgene/ Gehrden, Germany
Reaktionsgefäß	Safe-lock Tubes (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf/ Hamburg, Germany
Zentrifugenröhrchen	BD Falcon TM 15 ml Conical Tube 17x120 style 50 ml Cellstar Tubes	Greiner bio-one/ Frickenhausen, Germany
Spritzenvorsatzfilter 0,2µm	Chromafil A-20/25	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG/ Düren, Germany
serologische Pipetten, einzeln verpackt, steril (5ml, 10ml, 25ml)	Cellstar Serological Pipette, sterile	Greiner bio-one/ Frickenhausen, Germany
Handschuhe	Sterling Nitrile KC300	Kimberly-Clark/ Dallas, USA
Multipette	Multipette plus	Eppendorf/ Hamburg, Germany
Combitips für Multipette	Eppendorf Biopur Combitips advanced (5ml, 10ml)	Eppendorf/ Hamburg, Germany
Neubauer Zählkammer	Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm ²	Brand/ Wertheim, Germany
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf/ Hamburg, Germany
Pipettenaufsätze	epT.I.P.S	Eppendorf/ Hamburg, Germany
Zellkulturflaschen	Cellstar cell culture flasks 25 mm ² , 75 mm ²	Greiner bio-one/ Frickenhausen, Germany

2.6 Geräte

Tabelle 6: verwendete Geräte

Bezeichnung	Eigenname	Firma/Herkunft
Brutschrank	Hera Cell 240	Heraeus/ Hanau, Germany
Fluoreszenzmikroskop	Biozero	Keyence International/ Mechelen, Belgium
Linearbeschleuniger	Primus Linear accelerator mit MLC (3 Gy/min)	Siemens/ Nürnberg, Germany
Mikroskop		Zeiss/ Jena, Germany
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	Brand/ Wertheim, Germany
Sterilbank	Laminar Flow Werkbank Hera safe	Kendro/ Hamburg, Germany
Tecanfilter ELISA	Measurement wavelength 450 nm	GENios/ Frankfurt a. Main, Germany
Thermozykler MX 3005P		Stratagene/ Kalifornien, USA
Tischzentrifuge	Mini Spin	Eppendorf/ Hamburg, Germany
Vortex-Rührer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries/ New York, USA
Wasserbad		GFL/ Burgwedel, Germany
Zellzählerautomat	CASY®	Roche Innovatis AG/ Reutlingen, Germany
Zentrifuge	Tischkühlzentrifuge Typ 4K-15 mit Zubehör	Sigma Laboratory Centrifuges GmbH/Osterode am Harz, Germany

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Steriles Arbeiten mit Zellkulturen

Für alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden die verwendeten Materialien und die Lamina-Flow-Werkbank vor Beginn und nach Beendigung der Arbeiten mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Gearbeitet wurde ausschließlich mit Handschuhen und in Arbeitskleidung. Die aufgetauten Zellen wurden bis zur Verwendung bei 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank kultiviert. Die Nährmedien, die bei 4°C gelagert wurden, wurden vor Gebrauch entweder durch Aufwärmen im Wasserbad oder durch frühzeitiges Entnehmen aus dem Kühlschrank auf Raumtemperatur gebracht. Der Nährmedienwechsel erfolgte im Durchschnitt alle 2-3 Tage.

Im Falle einer Kontamination der Zellkultur wurde der Inhalt mit Natriumhypochlorid ausgeschwenkt und anschließend abgesaugt. Darauf folgte eine gründliche Desinfektion aller damit in Berührung gekommenen Gegenstände mit 70%igem Ethanol.

3.1.2 Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden aus dem -80°C Tiefkühlgerät entnommen und bei 37°C im Wasserbad zügig aufgetaut. T75 cm² oder T25 cm²-Zellkulturflaschen wurden beschriftet, 13 ml bzw. 5 ml Medium vorgelegt und im Brutschrank vorgewärmt. Die Zellen wurden daraufhin entweder direkt mit einer 1 ml-Pipette in die vorbereiteten Zellkulturflaschen überführt und der erste Medienwechsel nach 24 Stunden durchgeführt. Oder die Zellen wurden in ein auf gleiche Weise vorbereitetes 15 ml Falcon überführt, das Einfriermedium bei 1.200 rpm fünf Minuten abzentrifugiert, die Zellen im jeweiligen Medium resuspendiert und danach erst in die vorgewärmten Zellkulturflaschen überführt. Hier erfolgte der erste Medienwechsel wie unter Punkt 3.1.1 erwähnt nach 2-3 Tagen. Nach der Überführung wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert.

3.1.3 Passagieren/Splitting/Trypsinieren der Zellen

Um die inkubierten Zellen bei konfluentem Zellwachstum zu passagieren oder sie für den Beginn eines Versuchsansatzes von den Zellkulturflaschen abzulösen, wurde mittels einer Pasteur-Pipette vorsichtig das verbrauchte Zellmedium abgesaugt und die Zellkulturflasche mit 4 ml PBS gewaschen um die Zellen von Resten des Nährmediums bzw. vom FKS zu befreien. Pro 75 cm²-Zellkulturflasche wurde anschließend 2 ml Trypsin/EDTA zugegeben, um die adhärenen Zellen abzulösen. Dafür wurden die Zellen unter mikroskopischer Kontrolle solange im Brutschrank inkubiert, bis sie eine runde Form angenommen und sich vollständig vom Boden gelöst hatten. Dann erfolgte die Neutralisation des Trypsin/EDTA mit 5ml TNS (bei HDMEC), bzw. ASC-Nährmedium (bei hASC) oder NHF-Nährmedium (Fibroblasten) und das Überführen der Zellsuspension in 15 ml Falcons. Um zellschädigendes, überschüssiges Trypsin/EDTA zu entfernen, wurden die Falcons 5 Minuten bei 1.200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden im jeweiligen Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde entweder in entsprechend vorbereitete neue Zellkulturflaschen aufgeteilt (Splitting oder Überführung in höhere Passage), oder in einen Versuchsansatz überführt.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

3.1.4.1 mittels Hämozytometer (Neubauer Zählkammer)

Zur Bestimmung der Zellzahl der abtrypsinierten Zellen wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Dazu wurde die Zählkammer mit warmer Atemluft befeuchtet und ein Deckglas bis zum Erscheinen Newtonscher Ringe mit leichtem Druck auf die Zählkammer aufgeschoben. Im Anschluss wurden 10 µl der gut durchmischten Zellsuspension in die Neubauer Zählkammer eingebracht und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Gezählt wurden immer alle vier Großquadranten. Anschließend wurde die Zellzahl/ml mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen aus vier Quadranten}}{4} \times 10.000 \times \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Zellen/ml}$$

3.1.4.2 mittels Casy® Zellzählautomat

Beim Casy® handelt es sich um einen automatischen Zellzähler, der zur Bestimmung der Zellzahl nach Abnahme eines Strahlenversuchsansatzes verwendet wurde. Die Beschreibung der Abnahme des Strahlenversuches folgt unter Punkt 3.3.1.4 Es wurden 20 µl der jeweiligen Zellsuspension (Probennummer XY) mit 5 ml Casy® Pufferlösung (Verhältnis 1:250) vermischt und anschließend im Zählautomaten platziert. Die Messung wurde danach sofort gestartet und die Ergebnisse auf dem Übersichtsbild auf Verunreinigungen kontrolliert. Die absolute Zellzahl wurde sowohl im Analyzer unter der entsprechenden Probennummer gespeichert, als auch separat notiert.

3.1.5 Einfrieren der Zellen

Waren Zellen überschüssig oder hatten die benötigte Passage erreicht, wurden diese zur Aufbewahrung eingefroren. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben abtrypsiniert und die Zellzahl mittels Hämozytometer bestimmt. Es folgte das Zentrifugieren für 5 Minuten bei 1.200 rpm und das Entfernen des Überstandes. Die Zellpellets wurden nachfolgend in 1 ml des jeweiligen zellspezifischen Einfriermediums resuspendiert und zu 500.000 Zellen pro 1,5 ml Cryocup aliquotiert. Danach erfolgte das langsame, definierte Einfrieren der Einfrierröhrchen in einem Cryo-Probenkühler mit Isopropanol von Raumtemperatur bis auf -80°C.

3.2 Plättchenreiches Plasma

Für experimentelle Studien mit Zellkulturen wird häufig, anstatt des wie einleitend unter Punkt 1.5 hergestellten plättchenreichen Plasmas (PRP, inklusive Thrombinpfropf), ein sogenanntes Releasat verwendet. Dazu wird PRP nach Aktivierung und der gewünschten Inkubationszeit noch ein weiteres Mal zentrifugiert und von allen zellulären Bestandteilen durch Sterilfiltration befreit.

Als PRP wird in diesem Fall der Überstand, in dem die Wachstumsfaktoren gelöst sind bezeichnet ¹⁴⁵. Das in dieser Arbeit verwendete PRP entspricht dem Releasat.

3.2.1 Kooperation mit der Blutbank

Die Bereitstellung der Thrombozytenkonzentrate erfolgte durch das Institut für Klinische Chemie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg nach Arzneimittelrecht. Dazu wurden Konzentrate von gesunden Thrombozytenspendern für den klinischen Gebrauch standardmäßig mittels Ein- oder Zweinadelverfahren hergestellt und kurz nach ihrem Ablaufdatum der Klinik für HNO-Heilkunde des Universitätsklinikums Regensburg für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden zwei verschiedene Thrombozytenkonzentrate für die Studie verwendet. Bei beiden entsprach die Anzahl an gelösten Thrombozyten der Definition der Arbeitskonzentration von PRP (Definition nach Marx).

3.2.2 Herstellung von plättchenreichem Plasma/Releasat

Zur Herstellung von plättchenreichem Plasma wurden das Thrombozytenkonzentrat sowie eine Thrombinlösung mit der Zielkonzentration 5 U/ml benötigt. Dafür wurde Thrombin 500 der Firma Baxter in 1 ml des Verdünnungspuffers aufgelöst (c (Thrombinlösung) = 500 U/ml) und im Verhältnis 1:100 mit dem Verdünnungspuffer auf die Zielkonzentration von 5 U/ml weiter verdünnt.

Jeweils 20 ml des plättchenreichen Plasmas wurden mit 20 ml der Thrombinlösung in einem 50 ml Falcon zusammengebracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur aktiviert, danach bei 1.200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen, steril filtriert und zuletzt zu 7 ml Aliquots bis zur Verwendung weggefroren.

3.3 Zellkulturexperimente

Zur Analyse von Wundheilungsstörungen nach externer Bestrahlung wurden zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

- I) Beim Bestrahlungsversuch wurden die Auswirkungen von externer Bestrahlung unterschiedlicher Intensität (2 Gray (Gy), 6 Gy und 12 Gy) auf

Veränderungen der Zellzahl und der Expression von interzellulären und vaskulären Adhäsionsmolekülen (ICAM, VCAM), IL-6 und Wachstumsfaktoren wie bFGF, PDGF und VEGF analysiert. Als Zellen wurden humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen und humane adipogene Stammzellen verwendet.

- II) Etablierung des *Tube Formation-Assays* und anschließende Untersuchung der Auswirkungen fraktionierter Strahlentherapie (Bestrahlung 48 Stunden und 72 Stunden nach Versuchsbeginn mit jeweils 2 Gy) auf die Angiogenese. Dafür wurden pulmonale Fibroblasten und HDMEC verwendet.

3.3.1 Aufbau und Ablauf des Bestrahlungsversuches

Humane ASC und HDMEC wurden pro Versuchsansatz als Doppelbestimmung jeweils in Mono- und in Ko-Kultur mit unterschiedlichen Intensitäten (2 Gy, 6 Gy und 12 Gy) einmalig bestrahlt. Eine unbestrahlte 6-Wellplatte wurde pro Versuchsbedingung als Kontrolle mitgeführt. Die Zellzahl der hASC betrug in der Monokultur je 35.000 Zellen pro Well, von den HDMEC wurden je 70.000 Zellen pro Well eingesetzt. In der Ko-Kultur wurden pro Well jeweils 35.000 hASC und HDMEC verwendet. Um den Einfluss von PRP auf strahleninduzierte Zellschäden zu untersuchen, wurde 24 Stunden nach der Bestrahlung 5% oder 10% PRP zugegeben. Eine Platte ohne PRP diente als Kontrolle.

Insgesamt wurden fünf vollständige Versuchsreihen durchgeführt (N=5).

3.3.1.1 Ansatz des Bestrahlungsversuches

Begonnen wurde der Versuch mit der sorgfältigen Beschriftung von zwölf 6-Wellplatten. Darauf verzeichnet wurden Anzahl und Zellart mit Passage pro Well, Bestrahlungsintensität (unbestrahlt, 2 Gy, 6 Gy oder 12 Gy), Versuchsbedingung (keine PRP-Zugabe, 5% PRP-Zugabe oder 10% PRP-Zugabe) und Probennummer (in Doppelbestimmung A=B, C=D etc.).

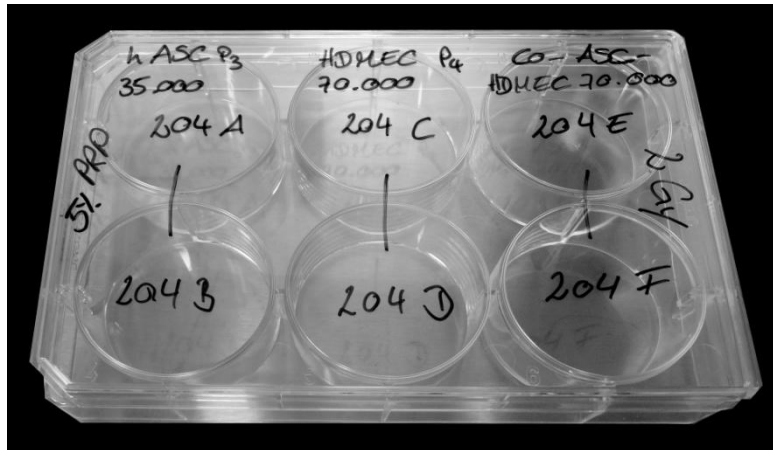


Abbildung 7: beschriftete 6-Wellplatte vor Versuchsbeginn

Insgesamt ergaben sich folgende Versuchsbedingungen:

- Unbestrahlte 6-Wellplatte – ohne PRP-Zugabe; mit 5% PRP-Zugabe; mit 10% PRP-Zugabe
- Mit 2 Gy bestrahlte 6-Wellplatte – ohne PRP-Zugabe; mit 5% PRP-Zugabe; mit 10% PRP-Zugabe
- Mit 6 Gy bestrahlte 6-Wellplatte – ohne PRP-Zugabe; mit 5% PRP-Zugabe; mit 10% PRP-Zugabe
- Mit 12 Gy bestrahlte 6-Wellplatte – ohne PRP-Zugabe; mit 5% PRP-Zugabe; mit 10% PRP-Zugabe

Die jeweilige Zellzahl wurde in einem Volumen von 2 ml Nährmedium pro Well ausgesät. Dabei wurden die hASC im hASC-Nährmedium kultiviert. Die HDMEC in Monokultur, sowie die Ko-kultur mit hASC, wurden in *Endothelial Cell Growth Medium* kultiviert. Um die Zellen gleichmäßig auf das Well zu verteilen wurden die 6-Wellplatten vorsichtig geschwenkt und nach visueller Kontrolle durch das Binokular im Brutschrank inkubiert.

3.3.1.2 Bestrahlung

In Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Regensburg (Prof. Dr. Oliver Kölbl, Dr. Fabian Pohl) erfolgte die Bestrahlung der Zellen 72 Stunden nach Ansatz des Versuches. Hierzu wurden

alle Platten in einer Transportbox aus Styropor in die Klinik für Strahlentherapie gebracht. Auch die Kontrollplatten, die nicht bestrahlt werden sollten, wurden hierbei mitgeführt um gleiche Rahmenbedingungen für alle Platten zu gewährleisten. Zur Bestrahlung wurden die Platten auf dem Behandlungstisch des 6 MV Linearbeschleunigers mit Multilamellenkollimator platziert (Abb. 8) und sukzessive bei Raumtemperatur mit der gewünschten Dosis bestrahlt.

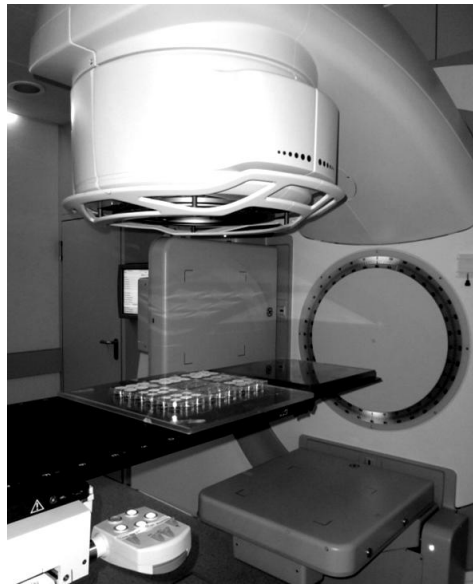


Abbildung 8: *Linearbeschleuniger Primus von Siemens mit zu bestrahlenden 6-Wellplatten auf einer 2 cm dicken Plexiglasscheibe*

Die unbestrahlte Kontrolle verblieb in der Transportbox. Zur Kompensation des Aufbaueffektes wurden unter- und oberhalb der 6-Wellplatten 2 cm dicke Plexiglasscheiben positioniert. Außerdem wurden dosimetrische Messungen durchgeführt, um eine homogene Verteilung der Strahlung zu gewährleisten. Nach Erreichen der gewünschten Strahlendosis wurden die Platten wieder in der Transportbox verpackt, zurücktransportiert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Unmittelbar vor der Bestrahlung erfolgte bei allen Platten ein Mediumwechsel.

3.3.1.3 Zugabe von plättchenreichem Plasma

Für die Zugabe von 5% bzw. 10% PRP wurden alle zwölf 6-Wellplatten 24 Stunden nach der Bestrahlung aus dem Brutschrank entnommen und mikroskopisch auf Kontaminationen untersucht. Nach Zugabe von 100 µl (entsprechen 5% PRP) oder

200 µl (entsprechen 10% PRP) plättchenreichem Plasma wurden die Platten weitere 48 Stunden im Brutschrank kultiviert.

3.3.1.4 Abnahme des Bestrahlungsversuches

Für die Analyse von entsprechenden Mediatoren im Kulturüberstand wurden die Überstände 48 h nach PRP-Zugabe für die Expressionsanalyse abgenommen und mit der Tischzentrifuge 5 Minuten bei 1.200 rpm zentrifugiert um möglichen Zelldetritus zu pelletieren. Anschließend wurden die Probenüberstände zu 1,5 ml in Eppendorfcups aliquotiert und bis zur Analyse mittels ELISA bei -20° C gelagert. Die adhärennten Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit 1 ml PBS mittels 300µl Trypsin/EDTA pro Well abgelöst. Nach der Neutralisation mit 700 µl ASC-Medium bei den Fettstammzellen und mit 700 µl TNS (Trypsin neutralizing solution) bei den Endothelzellen und der Ko-Kultur wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und im Casy® Zählautomaten ausgezählt. Im nächsten Schritt wurde jede Probe nochmals bei 1.200 rpm 5 Minuten zentrifugiert, die Überstände dekantiert, die Pellets im Restvolumen resuspendiert, die Doppelbestimmungen in einem Cup zusammengefasst und ein weiteres Mal zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet weggefroren (-20°C).

3.3.1.5 Vorversuch zur Etablierung des Versuchsprotokolls

Zur Etablierung des Versuchsprotokolls wurde ein Vorversuch durchgeführt. Dabei sollte die Frage geklärt werden, wie sich ein zweiter Mediumwechsel 24 Stunden nach der Bestrahlung zusätzlich zum Mediumwechsel unmittelbar vor der Bestrahlung auf die Zellzahlen auswirkt. Verglichen wurden in Einfachbestimmung:

- a) Tag 1: Versuchsansatz – Tag 4: Medienwechsel und Bestrahlung – Tag 5: PRP-Zugabe (10%) zu ausgewählten Wells ohne erneuten Medienwechsel – Tag 7: Versuchsende

- b) Tag 1: Versuchsansatz – Tag 4: erster Medienwechsel und Bestrahlung – Tag 5: PRP-Zugabe (10%) zu ausgewählten Wells nach erneutem Medienwechsel – Tag 7: Versuchsende

Aufgrund der Ergebnisse wurde das Versuchsprotokoll wie unter Punkt 3.3.1.6 festgelegt.

3.3.1.6 Etabliertes Versuchsprotokoll

Tag 1	Tag 4	Tag 5	Tag 7
Versuchsansatz	Medienwechsel Bestrahlung	PRP-Zugabe	Abnahme des Versuches

3.3.2 Angiogenese-Assay (Tube Formation-Assay)

Mittels *in vitro* Angiogenese-Assay sollte die Auswirkung von fraktionierter Bestrahlung auf die Neovaskularisation untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein Konzept erarbeitet mit welcher Zellpopulation die Versuche durchgeführt werden sollten und welche Zellzahl davon jeweils pro Well angesetzt werden sollte.

3.3.2.1 Ansatz des Versuches

Pro Versuchsansatz wurden zwei 24-Wellplatten verwendet. Die Endothelzellen und pulmonalen Fibroblasten wurden wie unter Punkt 3.1.3 beschrieben geerntet und in 4 ml des jeweiligen Nährmediums resuspendiert. Die benötigte Anzahl an Zellen wurde in einem 50 ml Falcon zusammenpipettiert und das Volumen mit einem speziellen HDMEC-Differenzierungsmedium, dem sogenannten „MasterMix“ (siehe Punkt 2.2; S.31) auf 16 ml aufgefüllt. Die so hergestellte Zellsuspension wurde anschließend nach behutsamem Durchmischen zu 2 ml pro Well auf insgesamt acht Wells (4 Wells pro Platte) verteilt. Pro Well wurden 6.250 Endothelzellen (HDMEC) in Ko-Kultur mit 50.000 pulmonalen Fibroblasten ausgesät. Zur gleichmäßigen Verteilung wurden die 24-Wellplatten vorsichtig geschwenkt und nach visueller Kontrolle im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Der restliche MasterMix wurde bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.3.2.2 Bestrahlung und PRP-Zugabe

Die Bestrahlung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Regensburg. Transport und Bestrahlung wurden analog zu Punkt 3.3.1.2 durchgeführt. Eine Platte pro Ansatz wurde mit jeweils 2 Gy 48 und 72 Stunden nach dem Aussähen der Zellen bestrahlt. Die andere Platte verblieb unbestrahlt als Positivkontrolle.

Im Anschluss wurden die Wells für weitere 3 Tage im Brutschrank kultiviert. Im Allgemeinen wurde auch hier der Mediumwechsel alle 2-3 Tage durchgeführt. Das Volumen des angesetzten Mediums war ausreichend für die gesamte Dauer eines Versuchsansatzes, sodass gleichbleibende Konzentrationsspiegel der einzelnen Inhaltsstoffe gewährleistet werden konnten.

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Fixierung

Zur Fixierung des Tube Assays an Tag 8 wurde das verbrauchte Nährmedium unter Schonung des Zellrasens abgesaugt und jedes Well einmal mit 2 ml PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurde jedes Well mit 0,5 ml eines -20°C kalten Glycerin-Alkohol-Gemisches (Glycinalkohol) für 30 Minuten inkubiert und die Zellen dadurch fixiert. Nach Verwerfen des Glycerin-Alkohol-Gemisches, wurden die Wellplatten mit 2 ml PBS pro Well versetzt und bis zur Färbung im Kühlschrank aufbewahrt. Alternativ wurde sofort mit der immunhistochemischen Färbung begonnen.

3.4.2 CD31-Färbung

Zur Visualisierung bestimmter Proteine in Gewebeschnitten kann das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion genutzt werden. Das zu detektierende Protein stellt dabei das Antigen dar, welches entweder durch einen direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Primärantikörper oder nach Inkubation mit einem ungekoppelten, spezifischen Primärantikörper, in einem zweiten Schritt mit einem

Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert wird. Als Markermolekül für die Ausbildung von Tubes durch Endothelzellen im Zusammenhang mit der Neoangiogenese nach Bestrahlung wurde das Rezeptormolekül *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) auch bekannt als *cluster of differentiation* (CD) 31¹⁵⁰ ausgewählt. PECAM-1 ist ein 130-140 kD großes Glykoprotein, das auf allen humanen Endothelzellen und Thrombozyten, besonders aber im Bereich der Endothelzell-Zell-Kontakte exprimiert wird^{151 152}. Dort fungiert es neben der Stabilisierung der Zell-Zell-Verbindung auch als Mediator für die Migration der Leukozyten¹⁵⁰. Um die im Rahmen des Tube Assay-Versuches neu gebildeten Gefäße erkennbar zu machen, erfolgte die Färbung der tubulären Strukturen mittels direkter CD31-Nachweismethode im Zwei-Schritt-Färbeverfahren. Dabei wurde der Anleitung des Herstellers gefolgt.

Nach der Fixierung mit Glycinalkohol, wurden die Wells dreimal mit Blocking Buffer gewaschen. Das bovine Serumalbumin im Blocking Buffer bewirkt, dass unspezifische Bindungsstellen an den Zellen geblockt werden, damit sich der Primär- oder Sekundärantikörper nicht unspezifisch daran binden kann. Anschließend wurden die Wells mit 100 µl der Primärantikörperlösung (monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes PECAM-1) für 60 min bei 37°C inkubiert. Dabei bindet der Antikörper an PECAM-1, das von den Endothelzellen exprimiert wird. Nach drei weiteren Waschvorgängen mit Blocking Buffer erfolgte dann die einstündige Inkubation mit einem alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper bei 37°C, der sich spezifisch gegen das F_C-Fragment des Primärantikörpers richtet. Das Fast Red dient im nächsten Schritt als Substrat für die alkalische Phosphatase des Sekundärantikörpers und wird durch diese enzymatisch zu einem roten Farbstoff umgesetzt. Endothelzellen erscheinen dadurch rot im Durchlicht-Mikroskop. Zur Herstellung der Färbelösung wird Fast Red in destilliertem Wasser aufgelöst und steril filtriert. Nach dreimaligem Waschen der Wells mit Aqua dest. wurden pro Well 500 µl Fast Red Lösung zugegeben und für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zuletzt wurden die Präparate mit entmineralisiertem Wasser gründlich gespült und getrocknet. Das Ergebnis der Immunfärbung wurde mikroskopisch analysiert.

3.5 Proteinexpressionsanalyse mittels ELISA

Die Proteinexpressionsanalyse mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde durchgeführt um Auswirkungen der Bestrahlung auf die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch Fettstammzellen und Endothelzellen in Mono- und Ko-Kultur zu untersuchen. Gleichermäßen erfolgte auch die Charakterisierung des plättchenreichen Plasmas durch diese Technik. Beim ELISA handelt es sich um ein antikörperbasiertes Verfahren zum Nachweis von Proteinen und zu deren Quantifizierung anhand einer definierten Standardreihe. In Tabelle 7 sind die hier untersuchten Proteine aufgelistet.

Tabelle 7: Zelltyp und jeweilig bestimmte Expressionsfaktoren

Zelltyp	Expressionsfaktoren
hASC, HDMEC, Ko-Kultur	sICAM-1 sVCAM-1 IL-6 bFGF PDGF-AB VEGF
PRP	sICAM-1 sVCAM-1 IL-6 bFGF VEGF

Für die Studie kamen die DuoSet Kits von R&D Systems zum Einsatz, welche nach Herstellerangaben angewendet wurden. Hierbei wird das Prinzip des *Sandwich-ELISA-Systems* angewandt.

An Tag 1 wurden 96-Wellplatten mit dem ersten Antikörper beschichtet, dessen Spezifität gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist. Dazu wurden 100 µl einer Arbeitslösung des *Capture*-Antikörpers in jedes Well gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. An Tag 2 wurde ausgehend von der Maximalkonzentration bis zum *Blank* (0-Wert, entspricht dem reinen Verdünnungsreagenz) mit der Herstellung der 7-Punkt-Standardverdünnungsreihen in RD begonnen. Diese stellen die Positivkontrollen des Verfahrens dar und werden

zur Konzentrationsbestimmung der eingesetzten, unbekanntenen Proben benötigt. Zur Charakterisierung des PRP wurden außerdem Verdünnungsreihen ausgehend von der reinen Probe bis zum Verhältnis von 1:1024, sowie 2,5%, 5% und 10% PRP in RD erstellt. Nachdem die Platten dreimal mit ca. 400 µl Waschpuffer pro Well gewaschen wurden, wurden sie mit 300 µl RD pro Well für mindestens eine Stunde geblockt. Im Anschluss daran folgte ein weiterer Waschvorgang (1 Waschvorgang \triangleq 3x Waschen mit 400 µl Waschpuffer pro Well) und die Verteilung von je 100 µl des Standards, des Blanks (=RD), der PRP-Verdünnungen und der Probe. Für den Nachweis von IL-6 wurden die Proben im Verhältnis 1:10 verdünnt, damit die Werte innerhalb der Standardkurve lagen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

An Tag 3 wurden die Platten gewaschen um ungebundene Antigene zu entfernen. Danach wurde jedes Well mit 100 µl der Arbeitslösung des zweiten Antikörpers (*Detection-Antibody*) versetzt, an dessen F_C -Fragment Biotin gebunden ist. Nach zwei Stunden Inkubation des Sekundärantikörpers und einem Waschvorgang, wurden pro Well 100 µl einer *Streptavidin-HRP*-Lösung für 20 Minuten zugegeben. Diese fungiert als Verstärker der Reaktion, da sich Streptavidin im Verhältnis 4:1 an Biotin bindet. Die Platten lagerten während der Inkubationszeit im Dunkeln. Nach diesem Schritt wurden die Platten wiederholt gewaschen und 100 µl *Substrate Solution* auf jedes Well verteilt. Anschließend wurden die Platten so lange im Dunkeln inkubiert, bis ein deutlicher Farbumschwung nach blau erkennbar war.

Zuletzt wurde die Reaktion mit 50 µl *Stop Solution* pro Well beendet (2M H_2SO_4 , Farbumschwung nach gelb) und die Absorption im Tecan Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Konzentration der untersuchten Proteine in den Proben wurde anhand der Standardkurve in Excel bestimmt.

3.6 Statistische Auswertung

3.6.1 Statistische Auswertung des Bestrahlungsversuches

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Excel MS Office. Die graphische Darstellung der ermittelten Daten, dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung, sowie die Errechnung der Signifikanzen über den Mann-Whitney-Test (unpaired two-

tailed t-test) wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA 92037 USA) realisiert. Wenn nicht anders gekennzeichnet entspricht $p < 0,05$ einfach signifikant (*) und $p < 0,01$ zweifach signifikant (**).

3.6.2 Statistische Auswertung des Tube Formation-Assay's

Die Auswertung des Tube Formation-Assay's erfolgte mit AngioQuant® (*IEEE Transactions on Medical Image Processing*) einem frei erhältlichen, automatischen Bildanalyseprogramm zur Quantifizierung von *in vitro* Angiogeneseversuchen. In der Vorbereitung für die Auswertung wurden pro Well fünf Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop mittels 4er Objektiv, bei doppelter Vergrößerung aufgenommen. Dazu wurde pro Well jeweils mit gleichen Programmeinstellungen ein Bild vom Zentrum, dem oberen, unteren, rechten und linken Wellausschnitt gemacht. Beim Photographieren wurde darauf geachtet, dass die Bildausschnitte genügend Abstand zum Wellrand einhielten, da es dort zu Effekten kommt, die die Ergebnisse verfälschen. Pro Bedingung wurden auf diese Art 20 Bilder erstellt. Um eine Stichprobenverzerrung durch subjektive Bearbeitung der Bilder zu verhindern, wurden die Photos mittels *Batch Processing Mode* des Programms ausgewertet. Alle Bilder wurden mit den gleichen Voreinstellungen automatisch durch das Programm analysiert (*automatic low and high threshold, kernel size 1, not removed edges, prune size 10*) ohne, dass manuell interveniert wurde. Die Ergebnisse stellt das Programm AngioQuant® in Form einer Excel Tabelle dar, die die wichtigsten Charakteristika enthält. Diese sind:

- Anzahl der tubulären Komplexe
- Totale und durchschnittliche Länge der tubulären Komplexe in Pixel
- Totale und durchschnittliche Größe (Dicke und Länge) der tubulären Komplexe in Pixel
- Totale und durchschnittliche Anzahl der Kreuzungspunkte der tubulären Komplexe

Das Verhältnis der Fläche der tubulären Komplexe zur Gesamtfläche des Bildes wurde anhand der Pixel für jedes Bild einzeln berechnet. Dabei entsprach die Gesamtfläche pro Bild 348.160 Pixel. Die totale Größe stellt die Fläche, die mit

tubulären Komplexen besetzt ist, in Pixel dar. Berechnet wurde die von tubulären Komplexen belegte Fläche in Prozent wie folgt:

$$100\% \times \frac{\textit{Totale Größe in Pixel}}{348.160 \textit{ Pixel}}$$

Die weitere Aufbereitung der Daten erfolgte mit Excel MS Office. Die graphische und statistische Darstellung wurde mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Es wurde der Man-Whitney Test angewendet. Wenn nicht anders gekennzeichnet entspricht $p < 0,05$ einfach signifikant (*) und $p < 0,01$ zweifach signifikant (**).

4. Ergebnisse

4.1 Viabilität der Zellen im Vorversuch zum Bestrahlungsversuch

Um den Einfluss des Zeitpunktes des letzten Mediumwechsels auf die Viabilität der jeweiligen Zelltypen nach Bestrahlung zu untersuchen, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Verglichen wurde die vitale Zellzahl eines Ansatzes nach Bestrahlung mit einmaligem Mediumwechsel 24 Stunden vor der Strahlenanwendung, mit der vitalen Zellzahl eines Ansatzes nach Bestrahlung mit einem zusätzlichen Mediumwechsel 24 Stunden nach der Strahlenanwendung. Wie im Methodenteil beschrieben, wurde hierzu die Zellzahl mit Hilfe des Casy® Zellzählautomaten bestimmt. Im Folgenden ist der Unterschied der Zellzahl bei einmaligem Mediumwechsel zur Zellzahl bei zweimaligem Mediumwechsel, unterteilt nach Zelltyp graphisch dargestellt.

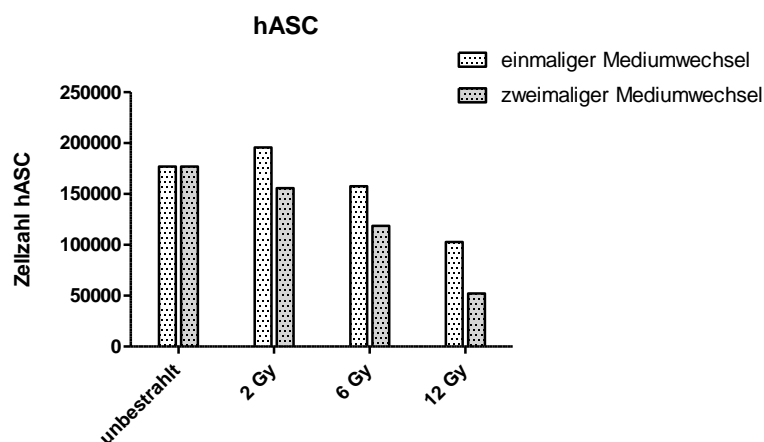


Abbildung 9: Zellzahl von hASC 48h nach Bestrahlung mit 2 Gy, 6 Gy und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle bei einmaligem (weiß) und zweimaligem (blaugrau) Mediumwechsel.

Bei humanen adipogenen Stammzellen bewirkt ein zweiter Mediumwechsel 24 Stunden nach Bestrahlung tendenziell eine Abnahme der Viabilität der Zellen. Bei zweimaligem Mediumwechsel zeigte sich ein maximaler Unterschied zwischen unbestrahlter Kontrolle (177.000 lebende Zellen) und nach einer Bestrahlung mit 12 Gy, bei der mehr als 70% der Zellen abstarben (52.200 überlebende Zellen). Bei einem einmaligen Mediumwechsel hingegen, verringerte sich die Zellzahl der mit 12 Gy bestrahlten Zellen lediglich um ca. 40% im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (176.900 lebende Zellen) auf 102.900 überlebende Zellen (Siehe Abb.9).

Im Gegensatz dazu führte der zweimalige Mediumwechsel bei den HDMEC zu höheren Zellzahlen. Der Unterschied zwischen einmaligem zu zweimaligem Mediumwechsel nach der Bestrahlung mit der Maximaldosis von 12 Gy lag bei 17%. Fanden sich nach einmaligem Mediumwechsel mit 12 Gy noch 130.200 Zellen im Vergleich zu 427.100 Zellen (unbestrahlte Kontrolle), so waren es bei zweimaligem Mediumwechsel noch 230.900 Zellen im Vergleich zu 484.700 Zellen (unbestrahlte Kontrolle) (Siehe Abb. 10).

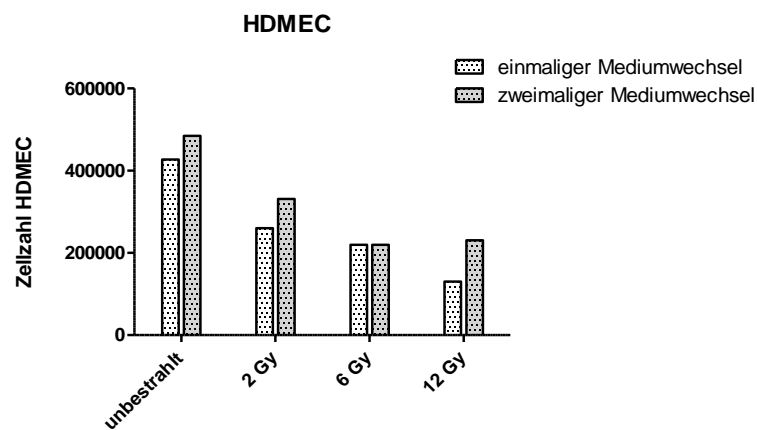


Abbildung 10: Zellzahl von HDMEC 48h nach Bestrahlung mit 2 Gy, 6 Gy und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle bei einmaligem (weiß) und zweimaligem (blaugrau) Mediumwechsel.

Bei der Ko-Kultur (Siehe Abb. 11) konnte hingegen keine eindeutige Tendenz bezüglich der Viabilität der Zellen festgestellt werden. Es zeigte sich bei den Ansätzen, die keiner oder nur geringer Strahlung (2 Gy) ausgesetzt waren, ein Vorteil im Überleben der Zellen bei zweimaligem Mediumwechsel. Bei Bestrahlung mit höheren Strahlenintensitäten (6 Gy und 12 Gy) überlebten hingegen mehr Zellen bei einmaligem Mediumwechsel.

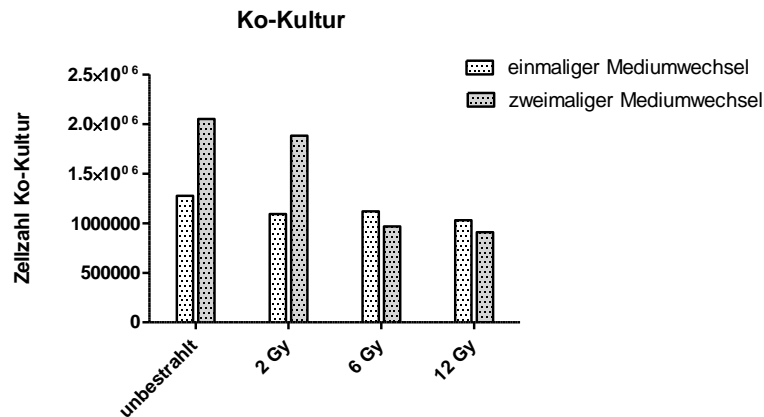


Abbildung 11: Zellzahl der Ko-Kultur aus hASC und HDMEC 48h nach Bestrahlung mit 2 Gy, 6 Gy und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle bei einmaligem (weiß) und zweimaligem (blaugrau) Mediumwechsel.

Da kein eindeutiger Vorteil eines zweiten Mediumwechsels gezeigt werden konnte, entschied man sich für das praktikablere und in früheren Versuchen bewährte Protokoll, bei welchem das Medium nur einmal 24 Stunden nach der Bestrahlung ausgewechselt wird.

4.2 Zellzahlen im Bestrahlungsversuch

4.2.1 Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungsdosen auf die Zellviabilität

Zur Untersuchung des Effektes zunehmender ionisierender Strahlung auf das Überleben humaner adipogener Stammzellen und humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen in Einzel- und in Ko-Kultur, wurde die Zellzahl der überlebenden Zellen 48 Stunden nach Bestrahlung bestimmt. In Abbildung 12 ist die Zellzahl in Prozent des jeweiligen Zelltypes im Vergleich zur jeweiligen unbestrahlten Kontrolle (100%) dargestellt.

Zellüberleben

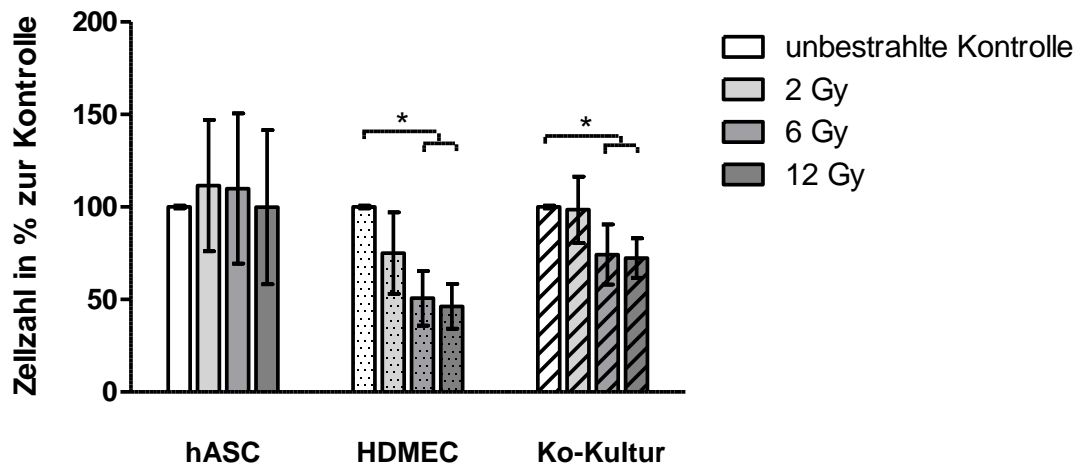


Abbildung 12: Zellzahl der hASC und HDMEC in Einzel- und Ko-Kultur 48h nach Bestrahlung mit 2 Gy, 6 Gy und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

Bei hASC konnte aufgrund der hohen Standardabweichungen kein signifikanter Unterschied zwischen den bestrahlten Wells und der unbestrahlten Kontrolle festgestellt werden. Nach externer Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy zeigte sich teilweise eine weitere Proliferation der hASC über die 100% der unbestrahlten Kontrolle hinaus. Die Gruppe der HDMEC zeigte mit einem Abfall der Zellzahl auf 50,69% ($p=0,0112$) ab einer Bestrahlung mit 6 Gy eine signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die doppelte Strahlendosis von 12 Gy führte zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl auf 46,32% ($p=0,0112$) der unbestrahlten Kontrolle, während nach Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden. Ähnlich verhält es sich mit dem Zellüberleben der beiden Zelltypen in Ko-Kultur. Nach externer Bestrahlung mit der niedrigen Dosis von 2 Gy blieb die Zellzahl unbeeinflusst. Ab einer Strahlendosis von 6 Gy sankt die Zellzahl signifikant ($p=0,0112$) auf 74,31% bzw. 72,38% bei 12 Gy ab.

4.2.2 PRP-Effekt auf die Zellzahlen im Bestrahlungsversuch

Weiterhin wurde der Einfluss von PRP auf die absolute Zellzahl nach externer Bestrahlung untersucht.

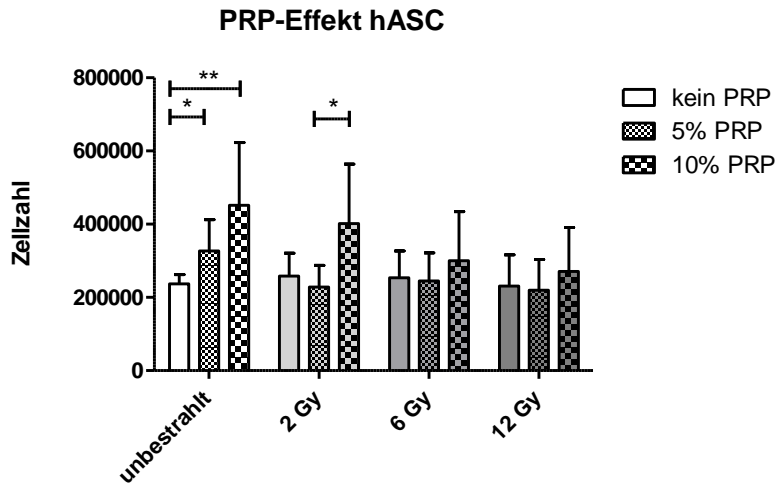


Abbildung 13: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die absolute Zellzahl von hASC nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet

In den unbestrahlten hASC wird durch Zugabe von PRP die Zellzahl signifikant erhöht. Die Zugabe von 5% PRP induzierte eine Erhöhung der Zellzahl um 37,83% von durchschnittlich 237.293 Zellen pro Well (ohne PRP) auf durchschnittlich 327.056 Zellen pro Well ($p=0,0159$) während 10% PRP eine Erhöhung der Zellzahl um 90,29% auf 451.533 Zellen pro Well ($p=0,0079$) bewirkte (Abb.13). Mit zunehmender Bestrahlungsintensität war dieser Effekt jedoch nicht mehr feststellbar. Abbildung 13 zeigt, dass bei einer Bestrahlungsintensität von 2 Gy nur die Zugabe von 10% PRP zu einer Erhöhung der Zellzahl führte (43,20% $p=0,0317$). Bei Bestrahlung der hASC mit 6 und 12 Gy konnte kein Effekt von PRP auf die Zellzahl beobachtet werden (Abb. 13).

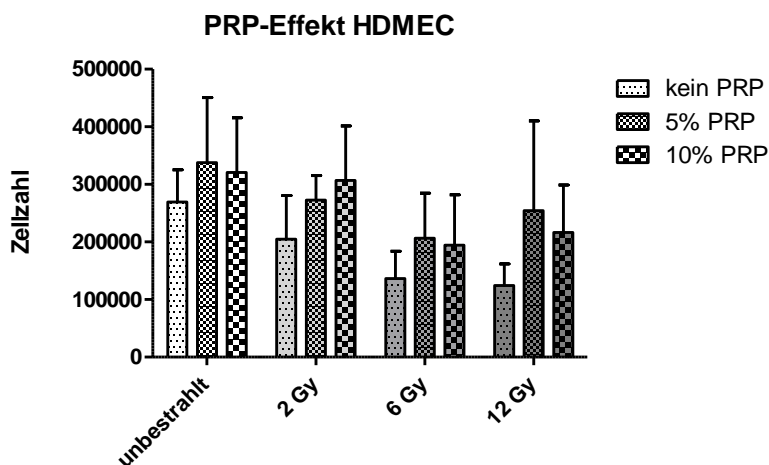


Abbildung 14: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die absolute Zellzahl von HDMEC nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

Durch Zusatz von 5 und 10% PRP wurde in unbestrahlten und bestrahlten HDMEC die Zellzahl tendenziell erhöht. Der Effekt wurde aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht statistisch signifikant (Abb. 14).

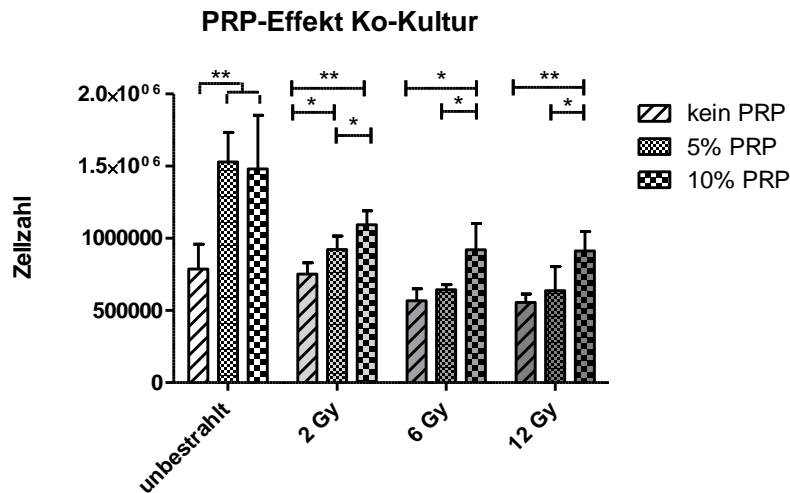


Abbildung 15: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die absolute Zellzahl von hASC und HDMEC in Ko-Kultur nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

In der Ko-Kultur zeigte sich bei allen Strahlenintensitäten und in den unbestrahlten Zellen ein signifikanter PRP-Effekt auf die Zellzahl. Am deutlichsten war die Proliferationssteigerung bei den unbestrahlten Zellen zu sehen, bei denen die Zugabe von 5% PRP fast zu einer Verdopplung der Zellzahl (194,14% zur Kontrolle ohne PRP, $p=0,0079$) führte. Zugabe von 10% PRP steigerte die Zellzahl um 87,93% ($p=0,0079$). In Kulturen, die mit 2 Gy bestrahlt wurden führte sowohl die Zugabe von 5% PRP zu einer signifikanten Zellzahlzunahme (22,50% $p=0,0159$), als auch die Stimulation mit 10% PRP (45,32% $p=0,0079$). Auch der Unterschied zwischen 5% und 10% PRP nach Bestrahlung mit 2 Gy war signifikant ($p=0,0317$). Mit zunehmender Strahlenintensität (6 Gy und 12 Gy) zeigten sich vergleichbare positive Effekte auf die Zellzahl durch PRP-Behandlung, die ab einer Dosis von 10% PRP signifikant wurden. Dies entsprach einer Steigerung der Zellzahl um 62,53% ($p=0,0159$) bei 6 Gy und um 64,22% ($p=0,0079$) bei 12 Gy. Desweiteren war auch hier der Unterschied zwischen 5% und 10% PRP signifikant ($p=0,0317$ bei 6 Gy und $p=0,0159$ bei 12 Gy) (Abb.15).

4.3 Einfluss externer Bestrahlung auf die Proteinexpression löslicher Mediatoren

4.3.1 Einfluss zunehmender Strahlenintensität auf die Proteinexpression von hASC und HDMEC

Weiterhin wurde die Auswirkung zunehmender Strahlensintensität auf die Proteinexpression von IL-6, bFGF, VEGF, PDGF, ICAM und VCAM bestimmt. Die gemessenen absoluten Proteinkonzentrationen wurden auf die jeweilige Zellzahl bezogen und die Proteinkonzentration als pg / 1000 Zellen dargestellt.

Bei hASC in Monokultur zeigte der IL-6 Proteinspiegel tendenziell (Abb. 16A) einen Abfall mit Zunahme der applizierten Dosis. Ausgehend von durchschnittlich 20,58 pg/1000 Zellen in der unbestrahlten Kontrolle sank der Wert bis auf 12,50 pg/1000 Zellen nach Bestrahlung mit 12 Gy ab. Ein umgekehrter Effekt wurde bei HDMEC beobachtet. Bei diesen stieg mit Erhöhung der Bestrahlungsdosis auch die Expression von IL-6 an. Ausgehend von der unbestrahlten Kontrolle (0,74 pg/1000 Zellen) stieg die IL-6 Konzentration auf 6,12 pg/1000 Zellen in HDMEC, die mit 12 Gy bestrahlt wurden, an. In der Ko-Kultur war kein eindeutiger Effekt festzustellen und die Werte wiesen eine starke Streuung innerhalb der Gruppen auf.

Bezüglich der bFGF-Proteinkonzentration (Abb. 16B) konnte bei hASC und HDMEC kein deutlicher Bestrahlungseffekt gemessen werden. In der Ko-Kultur konnte ein dosisabhängiger Anstieg der bFGF-Konzentration beobachtet werden. Bei einem Ausgangswert von 0,018 pg/1000 Zellen in den unbestrahlten Kontrollen, verursachte die Bestrahlung mit 2 Gy eine Steigerung um 22,22% auf 0,022 pg/1000 Zellen ($p=0,3095$). Applikation von 6 Gy steigerte die bFGF-Expression signifikant um 250% auf 0,045 pg/1000 Zellen ($p=0,0079$), während 12 Gy einen Anstieg der bFGF-Konzentration um 300% auf 0,054 pg/1000 Zellen ($p=0,0079$) induzierte.

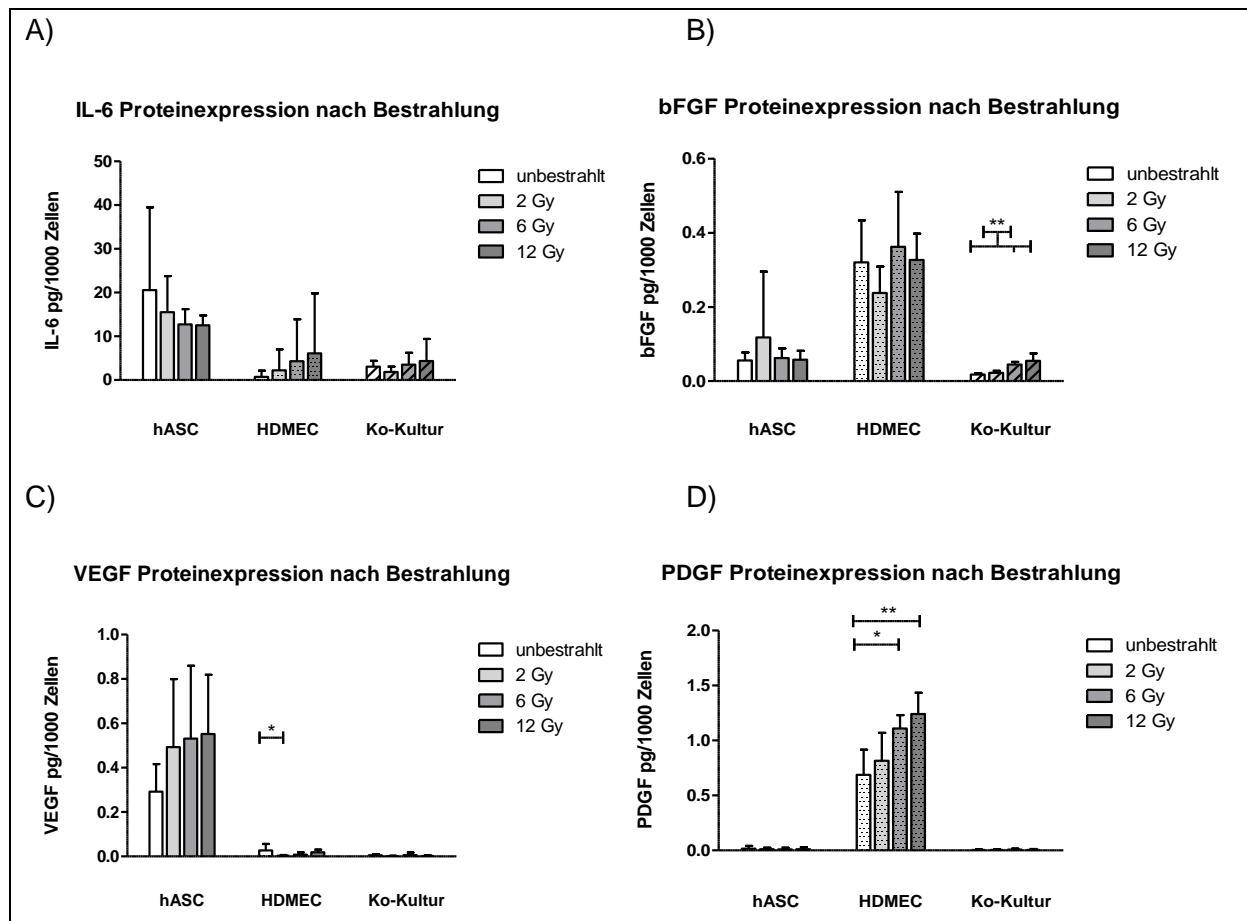


Abbildung 16: Proteinexpression von IL-6, bFGF, VEGF und PDGF in Zellkulturüberständen von Monokulturen und Ko-Kulturen von hASC und HDMEC 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ () festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.**

Die durchschnittliche VEGF Proteinexpression (Abb. 16C) durch hASC in Monokultur, stieg mit zunehmender Bestrahlung von 2 Gy auf 12 Gy zwar nicht signifikant, jedoch stetig an. Bei HDMEC in Monokultur sank die Menge an VEGF nach Bestrahlung mit 2 Gy signifikant auf fast ein Zehntel des Wertes der unbestrahlten Kontrolle ab. Die Ko-Kultur folgte keiner Korrelation und wies insgesamt nur sehr niedrige Konzentrationsspiegel auf.

Während bei hASC in Mono- und in Ko-Kultur mit HDMEC eine durchgängig niedrige Konzentration von PDGF (Abb. 16D) gemessen wurde, stiegen die Werte bei HDMEC in Monokultur mit zunehmender Strahlenintensität kontinuierlich an. Dieser Effekt wurde signifikant nach Bestrahlung mit 6 Gy ($p=0,0159$) und 12 Gy ($p=0,0079$).

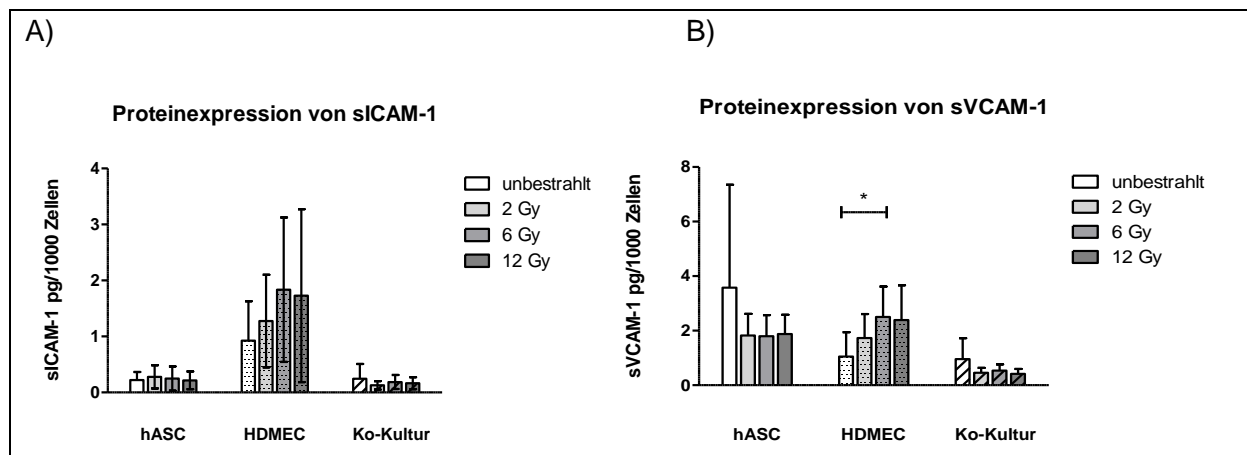


Abbildung 17: Proteinexpression von sICAM und sVCAM in Zellkulturüberständen von Monokulturen und Ko-Kulturen von hASC und HDMEC 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

Sowohl in der Monokultur der hASC, als auch in der Ko-Kultur von hASC mit HDMEC wurden kaum Unterschiede in der Proteinexpression von löslichem ICAM-1 mit zunehmender Strahlenintensität gemessen (Abb. 17A). HDMEC in Monokultur zeigten hingegen die Tendenz zur vermehrten Freisetzung von löslichem ICAM-1 mit Erhöhung der applizierten Strahlendosis. Auch die Proteinexpression von löslichem VCAM-1 durch HDMEC stieg dosisabhängig kontinuierlich an (Abb. 17B). Dieser Anstieg war nach Bestrahlung mit 6 Gy signifikant und ergab eine Zunahme um nahezu 238% bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle. In den Monokulturen der hASC sowie in der Ko-Kultur von hASC mit HDMEC inhibierte externe Bestrahlung dosisunabhängig die Expression von löslichem VCAM-1. Aufgrund der hohen Streuung der Werte konnte keine Signifikanz berechnet werden.

4.3.2 Einfluss von PRP auf die Expression löslicher Mediatoren nach externer Bestrahlung

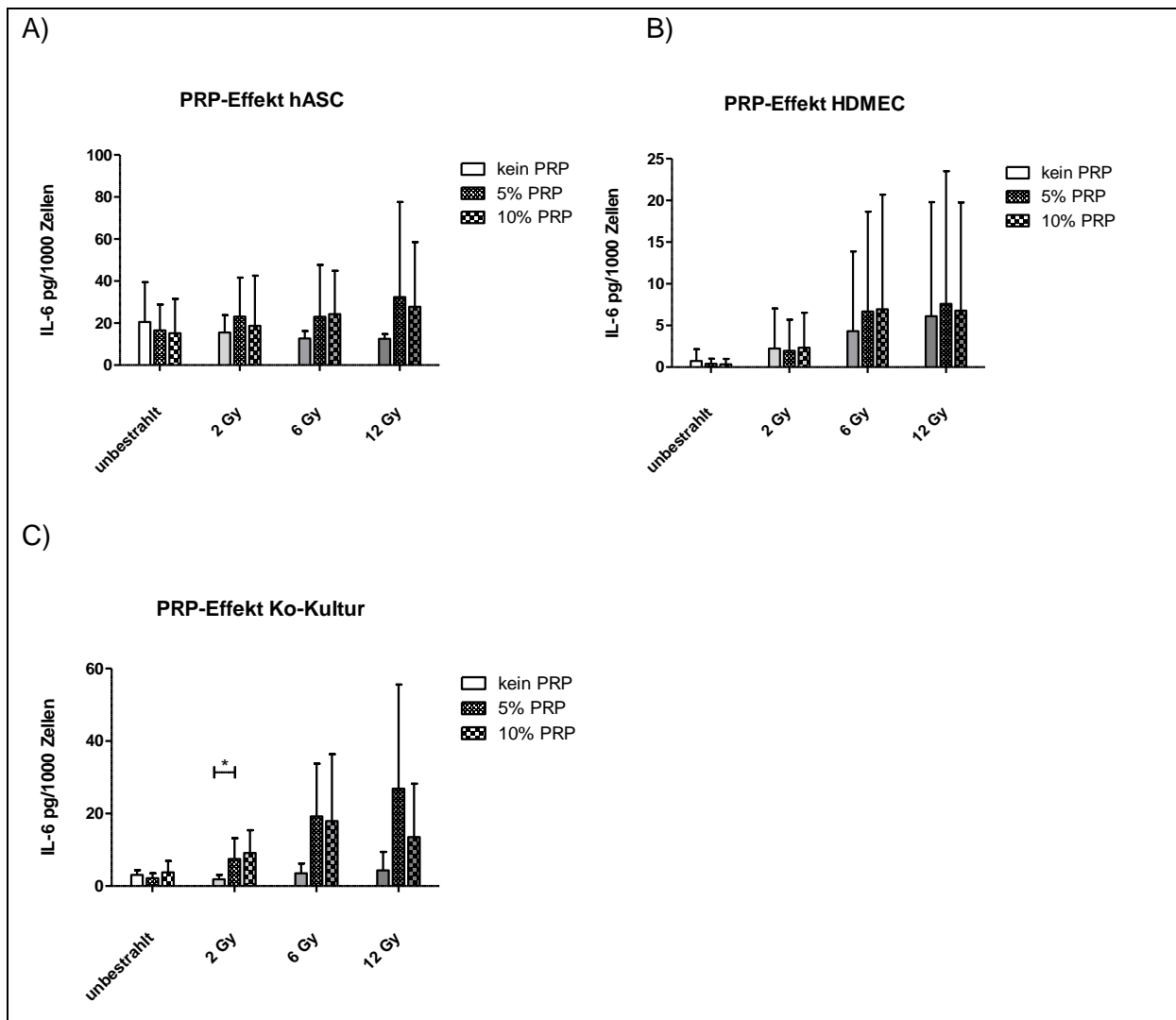


Abbildung 18: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die Proteinexpression von IL-6 in hASC (A), HDMEC (B) und der Ko-Kultur von hASC und HDMEC (C) 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

In den hASC (Abb. 18A) bewirkte die Zugabe von 5% oder 10% PRP bei unbestrahlten Zellen eine Inhibition der IL-6 Proteinexpression, während PRP-Applikation nach Bestrahlung eine Steigerung induzierte. Dabei bewirkte die Erhöhung der PRP-Konzentration von 5% auf 10% nur nach Bestrahlung mit 6 Gy eine weitere Zunahme der IL-6 Proteinlevel. Ähnliche Effekte konnten nach Bestrahlung und PRP-Zugabe in HDMEC (Abb. 18B) beobachtet werden. Hier wurde ab einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy ein Anstieg von IL-6 über die Konzentration der

jeweils unbehandelten Kontrolle gemessen. Auch die Zellen in Ko-Kultur (Abb. 18C) exprimierten nur nach Bestrahlung erhöhte Konzentrationen an IL-6 durch 5% bzw. 10% PRP-Zugabe. In unbestrahlten Ko-Kulturen wurden keine PRP-induzierten Effekte beobachtet. Insgesamt konnte durch die Behandlung bestrahlter Zellen mit 5% PRP eine neun- bis elffache Steigerung der IL-6 Proteinexpression beobachtet werden. Dieser Effekt wurde mit Zunahme der Strahlenintensität gesteigert und war 48 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy signifikant ($p=0,0317$). Eine weitere Konzentrationserhöhung des PRP auf 10% zeigte ähnliche Tendenzen, ergab jedoch keine Signifikanz.

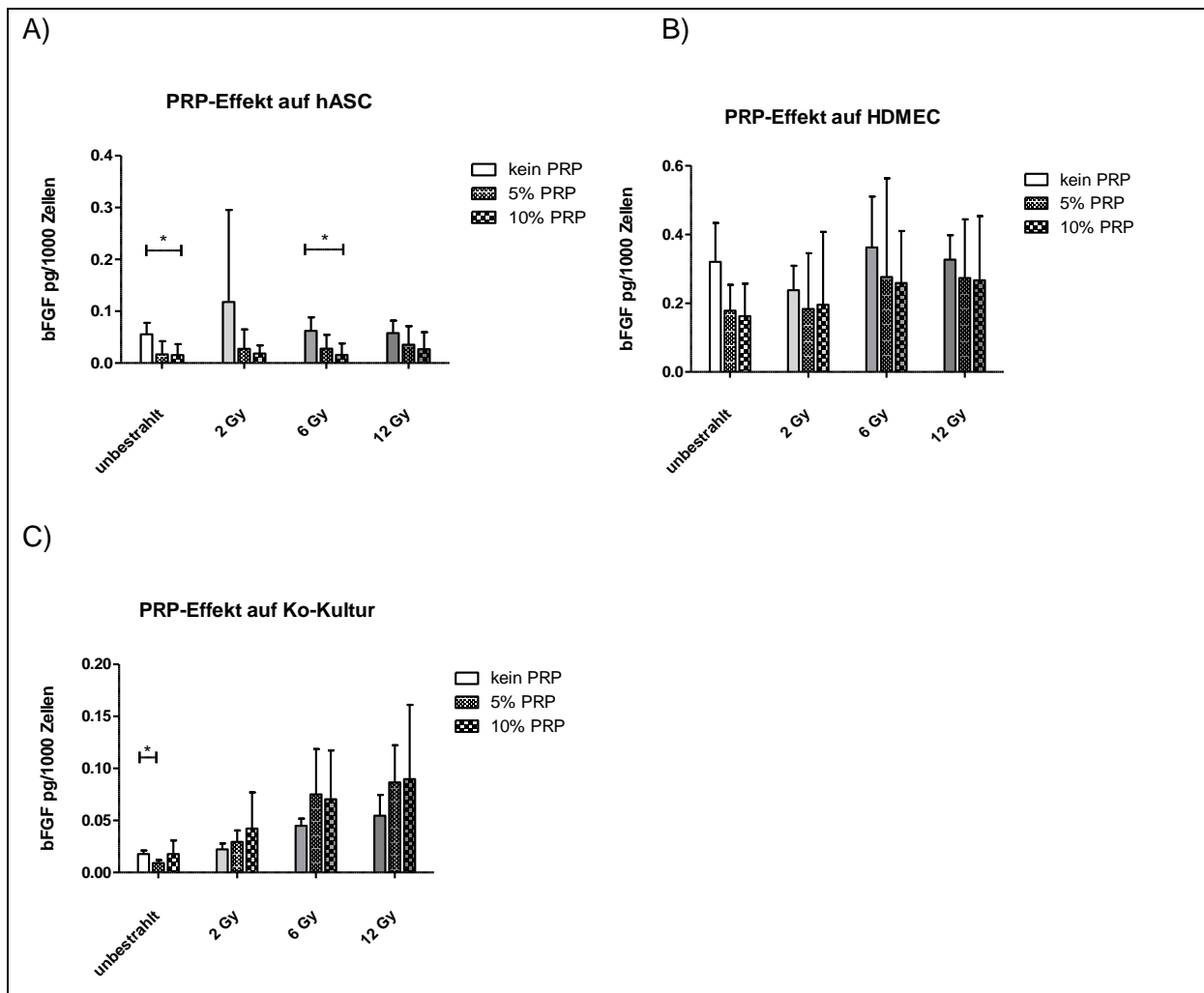


Abbildung 19: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die Proteinexpression von bFGF in hASC (A), HDMEC (B) und der Ko-Kultur von hASC und HDMEC (C) 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

Die Behandlung von hASC (Abb. 19A) und HDMEC (Abb. 19B) mit PRP führte in der jeweiligen Monokultur zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der bFGF-Konzentration. In den hASC war dieser Effekt bei einer Konzentration von 10% PRP signifikant in der unbestrahlten Kontrolle ($p=0,0362$) sowie nach Bestrahlung mit 6 Gy ($p=0,0317$). In der Ko-Kultur (Abb. 19C) stieg mit Zunahme der PRP-Konzentration auch die Proteinexpression von bFGF 48 Stunden nach Bestrahlung an. Insgesamt konnte bei Kulturen ohne PRP eine strahlendosisabhängige Zunahme von bFGF im Zellüberstand gemessen werden, die bei bestrahlten Zellen durch Behandlung mit 5% und 10% PRP zu einer weiteren Erhöhung der bFGF-Konzentration führte. Einzig in der unbestrahlten Kontrolle zeigte die Zugabe von 5% PRP eine signifikante Reduktion ($p=0,0159$).

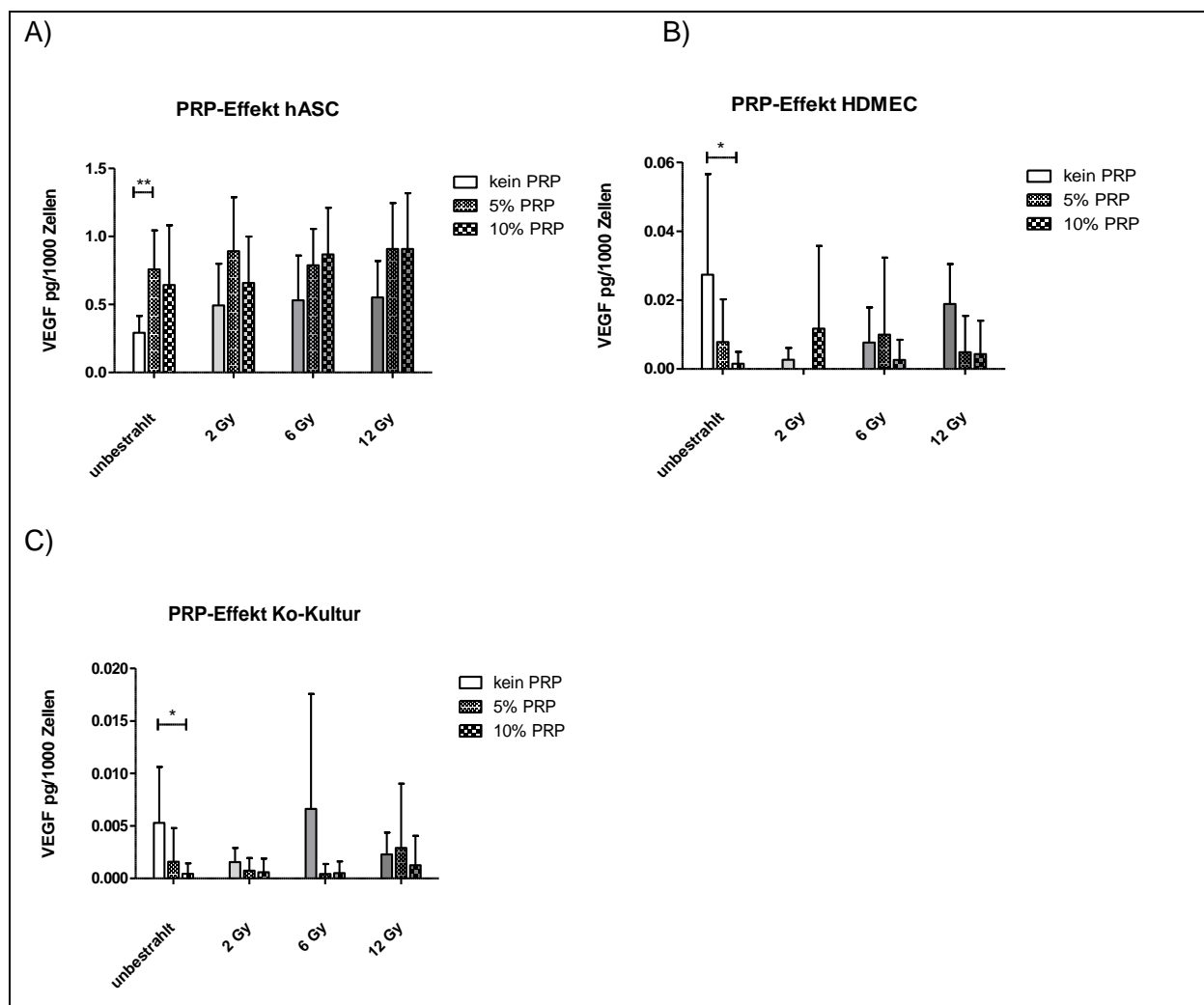


Abbildung 20: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die Proteinexpression von VEGF in hASC (A), HDMEC (B) und der Ko-Kultur von hASC und HDMEC (C) 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ () festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.**

hASC zeigten eine generelle Tendenz zur Induktion der VEGF Expression nach PRP-Applikation (Abb. 20A). In Zellkulturüberständen von unbestrahlten hASC wurden dreifach höhere VEGF-Konzentrationen nach Stimulation mit 5% PRP gemessen ($p=0,0079$). Bei HDMEC in der Monokultur und in der Ko-Kultur wurde nach PRP-Zugabe ein Abfall der VEGF-Konzentration gemessen. Diese Beobachtung wurde nach Zugabe von 10% PRP in der jeweilig unbestrahlten Kontrolle (Abb. 20B) und (Abb. 20C) im Vergleich zur Kontrolle ohne PRP signifikant. Tendenziell fiel die Proteinkonzentration mit Zunahme der PRP-Konzentration in der HDMEC-Monokultur sowie in der Ko-Kultur ab.

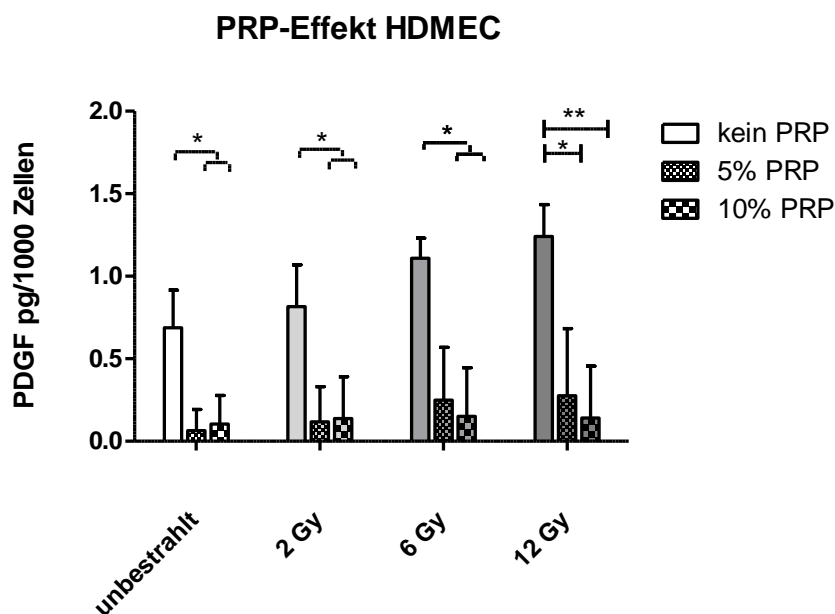


Abbildung 21: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die Proteinexpression von PDGF in HDMEC 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen ($N=4$). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

Auf die Proteinexpression von PDGF hatte plättchenreiches Plasma (Abb. 21) allein in der HDMEC-Monokultur messbare Effekte. Die Zugabe von 5% bzw. 10% PRP führte jeweils zu einer signifikanten Abnahme der Proteinkonzentration in jeder Strahlendosis. Nach Bestrahlung mit 12 Gy und Behandlung mit 10% PRP war dieser Effekt darüber hinaus hochsignifikant ($p=0,0097$).

Die Zellkulturen zeigten in Hinblick auf die Expression von löslichem ICAM-1 sowohl in Mono- als auch in Ko-Kultur (Abb. 22A-C) keine Signifikanz, jedoch tendenziell eine Zunahme der Proteinkonzentration nach PRP-Zugabe. Zwischen den einzelnen Versuchsansätzen variierte die gemessene Proteinexpression stark. Auch in der Proteinexpression von löslichem VCAM-1 (Abb. 22D-F) konnte kein Effekt durch PRP-Zugabe beobachtet werden. Gleichfalls wurde zwischen den einzelnen Versuchsansätzen eine hohe Varianz beobachtet.

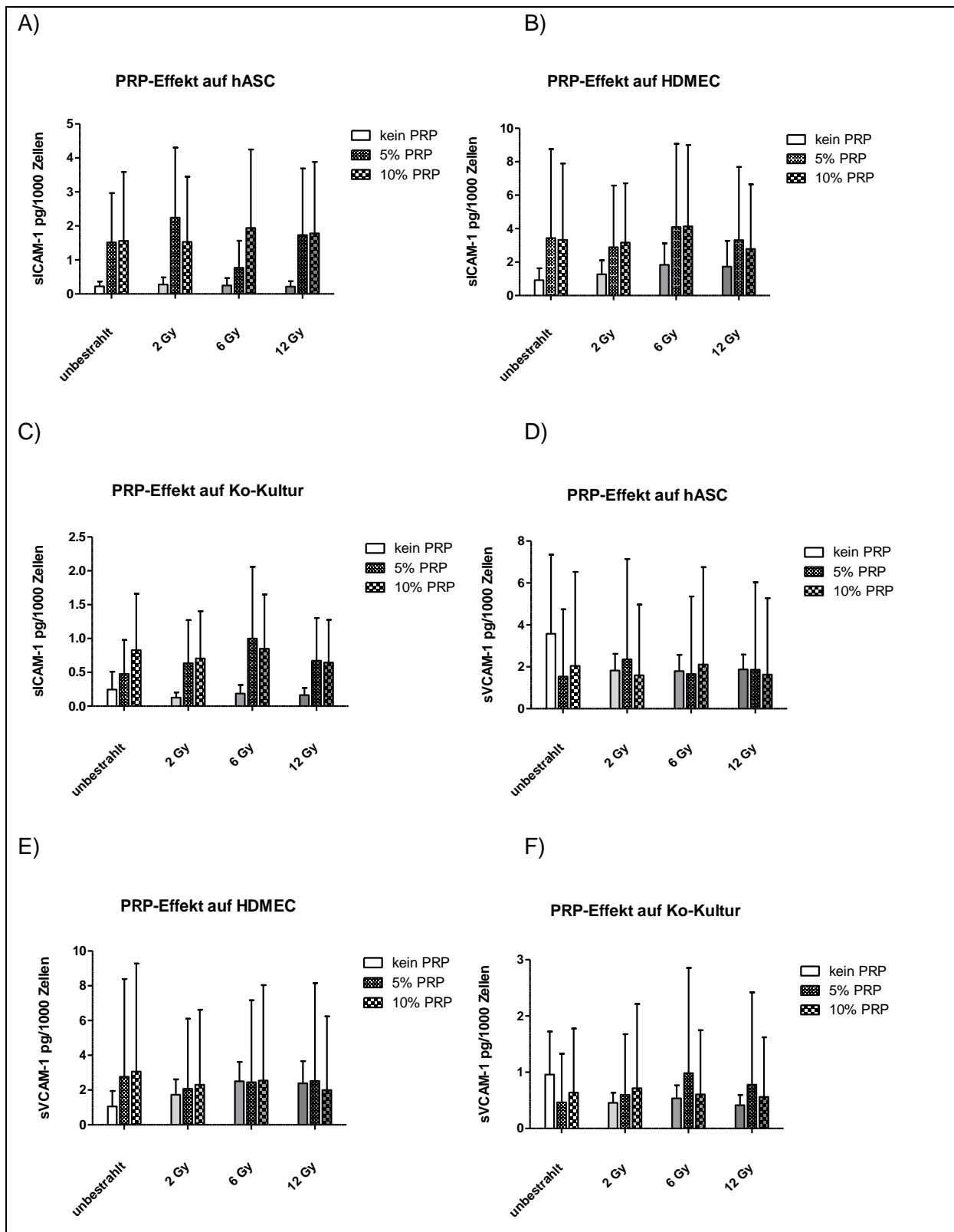


Abbildung 22: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die Proteinexpression von sICAM-1 (A-C) und sVCAM-1 (D-F) in hASC, HDMEC und Ko-Kultur 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

4.4 Auswirkungen von Bestrahlung auf die Bildung tubulärer Komplexe im Tube Assay

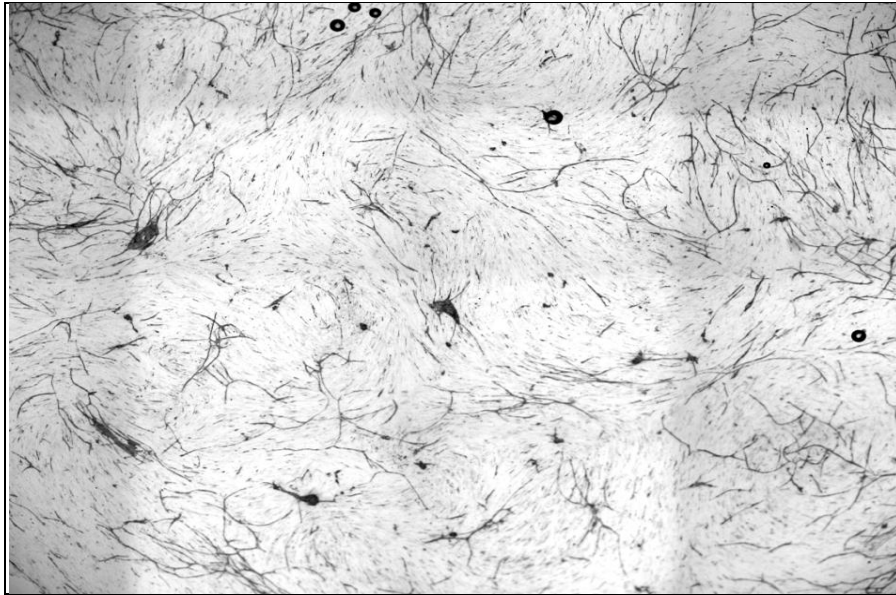


Abbildung 23: Übersichtsaufnahme eines Tube Assay-Ansatzes nach PECAM-1-Färbung. Die Aufnahme zeigt die Entwicklung von tubulären Strukturen aus HDMEC, die für 7 Tage in Ko-Kultur mit dermalen Fibroblasten in einem Angiogenese-induzierenden Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Ausgebildete Tubes erscheinen hier als schwarze Linien nach Anfärbung von PECAM-1, Vergrößerung 40x.

Im Tube Assay wurden die Auswirkung von fraktionierter Strahlung (2x2Gy) und die Fähigkeit der HDMEC feine Kapillarnetze auszubilden, untersucht. Anhand der Anzahl, Länge und Größe der gebildeten tubulären Komplexe, sowie der Anzahl der Gefäßkreuzungspunkte und der insgesamt von den Tubes eingenommenen Fläche und das Verhältnis zur Gesamtfläche des Wells, wurden bestrahlte mit unbestrahlten Wells verglichen und daraus ein Bestrahlungs-Effekt abgeleitet.

Durch Bestrahlung wurde die Anzahl der tubulären Komplexe signifikant reduziert ($p=0,0079$). Dies entspricht einer Abnahme um 61% verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 24).

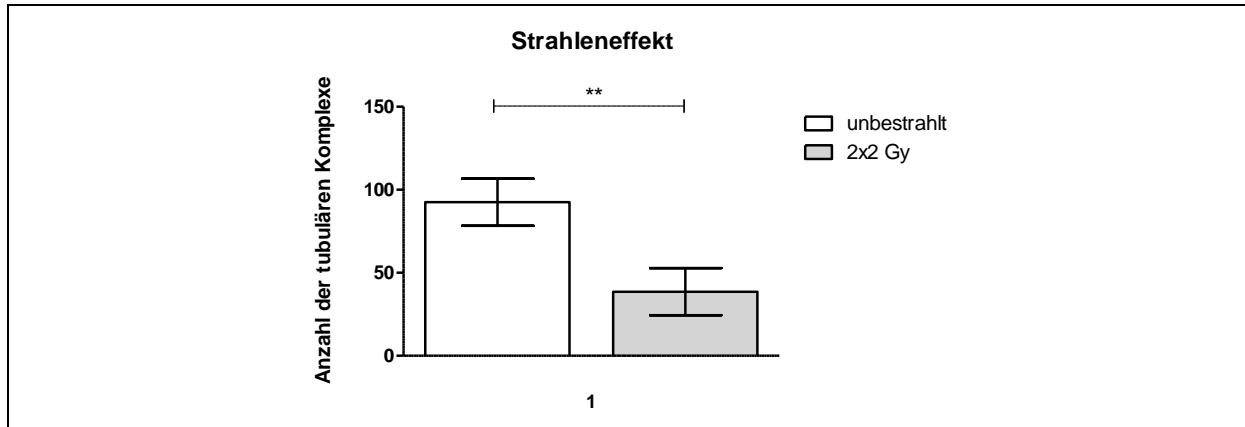


Abbildung 24: Ausbildung tubulärer Komplexe im Angiogenese-Assay. nach externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf die Anzahl der neu gebildeten tubulären Komplexe. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen (N=2) mit je 5 Bildausschnitten. Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

Länge (Abb. 25A) und Größe (Abb. 25B) der tubulären Komplexe sind in Pixel dargestellt. Diese wurden ebenfalls durch Bestrahlung mit 2x2 Gy signifikant reduziert.

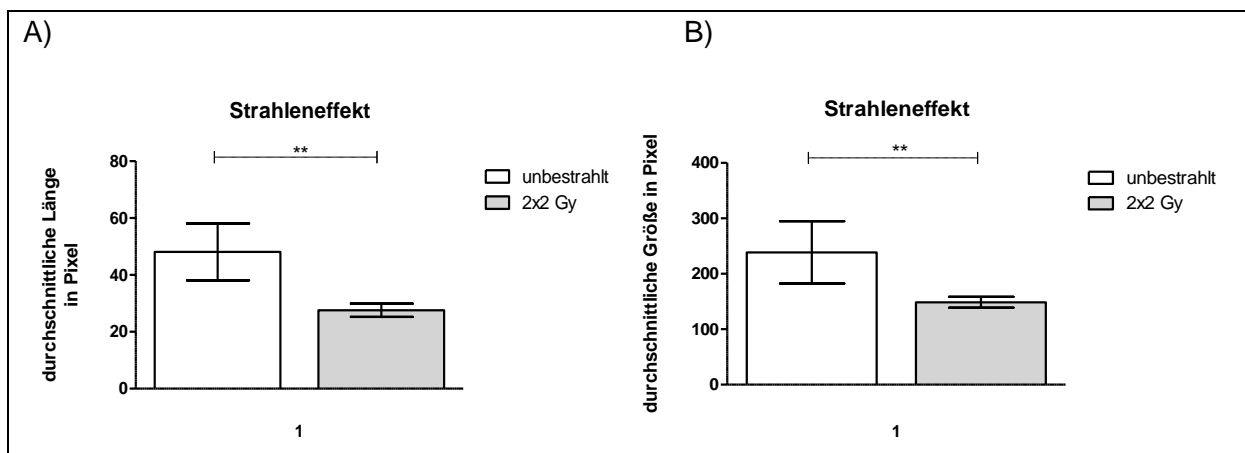


Abbildung 25: Ausbildung tubulärer Komplexe im Angiogenese-Assay. A) zeigt den Einfluss externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf die Länge der neu gebildeten tubulären Komplexe und B zeigt den Einfluss externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf die Größe der neu gebildeten tubulären Komplexe. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen (N=2) mit je 5 Bildausschnitten. Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

Die Anzahl der Gefäßkreuzungspunkte gilt als weiteres Charakteristikum für ein intaktes Gefäßnetz. Im Tube Assay bewirkte die zweifache Bestrahlung mit 2 Gy eine signifikante Reduktion der Gefäßkreuzungspunkte um ca. 82% ($p=0,0079$) (Abb. 26).

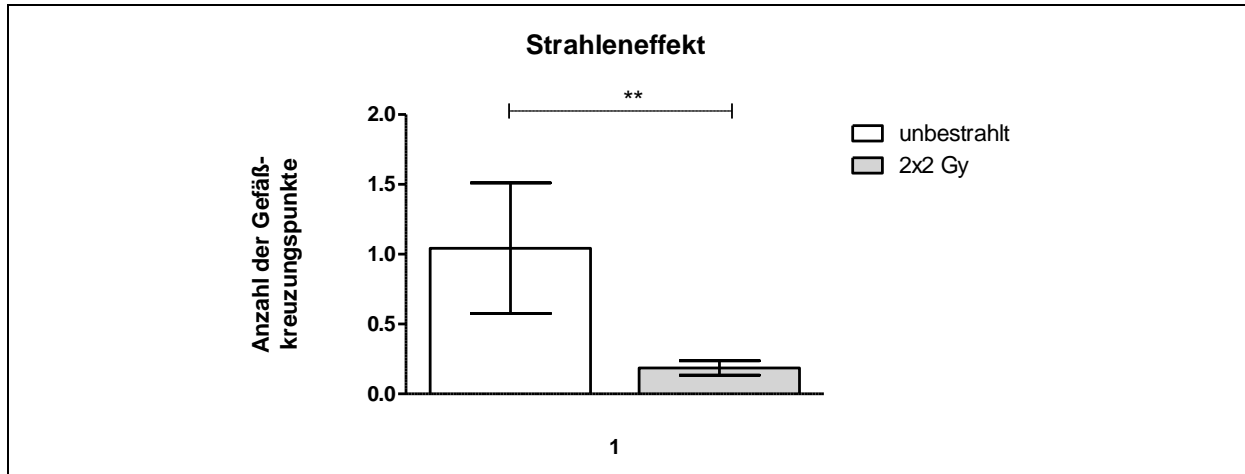


Abbildung 26: Ausbildung tubulärer Komplexe im Angiogenese-Assay. Einfluss externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf die Anzahl der Gefäßkreuzungspunkte der neu gebildeten tubulären Komplexe. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen (N=2) mit je 5 Bildausschnitten. Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

Weiterhin wurde die gesamte mit Tubes bedeckte Fläche in Pixel bestimmt, sowie das Verhältnis der bedeckten Fläche zur Fläche ohne tubuläre Strukturen (Ratio). Durch zweimalige Bestrahlung mit 2 Gy wurde die mit Tubes bedeckte Fläche (Abb. 27A und 27B) signifikant verringert.

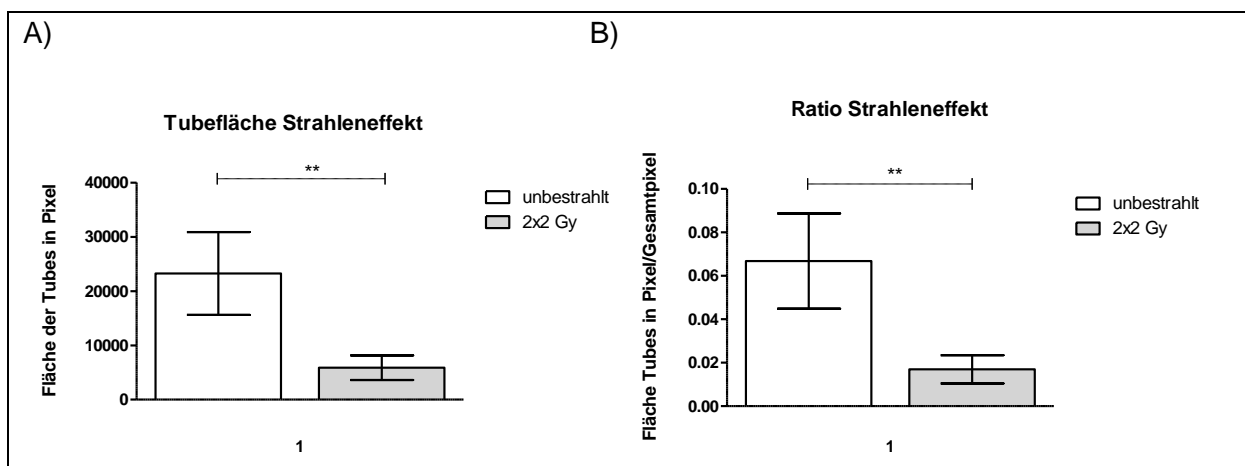


Abbildung 27: Ausbildung tubulärer Komplexe im Angiogenese-Assay. A) zeigt den Einfluss externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf die Tube-Fläche der neu gebildeten tubulären Komplexe und B) zeigt den Einfluss externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf das Verhältnis von der mit Tubes bedeckten Fläche zur Gesamtfläche. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen (N=2) mit je 5 Bildausschnitten. Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.

Die Auswirkung der Bestrahlung auf die Zellkultur im *Tube Assay* liess sich auch lichtmikroskopisch darstellen (Abb. 28). Auffallend ist insbesondere die Reduktion des Zellrasens nach wiederholter Bestrahlung (Abb. 28C im Vergleich zu Abb.28D).

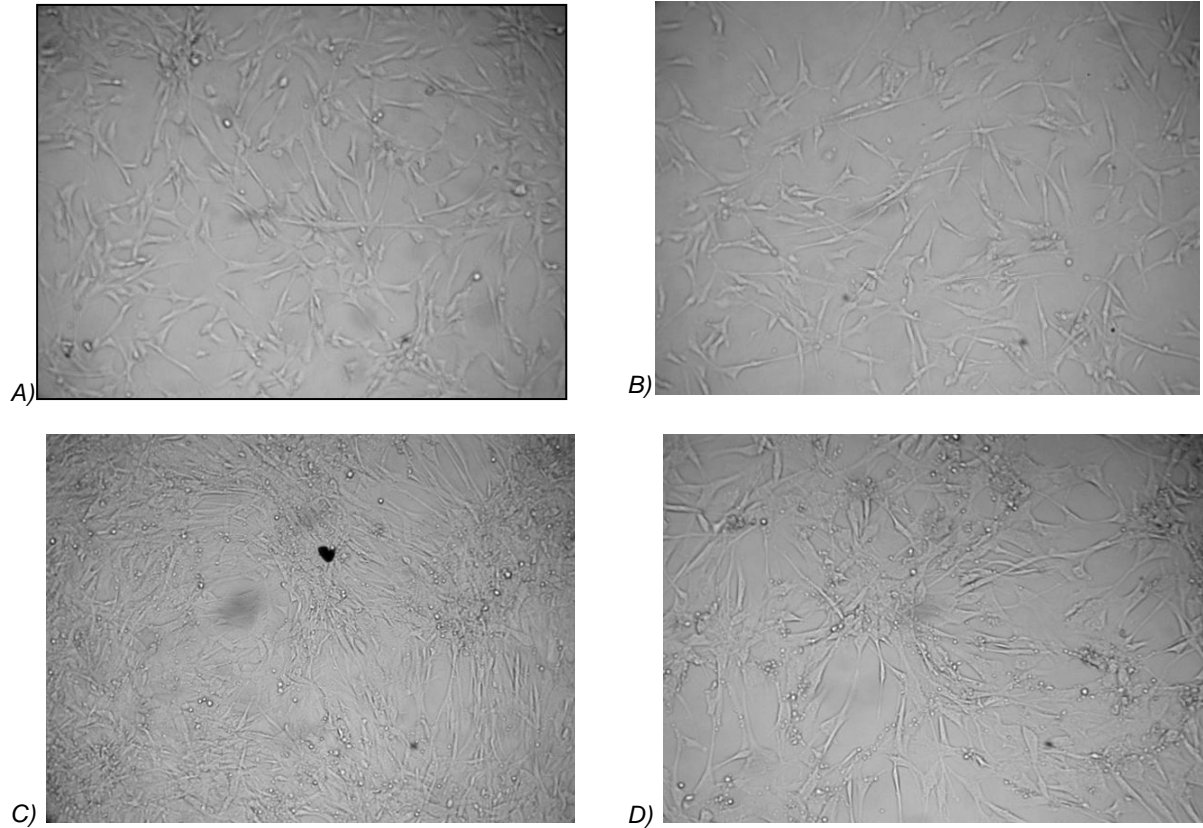


Abbildung 28: Lichtmikroskopische Darstellung der Ko-Kultur aus HDMEC und pulmonalen Fibroblasten. A und B) Tag 2 nach Versuchsbeginn; C und D) Tag 7 nach Versuchsbeginn; A und C) unbestrahlte Kultur; B und D) bestrahlte Kultur;

5. Diskussion

Die Wundheilung umfasst eine Vielzahl an ineinandergreifenden Prozessen, an der eine Reihe unterschiedlicher Zellen beteiligt sind. Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen gehören, neben Fibroblasten und Keratinozyten, zu den Schlüsselzellen der kutanen Wundheilung¹⁵³. Das Zusammenspiel der jeweiligen Zellen und die Zusammensetzung der lokal von diesen Zellen sezernierten Wachstums- und Entzündungsmediatoren spielt eine wichtige Rolle bei der Erforschung strahleninduzierter Wundheilungsstörungen. In vorangegangenen Studien wurde außerdem das angiogene, antifibrotische und anti-inflammatorische Potential adipogener Stammzellen gezeigt^{85,86}.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zellzahl von HDMEC und hASC in Mono- und Ko-Kultur und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren nach Bestrahlung untersucht. Weiterhin wurde der regenerative Effekt von plättchenreichem Plasma auf das Zellüberleben und die Proteinexpression der Zellen untersucht. Außerdem wurden die Auswirkungen wiederholter Bestrahlung auf das Angiogenese-Verhalten von HDMEC mittels Tube Assay untersucht.

5.1 Zellzahlen im Bestrahlungsversuch

5.1.1 Auswirkungen zunehmender ionisierender Strahlung auf die Viabilität

Die Bestimmung der Zellzahlen nach Bestrahlung, ergab deutliche Unterschiede für hASC und HDMEC in Mono- und Ko-Kultur. Bei humanen adipogenen Stammzellen in Monokultur ließ sich, bei zunehmender Strahlenintensität bis 12 Gy, keine signifikante Zu- oder Abnahme der Zellzahl messen. In der Literatur findet man gegensätzliche Aussagen zu diesem Thema. Zum einen existiert hierzu die These der Strahlenresistenz von Fettstammzellen gegenüber Bestrahlung, die auf überlegenen DNS-Reparaturmechanismen beruht und dadurch die Fähigkeit der Zelle zur Proliferation erhält^{154,155}. Andere Studien hingegen, wie beispielsweise die von Poglio et al., stellten nach einer Ganzkörperbestrahlung von Mäusen mit 7 Gy oder 10 Gy eine deutliche Abnahme proliferierender Fettzellen fest, weshalb sie eine

Sensibilität des Fettgewebes gegenüber Strahlung vermuteten ¹⁵⁶. Der stärkste Effekt ionisierender Strahlung ist die Schädigung der DNS, weshalb hauptsächlich stark proliferierende Gewebe von akuten Strahlenschäden betroffen sind ¹⁵⁷. Fettgewebe wird nicht zu den stark proliferativen Geweben gezählt. Die Anwendung von Strahlentherapie verursacht jedoch eine Obliteration der Gefäße ¹⁵⁸, wodurch eine Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff entsteht. Eto et al. zeigten in ihrer Studie mit Fetttransplantaten, dass Adipozyten unter hypoxischen Bedingungen schon nach 24 h untergehen, während adipogene Stammzellen deutlich länger vital blieben und für Regeneration im Transplantat sorgten ¹⁵⁹. Bei den im Rahmen unseres Versuches verwendeten Zellen handelte es sich um humane adipogene Stammzellen, die nutritiv unter optimalen Bedingungen kultiviert wurden. Eine Sensibilität der Fettstammzellen gegenüber Strahlung konnte, bezüglich ihrer Viabilität, in unseren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden, was durch Beobachtungen der oben erwähnten Studien gestützt wird. Im Unterschied dazu zeigte sich bei humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen in Monokultur eine signifikante Verringerung der Zellzahl mit zunehmender Bestrahlungsdosis. Dieses Ergebnis wird durch zahlreiche Studien unterstützt. Unsere Arbeitsgruppe beobachtete wiederholt eine hochsignifikante Abnahme der Zellzahlen von HDMEC in Monokultur nach Bestrahlung mit 2-12 Gy ^{153,160}. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch die Studie von Henning et al., in der u.a. Endothelzellen mit der Strahlendosis von 4 Gy bis 16 Gy bestrahlt wurden ¹⁵⁸. Die Apoptose der Endothelzellen wird den Ergebnissen von Kumar et al. zufolge, u.a. über die Aktivierung der p38 MAP-Kinase initiiert ¹⁶¹. Park et al. konnten dagegen die Involvierung von Angiostatin über einen extrazellulären Signalweg, als Verursacher der reduzierten HDMEC-Anzahl identifizierten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Radiosensitivität von Endothelzellen stark vom Gewebe abhängt, aus dem sie isoliert wurden ¹⁶². Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine signifikante Reduktion der Zellzahl ab einer Strahlendosis von 6 Gy in der Ko-Kultur aus HDMEC und hASC gemessen. Die Reduktion war weniger ausgeprägt, als bei HDMEC in Monokultur. Adipogene Stammzellen besitzen, wie eingangs erwähnt, die Fähigkeit in verschiedene Zellreihen zu differenzieren. So konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von hASC im Endothelzellmedium die Differenzierung in Endothelzellen induzierte ⁷⁸. Aufgrund dieses pluripotenten Differenzierungspotentials finden adipogene Stammzellen nicht nur als reines Fetttransplantat zahlreiche Anwendung

in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie. In dem hier verwendeten Versuchsaufbau wurde für die Zellkultur aus HDMEC und hASC ein spezielles Endothelzellmedium verwendet, wodurch eine Differenzierung der hASC in HDMEC stattgefunden haben kann. Berücksichtigt man die Radiosensitivität von HDMEC, kann dies eine Erklärung für die signifikante Abnahme der Zellzahl in der Ko-Kultur darstellen. Gleichzeitig sezernieren hASC Wachstumsfaktoren wie VEGF¹⁶³, die die Proliferation der überlebenden Endothelzellen nach Bestrahlung unterstützen können und so einer Reduktion der absoluten Zellzahl entgegen wirken können.

5.1.2 Auswirkungen von 5% bzw. 10% PRP auf die Zellzahl von hASC und HDMEC in Mono- und Ko-Kultur

Analog zur Frage, wie sich ionisierende Strahlung auf die reinen Zellzahlen auswirkt, wurde auch der Effekt von 5% und 10% plättchenreichem Plasma als Mediumzusatz auf die Zellzahl untersucht.

Zu den Faktoren, die die Neovaskularisierung und damit die Wundheilung beeinträchtigen, zählt ionisierende Strahlung. Eine Studie an Ratten zeigte, dass ab einer Strahlendosis von 9 Gy die Bildung neuer Gefäße massiv inhibiert war¹⁶⁴. Anders als die Haut von Nagetieren reagiert die Haut von Schweinen in vergleichbarer Art und Weise auf ionisierende Strahlung, wie menschliche Haut. Ein Experiment von Hadad und Kollegen an Yorkshire Schweinen zeigte eine verringerte Gefäßdichte der Mikrogefäße mit zunehmender Bestrahlungsintensität, was später zu chronischen Strahlenschäden führen kann. Die kombinierte Therapie aus PRP und ASC zeigte im Rahmen dieser Studie große Erfolge in der Wundheilung strahleninduzierter Schäden¹⁶⁵.

Plättchenreiches Plasma hat ebenso wie adipogene Stammzellen den Vorteil, dass es ein autologes Produkt ist, das relativ einfach isoliert werden kann, ohne dass die Methoden der Isolation zu stark invasiv für den Spender wären¹⁶⁶. Der positive Einfluss auf die Wundheilung bei Wundheilungsstörungen wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen^{16,138}. Laut Liu et al. beeinflusst PRP durch sezernierte Wachstumsfaktoren die Proliferation von adipogenen Stammzellen¹⁶⁷. So ergaben *in vitro* Versuche, bei denen unterschiedliche Konzentrationen von PRP

zu *human adipose-derived stroma cells* (hADSC) hinzugegeben wurden, eine signifikante Proliferationssteigerung nach Zugabe von 2,5% bis 12,5% PRP ¹⁶⁷. Eine proliferationssteigernde Wirkung von PRP wurden auch von weiteren Autoren publiziert ^{168,169}, wobei die effektive Konzentration des zugegebenen PRP nicht einheitlich war. So beobachteten Kakudo et al. eine Steigerung der Proliferation von hADSC nach Hinzufügen von 1-5% PRP, während es ab einer Konzentration von 10% PRP zu einer Proliferationsabnahme kam ¹⁷⁰. D'Eposito et al. beobachteten dagegen, nach Applikation von 5% und 20% PRP eine Erhöhung der Zellzahl von *adipose-derived mesenchymal stem cells* (Ad-MS) durch Steigerung des Anteils an Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Die Ergebnisse unserer Versuche stehen mit der derzeitigen Literatur in Einklang. Bei unbestrahlten hASC in Monokultur zeigte sich nach Zugabe von 5% und 10% PRP eine dosisabhängige Zunahme der Zellzahl. Wurden die Zellen vorher bestrahlt, blieb lediglich die Tendenz zur höheren Zellzahl nach PRP-Zugabe erhalten.

Im Gegenteil dazu hatte PRP in unserem Versuch keinen Effekt auf die Zellzahl von HDMEC in Monokultur. Auch bei den bestrahlten Endothelzellkulturen konnte kein radioprotektiver Effekt durch PRP beobachtet werden. Andere Forschungsgruppen konnten jedoch einen proliferativen Effekt von PRP auf Endothelzellen feststellen ^{141,171}. Dies kann möglicherweise an der verwendeten Endothelzellart liegen, da Martineau et al. und Fréchette et al. jeweils humane Endothelzellen aus der Nabelschnur untersuchten (HUVEC), während wir humane dermale Endothelzellen benutzt haben. Dabei konnte an HUVEC in früheren Studien nicht nur eine höhere Strahlentoleranz ¹⁶², sondern auch ein vermehrtes Proliferationspotential im Vergleich zu HDMEC gezeigt werden.

Bislang gibt es jedoch wenige Therapieansätze für die Behandlung akuter oder chronischer Strahlenschäden im Menschen. Plättchenreiches Plasma rückt daher, unter anderem wegen seines proliferationssteigernden Effekts, in den Mittelpunkt des Interesses. Dieses pro-proliferative Potential von PRP konnte auch im Rahmen unserer Versuche in der Ko-Kultur nachgewiesen werden. Die Zugabe von 10% PRP zeigte nach Bestrahlung mit 6 Gy und 12 Gy sogar eine Steigerung der Zellzahl zurück auf das Ausgangsniveau unbestrahlter Zellen ¹⁷². Auch bei der Behandlung chronischer Hautulzera wird PRP erfolgreich eingesetzt ¹⁷³. Der Versuch PRP in Gelform auf strahleninduzierte chronische Wunden dritten und vierten Grades

anzuwenden, die eine Resistenz gegenüber konventionellen Therapien zeigten, führte zu einer kompletten Re-Epithelialisierung der Ulzerationen nach durchschnittlich fünf Anwendungen bei sieben von zehn Patienten ¹⁷⁴.

5.2 Proteinexpression im Bestrahlungsversuch nach Bestrahlung und PRP-Behandlung

An Prozessen der Wundheilung ist eine Vielzahl von löslichen Mediatoren beteiligt. IL-6, welches zu den klassischen pro-inflammatorischen Proteinen zählt, besitzt eine Kontrollfunktion bei der Initiierung und Beendigung von Entzündungsreaktionen. Die Hochregulation von IL-6 wird neben LPS, TNF oder IL-1 ¹⁷⁵, auch über Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF induziert ¹⁰⁶. Unsere Analysen ergaben sowohl bei unbestrahlten als auch bei bestrahlten hASC in Monokultur, insgesamt hohe Konzentrationen von IL-6. Diese hohe IL-6 Expression in hASC wurde auch schon in vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe beobachtet ¹⁶⁰. Anders als bei Haubner et al. sank jedoch die IL-6-Konzentration mit zunehmender Bestrahlungsdosis. Vergleichbare Studien sind bislang in der Literatur nicht zu finden. Allerdings zeigten Jyun-Yi et al. in einer Studie, bei der adipogene Stammzellen mittels Low-Power Laser bestrahlt wurden, dass mit zunehmender Energie die Freisetzung von IL-6 durch Fettstammzellen abnimmt ¹⁷⁶. Als Ursache wurde in dieser Studie eine verminderte Expression der IL-6 kodierenden mRNA nach Anwendung des Low-Power Lasers identifiziert. Die von uns beobachtete strahleninduzierte Reduktion der IL-6-Expression könnte eine Rolle bei der Erklärung von Wundheilungsstörungen nach Strahlentherapie spielen, da somit ein wichtiger pro-inflammatorischer Stimulus in der Initialphase der Wundheilung fehlt. In den Studien von Galluci et al. und Lin et al. wurde in IL-6 Knockout Mäusen eine gestörte Wundheilung demonstriert ^{108,113}. Die Zugabe von PRP bewirkte in unserer Studie eine Rekonstitution der IL-6 Proteinlevel etwa auf das Niveau unbestrahlter hASC. Dies kann entweder auf eine bisher unbekannte pro-inflammatorische Komponente in unserem PRP zurückgeführt werden, die als proliferativer Stimulus wirkt oder wird durch die im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren hervorgerufen. Andere Ergebnisse lieferte auch die Analyse der HDMEC in Monokultur, bei denen mit zunehmender Strahlenintensität dosisabhängig steigende Konzentrationen von IL-6

gemessen wurden. Dieser Effekt wird auch in den Ergebnissen der Studie von Van der Meeren et al. und früheren Studien unserer Arbeitsgruppe beschrieben^{160,177}. Es gilt als wichtiger Bestandteil der Wundheilung, dass Endothelzellen sensibel auf entzündliche Reize wie ionisierende Strahlung reagieren und es über die anschließende Hochregulation von pro-inflammatorischen Proteinen zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen kommt. Diese wiederum ermöglichen die Extravasation von Leukozyten und somit den Übergang in die nächste Phase der Wundheilung. Auch die Ko-Kultur von hASC und HDMEC zeigte eine leichte dosisabhängige Steigerung der IL-6-Konzentration. Das Hinzufügen von PRP verstärkte diesen Effekt ausschließlich in bestrahlten Zellen. Dies unterstützt die These, dass neben Wachstumsfaktoren vermutlich noch ein weiterer proinflammatorischer Stimulus notwendig ist, um die Produktion von IL-6 zu induzieren¹⁷².

BFGF ist ein potenter pro-angiogener und mitogener Wachstumsfaktor. Analog zu früheren Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten ELISA-Proteinanalysen von hASC in spezifischem hASC-Medium als Monokultur auch in der vorliegenden Studie keine wesentlichen Veränderungen der bFGF-Expression nach Bestrahlung¹⁶⁰. Bei bFGF handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, der bereits bei der Wundsetzung durch Zerstörung der Zellmembran von z.B. Endothelzellen und Fibroblasten freigesetzt wird⁸⁹. Bei überwiegend vitalen hASC in unserer Kultur auch nach Bestrahlung, zeigte die Konzentration von bFGF im Zellüberstand daher keine signifikante Veränderung. Die Zugabe von 5% bzw. 10% PRP zum Kulturmedium verursachte hingegen sowohl bei unbestrahlten hASC-Kulturen, als auch nach Bestrahlung mit 2-12 Gy, eine konzentrationsabhängige Reduktion der bFGF-Konzentration. Auch in der HDMEC-Monokultur, in der die bFGF-Konzentration im Vergleich zur hASC-Monokultur grundsätzlich höher war, wurde bestrahlungsunabhängig nach Addition von PRP tendenziell ein Abfall der bFGF-Konzentration gemessen. Im Gegenteil hierzu stieg jedoch die bFGF Proteinexpression in der Ko-Kultur aus hASC und HDMEC mit zunehmender PRP-Konzentration und Bestrahlungsdosis an. Niedrige Konzentrationen von bFGF werden auch bei strahleninduzierten chronischen Wundheilungsstörungen detektiert. In der Studie von Hom et al. wurden Schweine lokal einer Strahlung von 1,300 cGy ausgesetzt und die bestrahlten Hautareale mittels RT-PCR Analyse mit unbestrahltem Gewebe verglichen. Dabei wurde eine

signifikante Reduktion des bFGF mRNA-Expressionslevels um 75% in exponiertem Gewebe gemessen. Eine präoperative bFGF-Supplementierung bei nachfolgender Hautlappenplastik, bewirkte einen deutlichen Vorteil für das Überleben der Plastik und eine Reduktion strahlenbedingter gastrointestinaler Nebenwirkungen, sodass in der Studie eine verbesserte postoperative Wundheilung an strahlengeschädigtem Gewebe durch bFGF postuliert wurde ¹⁷⁸. Andererseits steht die Überexpression von Wachstumsfaktoren im Verdacht der Tumorinduktion ^{13,103} oder der unkontrollierten Anhäufung von Granulations- und Narbengewebe. Geht man von den positiven Effekten der im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren aus, könnte die Inhibierung von Wachstumsfaktoren wie bFGF durch PRP in den Monokulturen *in vitro* die Zellen vor zu starker Proliferation und daher auftretenden DNS-Schäden oder Tumorinduktion bewahren und in Bezug auf die hASC deren Pluripotenz erhalten ¹⁷². Bei Ko-Kulturen mit HDMEC hingegen, die der Situation *in vivo* deutlich ähnlicher sind, steht womöglich die notwendige proliferative Kapazität des PRP und der Wachstumsfaktoren im Vordergrund ¹⁷². Darauf weist auch die stark erhöhte Zellzahl der Ko-Kultur nach PRP-Gabe hin. Aufgrund ihrer Pluripotenz werden adipogene Stammzellen zunehmend auch in Verbindung mit PRP auf ihre Fähigkeit hin getestet, strahleninduzierte Gewebeschäden zu regenerieren ¹⁶⁶. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse von Studien zur exogenen Fettstammzelltherapie, ist deren Anwendung am Patienten noch mit Vorsicht zu betrachten. Es sind noch weitere experimentelle und klinische Studien notwendig, um die Sicherheit der Therapie in Bezug auf Tumorinduktion oder andere Gefahren hin zu überprüfen.

Die Expression von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF spielt eine herausragende Rolle in der Wundheilung. Nach Bestrahlung der hASC-Monokultur mit 2-12 Gy zeigte sich eine Zunahme der VEGF-Konzentration im Zellüberstand, die mit steigender Strahlendosis weiter anstieg. Dies scheint im Einklang mit der derzeitigen Literatur. Wurden adipogene Stammzellen in vorangegangenen Studien beispielsweise unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, ließ sich anschließend ebenfalls ein Anstieg der VEGF Expression messen. Dies dient dem Schutz und verbessertem Wachstum von Endothelzellen, und damit vor allem der Gefäßneubildung ¹⁶³. Insbesondere in Verbindung mit dem pro-angiogenen Wachstumsfaktor bFGF, konnte in einer Studie von Pepper et al. vermehrt die Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen *in vitro* beobachtet werden ⁸⁹. Die

Gefäßdichte ist u.a. entscheidend für die Wundheilung von bestrahltem Gewebe, welches geprägt ist durch Mikrozirkulationsstörungen und assoziierten Wundheilungsstörungen. In einer Studie von Hadad et al. wurden adipogene Stammzellen bereits erfolgreich zur Verbesserung der Durchblutungssituation bei kutanen Wundheilungsstörungen nach Strahlenanwendung eingesetzt ¹⁶⁵. Auch in einer Studie von Rigotti et al. bewirkte der Einsatz von autologem Lipoaspirat und den darin enthaltenen Fettstammzellen eine massive Reduktion der Beschwerden (Fibrose, Hautatrophie, Teleangiektasien), was zum Teil auf die Expression von VEGF durch hASC zurückgeführt wurde ⁸⁵. Die Zugabe von 5% bzw. 10% PRP führte zu einer zusätzlichen Steigerung der VEGF-Freisetzung durch hASC in Monokultur. Diese war tendenziell konzentrations- und strahlendosisabhängig. D'Eposito et al. erhielten durch eine Zellkulturstudie an Ad-MSc ähnliche Ergebnisse. Dabei führte die Zugabe von PRP, neben der gesteigerten Freisetzung anderer Wachstumsfaktoren, auch zu einer vermehrten VEGF Expression, was teilweise über das proliferative Potential von PRP erklärt wurde. Andererseits vermuten sie jedoch auch, dass Ad-MSc die im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF aufnehmen um im Gegenzug mehr pro-angiogene Faktoren wie VEGF zu exprimieren ¹⁶⁶. Zusammengenommen fördern diese Mechanismen die Gefäßneubildung und damit zu einer verbesserten Wundheilung. Auch Studien anderer Autoren zeigten, dass PRP positive Effekte auf adipogene Stammzellen hat ^{168,169}. Im Gegenteil dazu zeigten die HDMEC in Mono- und Ko-Kultur mit hASC ein Absinken der VEGF-Konzentration im Zellüberstand. Diese Beobachtung war bei unbestrahlten Kulturen nach Zugabe von 10% PRP jeweils signifikant. Es scheint, dass zwar die Proliferation der HDMEC in Mono- und Ko-Kultur durch PRP positiv beeinflusst wird, nicht jedoch die Freisetzung pro-angiogener Faktoren wie VEGF oder bFGF, was an der bereits im PRP enthaltenen, hohen Konzentration von Wachstumsfaktoren oder der zusätzlichen Freisetzung anti-angiogener Faktoren aus PRP liegen kann.

Die Expression von PDGF konnte ausschließlich in HDMEC-Monokulturen nachgewiesen werden, wo mit zunehmender Strahlendosis auch eine Zunahme der PDGF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand gemessen werden konnte. Wurde der Zellkultur PRP zugesetzt, nahm dagegen die Expression von PDGF sowohl bei unbestrahlten, als auch bei bestrahlten HDMEC-Kulturen konzentrationsabhängig

signifikant ab. Die Bestrahlung allein scheint als Entzündungsreiz eine Steigerung der PDGF-Expression von HDMEC hervorzurufen. Als starkes Mitogen wird es *in vivo* schon in der Initialphase der Wundheilung zur Proliferation und chemotaktischen Attraktion, insbesondere von Fibroblasten, benötigt⁹⁶. Auch bei der Neovaskularisierung spielt PDGF u.a. durch Stimulation pro-angiogener Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Chronische, nicht heilende Wunden, wie beispielsweise Hautulzera, weisen hingegen einen Mangel an PDGF auf¹⁷⁹. Es wurde daher in verschiedenen Studien geprüft, ob die topische Anwendung von PDGF einen Nutzen auf die Wundheilung hat. So wurde beispielsweise in einem Wundheilungsmodell an Kaninchenohren schon bei der Wundsetzung PDGF in die Wunde appliziert, was zu einer gesteigerten Bildung von Granulationsgewebe und extrazellulärer Matrix, wie auch dem vermehrten Nachweis von Fibroblasten im Gewebe führte¹⁸⁰. In einer klinischen Studie führte die Anwendung von PDGF an nicht heilenden chronischen Druckulzera zu einer Verbesserung der Wundheilung¹⁸¹. Aufgrund dieser scheinbar positiven Effekte der topischen Anwendung von PDGF bei der Wundheilung wird es klinisch auch bei strahleninduzierten chronischen Wundheilungsstörungen eingesetzt³¹. Auf der anderen Seite kann bei Überexpression von PDGF ein Zusammenhang mit Tumorinduktion und der Entwicklung fibrotischer Erkrankungen der Lunge, Leber oder Niere nicht ausgeschlossen werden⁹³. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PRP-Applikation konzentrationsabhängig die PDGF-Expression von HDMEC inhibierte. Dies mag, wie bei VEGF, mit einer Inhibition der Überexpression des Wachstumsfaktors und den damit möglicherweise negativen Folgen verbunden sein. Der Effekt könnte jedoch auch durch Faktoren im PRP verursacht werden, die inhibitorisch auf Endothelzellen wirken und zu einer Reduktion der Freisetzung bestimmter pro-angiogener Wachstumsfaktoren, wie bFGF, VEGF und PDGF führen. Hsu et al. stellten in ihren Versuchen inhibitorische Effekte von PRP in höheren Konzentrationen (15-30%) fest. Sie postulierten, dass ein Grund hierfür die Freisetzung von Thrombospondin-1 (TSP-1) aus den α -Granula der aktivierten Thrombozyten ist, welches inhibitorisch auf die Adhäsion, Migration, Proliferation und Ausbildung kapillärer Strukturen durch Endothelzellen *in vitro* wirkt. Außerdem beobachteten sie, dass der proliferative Effekt auf humane Zellen durch PRP nicht linear ansteigt, sondern ein Maximum erreicht¹⁸². Es ist daher bisher nicht geklärt, ob spezifische, aus PRP freigesetzte Faktoren wie z.B. TSP-1 und damit auch das

angewendete PRP die Wundheilung auch negativ beeinflussen können. Die Möglichkeit ist zu bedenken, da insbesondere das anti-angiogene TSP-1 in deutlich höheren Konzentrationen durch aktivierte Thrombozyten sezerniert wird, als die pro-angiogenen Wachstumsfaktoren¹⁸². Zu berücksichtigen ist zusätzlich, dass sich die Herstellungsverfahren von PRP in der Konzentration der erhaltenen Wachstumsfaktoren deutlich unterscheiden, wodurch auch die Stärke des pro-angiogenen Stimulus beeinflusst wird¹⁸³.

Die vermehrte Expression von löslichen Adhäsionsmolekülen, wie sICAM und sVCAM wird mit Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, deren Ursprung in der Dysfunktion des Endothels liegen. Chen et al. wiesen zum Beispiel eine gesteigerte ICAM-Expression in heranwachsenden Jugendlichen nach, die ein hohes Risiko hatten, Artherosklerose zu entwickeln¹²³. Auch in der Studie von Liyama et al. ging der Nachweis von atherosklerotischen Gefäßläsionen bei Kaninchen und Mäusen mit erhöhten Konzentrationen von ICAM und VCAM einher¹⁸⁴. In der Wundheilung haben die Adhäsionsmoleküle die Aufgabe die Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel zu regulieren und so die Extravasation der Leukozyten in der Entzündungsphase zu ermöglichen. In unseren Versuchen führte eine zunehmende Bestrahlungsdosis bis 6 Gy zu einer dosisabhängigen Zunahme der Konzentration von sICAM und sVCAM im Überstand von HDMEC in Monokultur. Dieses Resultat lieferte auch eine frühere Studie unserer Arbeitsgruppe¹⁶⁰. Die externe Radiatio führt auf Zellebene zu einer Überexpression von Entzündungsmediatoren⁵⁸, die wiederum eine gesteigerte Sekretion von ICAM und VCAM induzieren¹⁰. Auch Müller et al. kamen zu dem Ergebnis, dass ICAM ein Parameter für die Entzündungsreaktion nach kutaner Bestrahlung ist¹⁸⁵. Durch diese vermehrte Expression kann es zu Zeichen der akuten Strahlenschädigung in Form von Obliteration der Mikrogefäße und einer Dysfunktion des Endothels kommen⁵⁹. In Ko-Kultur mit hASC hingegen wurden insgesamt deutlich niedrigere Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle beobachtet, die auch bei zunehmender Bestrahlungsdosis nur wenig undulierten. Die adipogenen Stammzellen inhibierten im Versuch die strahleninduzierte Überexpression der Adhäsionsmoleküle, was demonstriert, dass hASC einen positiven Effekt auf die Wundheilung bestrahlter Wunden haben können¹⁵³. Die Zugabe von PRP hingegen induzierte tendenziell die Freisetzung von sICAM in allen Zellkulturen. In einer Studie von Herrera et al. führte die Stimulation von

Sarkomazellen aus Osteoblasten mit 20% PRP über 24 Stunden ebenfalls zu einer vermehrten Konzentration von sICAM. Im Metabolismus von Knochen zählt sICAM zu einem der Zytokine, die die Differenzierung von Vorläuferzellen in Osteoklasten vermitteln und damit zum Knochenabbau beitragen. Bei Patienten, die an Osteoporose erkrankt sind, werden beispielsweise erhöhte Konzentrationen von sICAM beschrieben ¹⁸⁶. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Marx et al., die dem PRP osteoplastische Effekte zuschrieben ¹⁶. Eine Überexpression von sICAM scheint jedoch nicht nur zu ischämischen Erkrankungen des Gefäßsystems und Knochenabbau zu führen, sondern kann durch die pro-angiogene Potenz auch bei der Induktion von Neoplasien eine Rolle spielen ¹⁸⁷. Bezogen auf die Wundheilung chronischer und strahleninduzierter Wunden, vermittelt die Mehrheit der bisherigen Studien jedoch den Eindruck, dass sich PRP positiv bei topischer Anwendung auswirkt ^{138,165,173,174}. Die Zugabe von hASC scheint zu einer weiteren Verbesserung der Wundheilung zu führen ^{166,167,170}, während mögliche negative Effekte, wie die Erhöhung der Konzentration von Adhäsionsmolekülen durch PRP-Zugabe, durch Fettstammzellen gehemmt wird.

5.3 Auswirkungen ionisierender Strahlung auf die Fähigkeit von HDMEC kapillar ähnliche Strukturen zu bilden

Der *Tube Formation Assay* ist seit einer der ersten Studien durch Kubota et al. 1988, in der die Bildung kapillarähnlicher Strukturen durch Endothelzellen auf einer kollagenhaltigen Matrix beobachtet wurde, zu einem der gebräuchlichsten *in vitro* Angiogenese-Modelle geworden ¹⁸⁸. Analog zur pränatalen Vaskulogenese, umfasst der *Tube Formation Assay* viele wichtige Schritte, wie die Zelladhäsion, Zellmigration und das Alignment der Endothelzellen und bietet dadurch die vielfältige Möglichkeit verschiedene Aspekte der Gefäßneubildung zu studieren ¹²⁴. Desweiteren können die Mechanismen der Angiogenese im Prozess der Wundheilung oder des Tumorwachstums sowie pro- und anti-angiogene Faktoren anhand des Modelles identifiziert werden ¹²⁵. Als besonders wichtig hat sich in diesem Zusammenhang die Zusammensetzung der Matrix gezeigt, die als Basalmembran für die Endothelzellen fungiert. *In vivo* besteht diese Basalmembran hauptsächlich aus Laminin-8 und -10, Kollagen Typ IV, MMP und eingelagerten Wachstumsfaktoren ¹²⁴. Berthod et al. beobachteten in ihrer Studie, dass zur Bildung kapillarähnlicher Strukturen durch Endothelzellen *in vitro* die Ablagerung von EZM durch vitale Fibroblasten essentiell ist. Eine ähnlich aufgebaute EZM ohne Fibroblasten führte in der Studie nicht zur Ausbildung von *Tubes* ¹⁸⁹. Die Fibroblasten unterstützen insbesondere durch die Produktion von Kollagen Typ IV und Fibronectin die *Tube*-Bildung ¹²⁸. Die Degradation der Basalmembran hingegen, bei der u.a. Kollagen Typ IV Spaltprodukte entstehen, inhibiert die Angiogenese ¹²⁴. Auch die wiederholte externe Bestrahlung der Ko-Kultur aus HDMEC und pulmonalen Fibroblasten wirkte sich in unseren *Tube Assay* Versuchen anti-angiogen aus. Es wurden insgesamt weniger *Tubes* gebildet. Diese waren kürzer und kleiner, hatten weniger Kreuzungspunkte untereinander und nahmen weniger Fläche im Well als die unbestrahlte Kontrolle ein. Park et al. postulierten eine verstärkte Expression von Angiostatin über die Hochregulation der extrazellulär signalregulierten Kinase (ERK) nachdem HDMEC mit 4 Gy bestrahlt worden waren ¹⁶². Angiostatin ist das Spaltprodukt von Plasminogen und gilt als potenter endogener Inhibitor der Angiogenese ¹⁹⁰, da es die Proliferation und Migration der Endothelzellen blockiert ¹⁹¹. Ohne diese wichtigen Schritte kann es nicht zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen kommen. Das ist interessant, da es zeigt, dass ionisierende Strahlung nicht nur durch Reduktion der

absoluten Zellzahl von HDMEC, sondern auch durch Inhibition ihres angiogenen Potentials, zu Störungen in der Wundheilung führt ¹⁶². Der *Tube formation Assay* stellt die komplizierten *in vivo* Vorgänge jedoch sehr stark vereinfacht dar. Dadurch werden nicht alle bei der Gefäßneubildung beteiligten Faktoren berücksichtigt. Die Ergebnisse können daher nicht direkt auf die Klinik übertragen werden.

6. Zusammenfassung

Die Grundlage der physiologischen Wundheilung bildet ein koordiniertes Ineinandergreifen fein aufeinander abgestimmter Mechanismen, in denen Wachstumsfaktoren eine relevante Rolle spielen. Die Anwendung ionisierender Strahlung, die bei Malignomen im Kopf-Hals-Bereich zum primären und adjuvanten Therapieregime zählt, gehört zu den Faktoren, die dieses sensible Gleichgewicht empfindlich stören. Als Therapiemöglichkeit für strahleninduzierte Wundheilungsstörungen wird u.a. die exogene Stammzelltherapie untersucht. Desweiteren gilt plättchenreiches Plasma als potentes, autologes, pro-proliferatives Blutderivat. Dabei handelt es sich um ein autologes Blutplasma mit der 4-5-fachen Konzentration von Thrombozyten pro μl im Vergleich zu Vollblut. Die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren könnten die lokale Verfügbarkeit von wundheilungsfördernden Mediatoren erhöhen und dadurch radiogenen Wundheilungsstörungen entgegenwirken. Um diese Hypothese auf zellulärer Ebene zu untersuchen, erarbeitete unsere Arbeitsgruppe zwei Modelle. Im ersten Modell wurden humane adipogene Stammzellen (hASC) und humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) in Mono- und Ko-Kultur mit 2 Gray (Gy), 6 Gy oder 12 Gy bestrahlt oder blieben als Positivkontrolle unbestrahlt. Im Vergleich dazu wurde einem Teil der Zellkulturen 5% PRP oder 10% PRP zugesetzt. Gemessen wurden Veränderungen bezüglich der Zellzahlen und der Freisetzung von Wachstumsfaktoren (*basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF)), Zytokinen (Interleukin (IL)-6) und Adhäsionsmolekülen (*soluble Intercellular Adhesion Molecule* (sICAM) -1 und *soluble Vascular Cellular Adhesion Molecule* (sVCAM) -1), durch Applikation ansteigender Strahlendosen oder in Verbindung mit unterschiedlicher Konzentration des PRP. Die Konzentrationen der erwähnten Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren wurde in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. Für das zweite Modell wurden pulmonale Fibroblasten mit HDMEC in einem *Tube Formation Assay* mit und ohne Zugabe von 5% PRP kultiviert und zweimal mit jeweils 2 Gy bestrahlt und nach 7 Tagen der Effekt auf die Gefäßneubildung untersucht.

Als Ergebnis der Exposition mit ionisierender Strahlung, sank im ersten Modell die Zellzahl der HDMEC in Mono- und Ko-Kultur ab einer Strahlendosis von 6 Gy signifikant im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ab. Bei hASC in Monokultur blieb ein Strahleneffekt aus. Die Zugabe von 5% und 10% PRP zu hASC in Monokultur hingegen führte bei unbestrahlten und mit 2 Gy bestrahlten Kulturen zur Zellproliferation. Am deutlichsten konnte der pro-proliferative PRP-Effekt in der Ko-Kultur aus HDMEC und hASC gemessen werden. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Zellzahl in unbestrahlten wie auch allen bestrahlten Ansätzen. In der unbestrahlten Kontrolle verdoppelte sich die Zellzahl der Ko-Kultur nach Zugabe des PRP nahezu, während nach Bestrahlung mit 6 Gy und 12 Gy eine Addition von 10% PRP die Zellzahl zurück bis auf das Ausgangsniveau der unbestrahlten Kontrolle brachte. Bezüglich der Proteinexpression zeigten HDMEC in Monokultur nach Bestrahlung zum Teil eine signifikante strahlendosisabhängige Steigerung der Konzentration von IL-6, PDGF, sICAM-1 und sVCAM-1. Die Zugabe von PRP verstärkte diesen Effekt bei der Expression von IL-6 und sICAM-1, während die Konzentration von PDGF durch Addition von PRP konzentrationsabhängig signifikant abfiel. In der Ko-Kultur konnte nach Bestrahlung eine dosisabhängige Steigerung der Konzentration von bFGF nachgewiesen werden. PRP steigerte diesen Effekt in der Ko-Kultur in bestrahlten Kulturen weiter, wohingegen es bei hASC und HDMEC in Monokultur die Freisetzung von bFGF inhibierte. Die Monokultur von hASC reagierte auf ionisierende Strahlung mit einer Reduktion von IL-6 sowie mit einer tendenziellen Steigerung der VEGF-Konzentration. PRP verstärkte die Proteinfreisetzung von VEGF in der hASC-Monokultur noch. Im zweiten Modell ergab die Auswertung der *Tube Formation Assays* mittels Mikroskop und Angioquant® Software anti-angiogene Effekte durch wiederholte Bestrahlung.

Bislang existieren wenige Therapien für radiogene Wundheilungsstörungen. Die daraus resultierende Morbidität stellt jedoch ein klinisch relevantes Problem dar. Die topische Anwendung von plättchenreichem Plasma greift durch die Erhöhung lokaler Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Zytokine in die Proliferation und Proteinexpression der Schlüsselzellen der Wundheilung sowie in die Ausbildung neuer Gefäße ein. Insbesondere in Verbindung mit einer Ko-Kultur aus adipogenen Stammzellen und HDMEC können pro-proliferative Effekte des PRP nachgewiesen werden, die dem strahleninduzierten Zelluntergang effektiv entgegenwirken. Die

Stimulation der Proteinexpression des Wachstumsfaktors bFGF durch PRP könnte hauptsächlich dazu beitragen. Mögliche negative Effekte des PRP, wie die Erhöhung von Adhäsionsmolekülen, könnten durch die gleichzeitige Präsenz von hASC abgeschwächt werden. Die Anwendung von PRP zusammen mit adipogenen Stammzellen könnte daher ein wirkungsvolles Instrument in der Therapie strahleninduzierter Wundheilungsstörungen darstellen.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Phasen der kutanen Wundheilung im zeitlichen Verlauf adaptiert nach http://www.gandersheimer-modell.de/cms/uploads/pics/Phasen2.gif, 14.09.2016</i>	6
Abbildung 2: <i>Fibrinpfropf mit freigesetzten Mediatoren</i>	8
Abbildung 3: <i>Schema der physiologischen Wundheilung von der Wundsetzung bis zur abgeschlossenen Wundheilung</i>	10
Abbildung 4: <i>lichtmikroskopische Aufnahme der humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) der Passage 4 mit 5-facher Vergrößerung</i>	10
Abbildung 5: <i>lichtmikroskopische Aufnahme von pulmonalen Fibroblasten der Passage 7 mit 10-facher Vergrößerung</i>	10
Abbildung 6: <i>Merkmale der akuten und chronischen Wundheilung</i> ³⁶	12
Abbildung 7: <i>beschriftete 6-Wellplatte vor Versuchsbeginn</i>	43
Abbildung 8: <i>Linearbeschleuniger Primus von Siemens mit zu bestrahlenden 6-Wellplatten auf einer 2 cm dicken Plexiglasscheibe</i>	44
Abbildung 9: <i>Zellzahl von hASC 48h nach Bestrahlung mit 2 Gy, 6 Gy und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle bei einmaligem (weiß) und zweimaligem (blaugrau) Mediumwechsel</i>	53
Abbildung 10: <i>Zellzahl von HDMEC 48h nach Bestrahlung mit 2 Gy, 6 Gy und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle bei einmaligem (weiß) und zweimaligem (blaugrau) Mediumwechsel</i>	54
Abbildung 11: <i>Zellzahl der Ko-Kultur aus hASC und HDMEC 48h nach Bestrahlung mit 2 Gy, 6 Gy und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle bei einmaligem (weiß) und zweimaligem (blaugrau) Mediumwechsel</i>	55
Abbildung 12: <i>Zellzahl der hASC und HDMEC in Einzel- und Ko-Kultur 48h nach Bestrahlung mit 2 Gy, 6 Gy und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)</i> festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.	56
Abbildung 13: <i>Einfluss von 5 und 10% PRP auf die absolute Zellzahl von hASC nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)</i> festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.....	57
Abbildung 14: <i>Einfluss von 5 und 10% PRP auf die absolute Zellzahl von HDMEC nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)</i> festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.....	57

Abbildung 15: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die absolute Zellzahl von hASC und HDMEC in Ko-Kultur nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.....	58
Abbildung 16: Proteinexpression von IL-6, bFGF, VEGF und PDGF in Zellkulturüberständen von Monokulturen und Ko-Kulturen von hASC und HDMEC 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.	60
Abbildung 17: Proteinexpression von sICAM und sVCAM in Zellkulturüberständen von Monokulturen und Ko-Kulturen von hASC und HDMEC 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.....	61
Abbildung 18: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die Proteinexpression von IL-6 in hASC (A), HDMEC (B) und der Ko-Kultur von hASC und HDMEC (C) 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.	62
Abbildung 19: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die Proteinexpression von bFGF in hASC (A), HDMEC (B) und der Ko-Kultur von hASC und HDMEC (C) 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.	63
Abbildung 20: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die Proteinexpression von VEGF in hASC (A), HDMEC (B) und der Ko-Kultur von hASC und HDMEC (C) 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.	64
Abbildung 21: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die Proteinexpression von PDGF in HDMEC 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.	65
Abbildung 22: Einfluss von 5 und 10% PRP auf die Proteinexpression von sICAM-1 (A-C) und sVCAM-1 (D-F) in hASC, HDMEC und Ko-Kultur 48h nach Bestrahlung mit 2, 6 und 12 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fehlerbalken	

repräsentieren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Ansätzen (N=4). Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.....	67
Abbildung 23: Übersichtsaufnahme eines Tube Assay-Ansatzes nach PECAM-1- Färbung. Die Aufnahme zeigt die Entwicklung von tubulären Strukturen aus HDMEC, die für 7 Tage in Ko-Kultur mit dermalen Fibroblasten in einem Angiogenese- induzierenden Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Ausgebildete Tubes erscheinen hier als schwarze Linien nach Anfärbung von PECAM-1, Vergrößerung 40x.	68
Abbildung 24: Ausbildung tubulärer Komplexe im Angiogenese-Assay. nach externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf die Anzahl der neu gebildeten tubulären Komplexe. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen (N=2) mit je 5 Bildausschnitten. Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.....	69
Abbildung 25: Ausbildung tubulärer Komplexe im Angiogenese-Assay. A) zeigt den Einfluss externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf die Länge der neu gebildeten tubulären Komplexe und B zeigt den Einfluss externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf die Größe der neu gebildeten tubulären Komplexe). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen (N=2) mit je 5 Bildausschnitten. Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.	69
Abbildung 26: Ausbildung tubulärer Komplexe im Angiogenese-Assay. Einfluss externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf die Anzahl der Gefäßkreuzungspunkte der neu gebildeten tubulären Komplexe. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen (N=2) mit je 5 Bildausschnitten. Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.	70
Abbildung 27: Ausbildung tubulärer Komplexe im Angiogenese-Assay. A) zeigt den Einfluss externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf die Tube-Fläche der neu gebildeten tubulären Komplexe und B) zeigt den Einfluss externer Bestrahlung mit 2x2 Gy auf das Verhältnis von der mit Tubes bedeckten Fläche zur Gesamtfläche. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen (N=2) mit je 5 Bildausschnitten. Statistische Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) festgelegt und dementsprechend gekennzeichnet.	70
Abbildung 28: Lichtmikroskopische Darstellung der Ko-Kultur aus HDMEC und pulmonalen Fibroblasten. A und B) Tag 2 nach Versuchsbeginn; C und D) Tag 7 nach Versuchsbeginn; A und C) unbestrahlte Kultur; B und D) bestrahlte Kultur;	71

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelltypen und Herkunft der verwendeten Zellen	30
Tabelle 2: verwendete Nähr- und Einfriermedien und ihre Zusammensetzung	31
Tabelle 3: verwendete Chemikalien und Lösungen und ihre Zusammensetzung	32
Tabelle 4: Kits und Antikörper.....	34
Tabelle 5: Verbrauchsmaterial und Pipettierhilfen	36
Tabelle 6: verwendete Geräte	37
Tabelle 7: Zelltyp und jeweilig bestimmte Expressionsfaktoren.....	49

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad-MSC	Adipogene mesenchymale Stammzellen
ADSC/hADSC	<i>human Adipose Derived Stroma/Stem Cell</i>
aFGF	<i>acidic Fibroblast Growth Factor</i>
ASC/hASC	humane adipogene Stammzellen
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BM-MSC	Knochenmarkstammzellen (<i>Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cell</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i>
cGy	zenti Gray
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBM-2	<i>Endothelial Cell Basal Medium-2</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPC	<i>Endothelial Progenitor Cell</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	und andere
etc.	etcetera
EZM	Extrazellulärmatrix
FGF-x	<i>Fibroblast Growth Factor-x</i>
FKS	fetales Kälberserum
G	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GA-1000	Gentamicin Sulfate Amphotericin B
Gy	Gray
h	Stunde (hora)
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF-1	<i>Hypoxia Inducible Factor 1</i>
HUVEC	humane umbilikale venöse Endothelzellen
H ₂ O	Wasser
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IGF	<i>Insulinlike Growth Factor</i>
IL-x	Interleukine

IL-6	Interleukin-6
INF- γ	Interferon- γ
kDa	Kilodalton
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
MSC	Mesenchymale Stammzelle (<i>Mesenchymal Stem Cell</i>)
N	Nummer (Anzahl der Versuchsreihen)
NHF	normale humane dermale Fibroblasten
NSAID	<i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug</i>
OH ⁻	Hydroxylradikale
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>
PF4	<i>Platelet Factor 4</i>
pg	Pikogramm
PPP	Plättchenarmes Plasma (<i>Platelet Poor Plasma</i>)
PRP	Plättchenreiches Plasma (<i>Platelet Rich Plasma</i>)
P/S	Penicillin/ Streptomycin
p-Wert	<i>p-value</i> , Signifikanzwert
RT-PCR	<i>real-time-PCR</i>
RD	<i>Reagent Diluent</i>
R3-IGF-1	<i>recombinant Insulinlike Growth Factor-1</i>
rhEGF	<i>recombinant Epidermal Growth Factor</i>
rhFGF-B	<i>recombinant Basal Fibroblast Growth Factor</i>
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
sICAM-1	<i>soluble Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
sVCAM-1	<i>soluble Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
Tab.	Tabelle
T/E	Trypsin/EDTA
TGF- α	<i>transforming growth factor-alpha</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>

TNS	<i>Trypsin Neutralizing Solution</i>
TSP-1	Thrombospondin-1
U	Unit
u.a.	unter anderem
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
α -SMA	<i>alpha Smooth Muscle Actin</i>
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
%	Prozent

8. Referenzen

1. Richmond JM, Harris JE. Immunology and Skin in Health and Disease. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2014;4:1–21. (Accessed December 8, 2014, at 25452424). ENG.
2. Sedlarik KM. Die Prozesse der Wundheilung. In: WundForum:10–5. (1/1994). (Accessed 2014 Dec 8).
3. Scheithauer M, Riechelmann H. Review Part I: Basic Mechanisms of Cutaneous Woundhealing. Laryngorhinotology 2003;82:31–5. (Accessed December 8, 2014).
4. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. Plastic and reconstructive surgery 2006;117:1e-S-32e-S. (Accessed December 8, 2014, at 16801750). eng.
5. Ghebrehiwet B, Silverberg M, Kaplan AP. Activation of the Classical Pathway of Complement by Hageman Factor Fragment. J. Exp. Med. 1981;153:665–76. (Accessed December 9, 2014).
6. Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, Stenman S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue (Abstract). Lab Invest 1980;43:47–51. eng.
7. Pohlman TH, Stanness KA, Beatty PG, Ochs HD, Harlan JM. An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism (Abstract). J Immunol 1986;136:4548–53. eng.
8. Senior RM, Skogen WF, Griffin GL, Wilner GD. Effects of Fibrinogen Derivatives Upon the Inflammatory Response. J. Clin. Invest. 1986;77:1014–9. (Accessed December 9, 2014).
9. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils (Abstract). The New England journal of medicine 1989;320:365–76. eng.
10. Pober JS, Gimbrone, M A Jr, Lapierre LA, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. J Immunol 1986;137:1893–6. eng.
11. Deisher TA, Haddix TL, Montgomery KF, Pohlman TH, Kaushansky K, Harlan JM. The role of protein kinase C in the induction of VCAM-1 expression on human umbilical vein endothelial cells. FEBS Letters 1993;331:285–90. (Accessed December 9, 2014).
12. Chandrasekharan UM, Siemionow M, Unsal M, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptor-II is required for TNF-alpha-induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. Blood 2007;109:1938–44. (Accessed December 10, 2014, at 17068152). eng.
13. Pinedo HM. The Role of VEGF in Oncology: Effects on Hemostasis and Thrombosis. Pathophysiology of Hemostasis and Thrombosis 2003;33:11–2. (Accessed October 30, 2014).
14. Ross R, Odland G. Human Wound Repair II Inflammatory Cells, Epithelial-Mesenchymal Interrelations and Fibrogenesis. J. Cell Biology 1968;39:152–68. (Accessed December 10, 2014).

15. Leibovich SJ, Ross R. The Role of the Macrophage in Wound Repair. *American Journal of Pathology* 1975;78:71–92. (Accessed December 10, 2014).
16. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt Ralph M., Schimmele SR, Strauss James E., Georgeff Karen R. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 1998;85:638–46. (Accessed November 16, 2014).
17. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *American Journal of Physiology* 1998;275:H1054-H1061. (Accessed November 16, 2014).
18. Chedid M, Rubin JS, Csaky KL, Aaronson SA. Regulation of Keratinocyte Growth Factor Gene Expression by IL-1. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;259:10753–7. (Accessed December 11, 2014).
19. Fufa D, Shealy B, Jacobson M, Kevy S, Murray MM. Activation of Platelet-Rich Plasma using soluble Type I Collagen. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2008;66:684–90. (Accessed December 11, 2014).
20. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery* 2006;117:12S-34S. (Accessed December 8, 2014, at 16799372). eng.
21. McGaw WT, Ten Cate, A R. A role for collagen phagocytosis by fibroblasts in scar remodeling: an ultrastructural stereologic study (Abstract). *J Invest Dermatol* 1983;81:375–8. eng.
22. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacology & Therapeutics* 1991;52:407–22. (Accessed December 11, 2014).
23. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:4606–10. (Accessed December 15, 2014).
24. Kibe J, Takenaka H, Kishimoto S. Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin. *British Journal of Dermatology* 2000;143:720–7. (Accessed December 16, 2014).
25. Baird A, Esch F, Gospodarowicz D, Guillemin R. Retina- and eye-derived endothelial cell growth factors: partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochemistry* 1985;24:7855–60. eng.
26. Breier G, Risau W. The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends in Cell Biology* 1996;6:454–6. (Accessed October 30, 2014).
27. Ehrlich PH, Krummel TM. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Repair And Regeneration* 1996;4:203–11. (Accessed December 16, 2014).
28. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of pathology* 2003;200:448–64. (Accessed December 16, 2014, at 12845612). eng.
29. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research* 2010;89:219–29. (Accessed December 16, 2014, at 20139336). eng.

30. Bouissou H, Pieraggi M, Julian M, Uhart D, Kokolo J. Fibroblasts in Dermal Tissue Repair. *International Journal of Dermatology* 1988;27:564–71. (Accessed December 16, 2014).
31. Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: review of the literature. *Radiation oncology (London, England)* 2012;7:162–71. (Accessed October 31, 2014, at 23006548). eng.
32. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 2012;26:812–20. (Accessed May 22, 2016, at 22211801). eng.
33. Scheithauer M, Riechelmann H. Review Part II: Disorders in Cutaneous Woundhealing. *Laryngorhinotology* 2003;82:36–9. (Accessed December 17, 2014).
34. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2004;17:91–6. (Accessed December 18, 2014).
35. Tarnuzzer RW, Schultz G. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair And Regeneration* 1996;(4):321–5.
36. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecien S, Dembinski A, Hahn EG. Influence of Bacterial Lipopolysaccharide on Healing of Chronic Experimental Ulcer in Rat. *Scand. J. Gastroenetrol.* 2001;(12):1239–47.
37. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clinics in dermatology* 2007;25:19–25. (Accessed December 18, 2014, at 17276197). eng.
38. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]* 2008;34:1159–69. (Accessed December 18, 2014, at 18513296). eng.
39. Goodson, W H 3rd, Hunt TK. Studies of Wound Healing in Experimental Diabetes Mellitus. *Journal of Surgical Research* 1977;22:221–7. (Accessed December 18, 2014).
40. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 2007;117:1219–22. (Accessed December 18, 2014).
41. Boyapati L, Wang H. The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontology* 2000;44:195–210. (Accessed December 18, 2014).
42. Chan, Lennard K W, Withey S, Butler, Peter E M. Smoking and wound healing problems in reduction mammoplasty: is the introduction of urine nicotine testing justified? *Annals of plastic surgery* 2006;56:111–5. (Accessed December 18, 2014, at 16432315). eng.
43. Wagner AE, Huck G, Stiehl DP, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T. Dexamethasone impairs hypoxia-inducible factor-1 function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;372:336–40. (Accessed December 19, 2014, at 18501194). eng.

44. Pieringer H, Stuby U, Biesenbach G. Patients with rheumatoid arthritis undergoing surgery: how should we deal with antirheumatic treatment? *Seminars in arthritis and rheumatism* 2007;36:278–86. (Accessed December 19, 2014, at 17204310). eng.
45. Dong Y, Fleming D, Yan TZ, Herndon DN, Waymack JP. Effect of Ibuprofen on the inflammatory response to surgical wounds. *The Journal of Trauma* 1993;35:340–3. (Accessed December 19, 2014).
46. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-Related Alteration in the Inflammatory Response to Dermal Injury. *The Journal of Investigative Dermatology* 2001;117:1027–36. (Accessed December 19, 2014).
47. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 1999;79:1479–87. eng.
48. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World journal of surgery* 2004;28:321–6. (Accessed December 19, 2014, at 14961191). eng.
49. Arnold M, Barbul A. Nutrition and wound healing. *Plastic and reconstructive surgery* 2006;117:42S-58S. (Accessed December 19, 2014, at 16799374). eng.
50. Alshadwi A, Nadershah M, Carlson ER, Young LS, Burke PA, Daley BJ. Nutritional considerations for head and neck cancer patients: a review of the literature. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2013;71:1853–60. (Accessed December 20, 2014, at 23845698). eng.
51. Wang J, Boerma M, Fu Q, Hauer-Jensen M. Radiation responses in skin and connective tissues: effect on wound healing and surgical outcome. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* 2006;10:502–6. (Accessed December 21, 2014, at 17047884). eng.
52. Devalia HL, Mansfield L. Radiotherapy and wound healing. *International Wound Journal* 2008;5:40–4. (Accessed November 2, 2014).
53. Dormand E, Banwell PE, Goodacre TEE. Radiotherapy and wound healing. *International Wound Journal* 2005;2:112–27. (Accessed November 1, 2014).
54. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *The Lancet Oncology* 2003;4:529–36. (Accessed December 21, 2014).
55. Olascoaga A, Vilar-Compte D, Poitevin-Chacón A, Contreras-Ruiz J. Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options. *International Wound Journal* 2008;5:246–57. (Accessed October 31, 2014).
56. Hymes SR, Strom EA, Fife C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2006;54:28–46. (Accessed November 2, 2014, at 16384753). eng.
57. Kojima T, Kanemaru S, Hirano S, et al. Regeneration of radiation damaged salivary glands with adipose-derived stromal cells. *The Laryngoscope* 2011;121:1864–9. (Accessed November 1, 2014, at 21748735). eng.
58. Müller K, Meineke V. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Experimental hematology* 2007;35:96–104. (Accessed December 21, 2014, at 17379094). eng.

59. Holler V, Buard V, Gaugler M, et al. Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. *The Journal of Investigative Dermatology* 2009;129:1280–91. (Accessed December 29, 2014, at 19212344). eng.
60. Goessler UR, Bugert P, Kassner S, et al. In vitro analysis of radiation-induced dermal wounds. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2010;142:845–50. (Accessed December 29, 2014, at 20493356). eng.
61. Tibbs MK. Wound healing following radiation therapy: a review. *Radiotherapy and Oncology* 1997;42:99–106. (Accessed January 15, 2015).
62. Hasan A, Murata H, Falabella A, et al. Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor- β 11 Supported by grants from the National Institutes of Health (AR42936 and AG10998) and the Dermatology Foundation of Miami.1. *Journal of Dermatological Science* 1997;16:59–66. (Accessed December 30, 2014).
63. Agren MS, Steenfos HH, Dabelsteen S, Hansen JB, Dabelsteen E. Proliferation and Mitogenic Response to PDGF-BB of Fibroblasts Isolated from Chronic Venous Leg Ulcers is Ulcer-Age Dependent. *The Journal of Investigative Dermatology* 1999;112:463–9. (Accessed December 30, 2014).
64. Cha J, Falanga V. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clinics in dermatology* 2007;25:73–8. (Accessed December 30, 2014, at 17276204). eng.
65. Dabiri G, Heiner D, Falanga V. The emerging use of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of human chronic wounds. *Expert opinion on emerging drugs* 2013;18:405–19. (Accessed December 30, 2014, at 24004161). eng.
66. Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, Falanga V, Quesenberry P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *Journal of cellular physiology* 2003;196:245–50. (Accessed December 30, 2014, at 12811816). eng.
67. Badiavas EV, Falanga V. Treatment of Chronic Wounds With Bone Marrow-Derived Cells. *Arch. Dermatol.* 2003;139:510–6. (Accessed December 30, 2014).
68. François S, Mouiseddine M, Mathieu N, et al. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Annals of hematology* 2007;86:1–8. (Accessed January 3, 2015, at 17043780). eng.
69. Wu Y, Huang S, Enhe J, Fu X. Insights into bone marrow-derived mesenchymal stem cells safety for cutaneous repair and regeneration. *International Wound Journal* 2012;9:586–94. (Accessed January 3, 2015).
70. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815–22. (Accessed December 30, 2014).
71. Alexaki V, Simantiraki D, Panayiotopoulou M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal cells support skin reepithelialization through secretion of KGF-1 and PDGF-BB: comparison with dermal fibroblasts. *Cell transplantation* 2012;21:2441–54. (Accessed January 2, 2015, at 22507764). eng.

72. Rao M. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mechanisms of Ageing and Development* 2001;122:713–34. (Accessed January 2, 2015).
73. Peroni D, Scambi I, Pasini A, et al. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Experimental Cell Research* 2008;314:603–15. (Accessed December 29, 2014).
74. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2006;24:1294–301. eng.
75. Zuk PA. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* 2002;13:4279–95. (Accessed January 3, 2015).
76. Gehmert S, Wenzel C, Loibl M, et al. Adipose tissue-derived stem cell secreted IGF-1 protects myoblasts from the negative effect of myostatin. *BioMed research international* 2014;2014:129048. (Accessed January 2, 2015, at 24575400). eng.
77. Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *The Journal of surgical research* 2009;152:157–66. (Accessed January 2, 2015, at 19883577). eng.
78. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of Neovascularisation by Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Circulation* 2004;110:349. (Accessed October 15, 2015).
79. Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell transplantation* 2011;20:205–16. (Accessed January 2, 2015, at 20719083). eng.
80. Kim W, Park B, Park S, Kim H, Sung J. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. *Journal of Dermatological Science* 2009;53:96–102. (Accessed January 3, 2015, at 18829265). eng.
81. Kim W, Park B, Sung J, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science* 2007;48:15–24. (Accessed January 3, 2015, at 17643966). eng.
82. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007;25:3234–43. (Accessed January 2, 2015, at 17901400). eng.
83. Zhang S, Espandar L, Imhof, Kathleen M P, Bunnell BA. Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells along the Keratocyte Lineage In vitro. *Journal of clinical & experimental ophthalmology* 2013;4. (Accessed January 2, 2015, at 23936748). ENG.
84. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, et al. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009;29:503–10. (Accessed January 3, 2015, at 19201690). eng.

- 85.**Rigotti G, Marchi A, Galiè M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plastic and reconstructive surgery* 2007;119:1409-22; discussion 1423-4. (Accessed December 29, 2014, at 17415234). eng.
- 86.**Rigotti G, Marchi A, Sharbati A. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Past, Present, and Future. *Aesth. Plast. Surg.* 2009;33:271–3. (Accessed December 29, 2014).
- 87.**Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2008;16:585–601. (Accessed January 6, 2015, at 19128254). eng.
- 88.**McNeil pL, Muthukrishnan L, Warder E, D'Amore PA. Growth Factors Are Resleased by Mechanically Wounded Endothelial Cells. *The Journal of Cell Biology* 1989;109:811–22. (Accessed January 8, 2015).
- 89.**Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992;189:824–31. (Accessed November 20, 2014).
- 90.**Montesano R, Vassalli J, Baird A, Guillemin R, Orci L. basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Cell Biology* 1986;83:7297–301. (Accessed January 8, 2015).
- 91.**Hebda PA, Klingbeil CK, Abraham JA, Fiddes JC. Basic Fibroblast Growth Factor Stimulation of Epidermal Wound Healing in Pigs. *J Invest Dermatol* 1990;95:626–31. (Accessed January 8, 2015).
- 92.**Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & growth factor reviews* 2004;15:197–204. (Accessed January 6, 2015, at 15207811). eng.
- 93.**Heldin C, Westermark B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiological Reviews* 1999;79:1283–316. (Accessed January 5, 2015).
- 94.**Siegbahn A, Hammacher A, Westermark B, Heldin C. Differential Effects of the Various Isoforms of PDGF on Chemotaxis of Fibroblasts, Monocytes and Granulocytes. *J. Clin. Invest.* 1990;85:916–20. (Accessed January 5, 2015).
- 95.**Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. Platelet alpha Granules Contain a Growth Factor for Fibroblasts. *Blood* 1979;53:1043–52. (Accessed January 5, 2015).
- 96.**Rajkumar VS, Shiwen X, Bostrom M, et al. Platelet-Derived Growth Factor- β Receptor Activation Is Essential for Fibroblast and Pericyte Recruitment during Cutaneous Wound Healing. *The American Journal of Pathology* 2006;169:2254–65. (Accessed January 6, 2015).
- 97.**Hellström M, Kalén M, Lindal P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 1999;128:3047–55. (Accessed January 6, 2015).

98. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, et al. Platelet-derived Growth Factor and Transforming Growth Factor- β Enhance Tissue Repair Activities by Unique Mechanisms. *The Journal of Cell Biology* 1989;109:429–40. (Accessed January 5, 2015).
99. Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine & growth factor reviews* 2004;15:215–28. (Accessed January 5, 2015, at 15207813). eng.
100. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C. Different Signal Transduction Properties of KDR and Flt1, Two Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269:26988–95. (Accessed January 9, 2015).
101. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in wound care* 2014;3:647–61. (Accessed January 8, 2015, at 25302139). ENG.
102. Detmar M, Brown LF, Schön MP, et al. Increased Microvascular Density and Enhanced Leukocyte Rolling and Adhesion in the Skin of VEGF Transgenic Mice. *J Invest Dermatol* 1998;111:1–6. (Accessed January 9, 2015).
103. Verheul, Henk M. W. Vascular endothelial growth factor-stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. *Blood* 2000;96:4216–21. (Accessed October 29, 2014).
104. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and Biological Properties of the Vascular Endothelial Growth Factor Family of Proteins. *Endocrine Reviews* 1992;13:18–32. (Accessed November 24, 2014).
105. Kishimoto T. The Biology of Interleukin-6. *Blood* 1989;74:1–10. (Accessed January 10, 2015).
106. Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Des Richardson R, Morris DL. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *Journal of clinical pathology* 2014;67:932–7. (Accessed January 10, 2015, at 25031389). eng.
107. Mateo RB, Reichner JS, Albina JE. Interleukin-6 activity in wounds 1994;R1840-R1844.
108. Lin Z. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology* 2003;73:713–21. (Accessed January 10, 2015).
109. Romano M, Sironi M, Toniatti C, et al. Role of IL-6 and Its Soluble Receptor in Induction of Chemokines and Leukocyte Recruitment. *Immunity* 1997;6:315–25. (Accessed January 10, 2015).
110. Fenton RR, Molesworth-Kenyon S, Oakes JE, Lausch RN. Linkage of IL-6 with Neutrophil Chemoattractant Expression in Virus-Induced Ocular Inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2002;43:737–43. (Accessed January 10, 2015).
111. Cohen T, Nahari D, Weiss Cerem L, Neufeld G, Levi B. Interleukin 6 Induces the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 1996;271:736–41. (Accessed January 10, 2015).

112. Lockett LR, Gallucci RM. Interleukin-6 (IL-6) modulates migration and matrix metalloproteinase function in dermal fibroblasts from IL-6KO mice. *Br. J. Dermatol.* 2007;156:1163–71. (Accessed October 28, 2014, at 17441960). eng.
113. Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, et al. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *The FASEB Journal* 2000;4:2525–31. (Accessed January 10, 2015).
114. Sugawara T, Gallucci RM, Simeonova PP, Luster MI. Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes. *Cytokine* 2001;15:328–36. (Accessed January 10, 2015, at 11594800). eng.
115. Osborn L, Hession C, Tizard R, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989;59:1203–11. (Accessed January 12, 2015).
116. Lyck R, Enzmann G. The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues. *Current opinion in hematology* 2015;22:53–9. (Accessed January 12, 2015, at 25427141). eng.
117. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* 1999;66:876–88. (Accessed January 12, 2015).
118. Shrikant P, Weber E, Jilling T, Benveniste EN. Intercellular Adhesion Molecule-1 Gene Expression by Glial Cells. *The Journal of Immunology* 1995;155:1489–501. (Accessed January 12, 2015).
119. Ramos TN, Bullard DC, Barnum SR. ICAM-1: isoforms and phenotypes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2014;192:4469–74. (Accessed January 12, 2015, at 24795464). eng.
120. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research* 2007;100:158–73. (Accessed January 12, 2015, at 17272818). eng.
121. Ley K, ed. *Adhäsions Moleküle: Funktion und Inhibition, VCAM-1 and its functions in development and inflammatory diseases.* Basel, Schweiz: Birkhäuser Verlag, 2007. (Accessed 2015 Jan 12). 34 p.
122. Balciunas M, Bagdonaite L, Samalavicius R, Baublys A. Markers of endothelial dysfunction after cardiac surgery soluble forms of vascular-1 and intercellular-1 adhesion molecules. *Medicina (Kaunas)* 2009;45:434–9. (Accessed January 12, 2015).
123. Chen Y, Osika W, Dangardt F, Gan L, Strandvik B, Friberg P. High levels of soluble intercellular adhesion molecule-1, insulin resistance and saturated fatty acids are associated with endothelial dysfunction in healthy adolescents. *Atherosclerosis* 2010;211:638–42. (Accessed January 12, 2015, at 20362293). eng.
124. Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 2009;12:267–74. (Accessed November 19, 2014, at 19399631). eng.

125. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis Assays: A Critical Overview. *Clinical Chemistry* 2003;49:32–40. (Accessed January 13, 2015).
126. Lawley TJ, Kubota Y. Induction of Morphologic Differentiation of Endothelial Cells in Culture. *J Invest Dermatol* 1989;93:59S-61S. (Accessed January 13, 2015).
127. Grant DS, Kleinman HK, Martin GR. The Role of Basement Membranes in Vascular Development. *Annals New York Academy of Science* 1990;588:61–72. (Accessed January 13, 2015).
128. Bishop ET, Bell GT, Bloor S, Broom IJ, Hendry, Neil F. K., Wheatley DN. An in vitro model of angiogenesis: Basic features. *Angiogenesis* 1999;3:335–44. (Accessed January 14, 2015).
129. Donovan D, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Comparison of three in vitro human ‘angiogenesis’ assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis* 2001;4:113–21. (Accessed January 13, 2015).
130. Kunz-Schughart LA, Schroeder JA, Wondrak M, et al. Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells in vitro. *American journal of physiology. Cell physiology* 2006;290:C1385-98. (Accessed November 20, 2014, at 16601149). eng.
131. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circulation research* 1999;85:221–8. (Accessed January 14, 2015).
132. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 2005;105:1068–77. (Accessed January 14, 2015).
133. Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2006;38:333–57. (Accessed November 20, 2014, at 16309946). eng.
134. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298–307. (Accessed January 8, 2015, at 21593862). eng.
135. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology* 2003;161:1163–77. (Accessed January 8, 2015, at 12810700). eng.
136. Hanahan D, Folkman J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353–64. (Accessed January 15, 2015).
137. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry* 2001;10:225–8. eng.
138. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2004;62:489–96. (Accessed November 16, 2014).

139. Kabiri A, Esfandiari E, Esmaeili A, Hashemibeni B, Pourazar A, Mardani M. Platelet-rich plasma application in chondrogenesis. *Advanced biomedical research* 2014;3:138. (Accessed January 22, 2015, at 25161985). eng.
140. Roussy Y, Bertrand Duchesne M, Gagnon G. Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation. *Clin. Oral Impl. Res.* 2007;18:639–48. (Accessed November 24, 2014).
141. Martineau I, Lacoste E, Gagnon G. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004;25:4489–502. (Accessed November 15, 2014, at 15046940). eng.
142. Liu Y, Kalén A, Risto O, Wahlström O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair And Regeneration* 2002;10. (Accessed November 24, 2014).
143. Weibrich G, Kleis, Wilfried K G, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2002;30:97–102. (Accessed November 16, 2014, at 12069512). eng.
144. Mooren RE, Hendriks EJ, van den Beucken, Jeroen J.J.P., et al. The Effect of Platelet-Rich Plasma In Vitro on Primary Cells: Rat Osteoblast-like Cells and Human Endothelial Cells. *Tissue Engineering* 2010;16:3159–72. (Accessed November 24, 2014).
145. Borzini P, Mazzucco L. Platelet gels and releasates. *Current opinion in hematology* 2005;12:473–9. (Accessed January 22, 2015).
146. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. *Vox Sanguinis* 2009;97:110–8. (Accessed January 23, 2015, at 19392780). eng.
147. Sommeling CE, Heyneman A, Hoeksema H, Verbelen J, Stillaert FB, Monstrey S. The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: a systematic review. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 2013;66:301–11. (Accessed January 23, 2015, at 23238115). eng.
148. Bashir J, Panero AJ, Sherman AL. The Emerging Use of Platelet-Rich Plasma in Musculoskeletal Medicine. *The Journal of the American Osteopathic Association* 2015;115:24–31. (Accessed January 22, 2015, at 25550489). ENG.
149. Hamid, Mohamad Shariff A, Yusof A, Mohamed Ali, Mohamed Razif. Platelet-rich plasma (PRP) for acute muscle injury: a systematic review. *PloS one* 2014;9:e90538. (Accessed January 22, 2015, at 24587389). eng.
150. Privratsky JR, Newman PJ. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell and tissue research* 2014;355:607–19. (Accessed November 12, 2014, at 24435645). eng.
151. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, et al. PECAM-1 (CD31) Cloning and Relation to Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Gene Superfamily. *Science* 1990;247:1219–22. (Accessed November 13, 2014).

- 152.** Muller William A., Ratti CM, Mc Donnell, Sonam L., Cohn ZA. A Human Endothelial Cell-Restricted, Externally Disposed Plasmalemmal Protein Enriched In Intercellular Junctions. *The Journal of Experimental Medicine* 1989;170:399–414. (Accessed November 13, 2014).
- 153.** Haubner F, Gassner HG. potential of adipose-derived stem cells concerning the treatment of wound healing complications after radiotherapy. *HNO* 2015;(2):111–7.
- 154.** Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. *Health physics* 2010;98:858–62. eng.
- 155.** Shayan R. Adipose-derived stem cells in radiotherapy injury: a new frontier. *Frontiers in surgery - Reconstructive and Plastic Surgery* 2015;(2):1–12.
- 156.** Poglio S, Galvani S, Bour S, et al. Adipose Tissue Sensivity to Radiation Exposure. *The American Journal of Pathology* 2009;174:44–53. (Accessed October 14, 2015).
- 157.** Nunez MI, McMillan TJ, Valenzuela MT, Ruiz de Almodóvar, J. M., Pedraza V. Relationship between DNA damage, rejoining and cell killing by radiation in mammalian cells. *Radiotherapy and Oncology* 1996;(39):155–65.
- 158.** Henning E, Dittmann H, Wiskirchen J, et al. Dosisabhängige Auswirkungen des kombinierten beta-gamma-Emitters 188Rhenium auf humane Endothelzellen und humane vaskuläre glatte Muskelzellen. *Röfo* 2004;(176):404–8.
- 159.** Eto H, Kato H, Suga H, et al. The Fate of Adipocytes after Nonvascularized Fat Grafting Evidence of Early Death and Replacement of Adipocytes. *Plastic and reconstructive surgery* 2012;129:1081–92. (Accessed October 14, 2015).
- 160.** Haubner F, Leyh M, Ohmann E, Pohl F, Prantl L, Gassner HG. Effects of external radiation in a co-culture model of endothelial cells and adipose-derived stem cells. *Radiation oncology (London, England)* 2013;8:66–73. (Accessed November 3, 2014).
- 161.** Kumar P, Miller AI, Polverini PJ. p38 MAPK Mediates gamma-Irradiation-induced Endothelial Cell Apoptosis, and Vascular Endothelial Growth Factor Protects Endothelial Cells through the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt-Bcl-2 Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279:43352–60. (Accessed October 15, 2015).
- 162.** Park M, Oh E, Song M, Lee H, Park HJ. Radio-sensitivities and angiogenic signaling pathways of irradiated normal endothelial cells derived from diverse human organs. *Journal of Radiation Research* 2012;53:570–80. (Accessed October 15, 2015).
- 163.** Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004;109:1292–8. (Accessed January 2, 2015, at 14993122). eng.
- 164.** Doyle JW, Li Y, Salloum A, FitzGerald TJ, Walton RL. The Effects of Radiation on Neovascularization in a Rat Model. *Plastic and reconstructive surgery* 1996;98:129–35. (Accessed January 15, 2015).
- 165.** Hadad I, Johnstone BH, Brabham JG, et al. Development of a porcine delayed wound-healing model and its use in testing a novel cell-based therapy.

- International journal of radiation oncology, biology, physics 2010;78:888–96. (Accessed January 15, 2015, at 20708345). eng.
166. D'Eposito V, Passaretti F, Perruolo G, et al. Platelet-Rich Plasma Increases Growth and Motility of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Controls Adipocyte Secretory Function. *Journal of Cellular Biochemistry* 2015;116:2408–18. (Accessed October 18, 2015).
 167. Liu Y, Zhou Y, Feng H, Ma G, Ni Y. Injectable tissue-engineered bone composed of human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2008;29:3338–45. (Accessed October 18, 2015).
 168. Cervelli V, Scioli MG, Gentile P, et al. PRP Greatly Potentiates Insulin-Induced Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells Through a Serine/Threonine Kinase Akt-Dependent Mechanism and Promotes Clinical Fat Graft Maintenance. *Stem Cells Translational Medicine* 2012;(1):206–20.
 169. Fukaya Y, Kuroda M, Aoyagi Y, et al. Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogenous preadipocytes in an in vitro culture system. *Experimental and Molecular Medicine* 2012;44:330–9. (Accessed October 18, 2015).
 170. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plastic and reconstructive surgery* 2008;122:1352–60. (Accessed November 20, 2014, at 18971718). eng.
 171. Fréchette J, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich Plasmas: Growth Factor Content and Roles in Wound Healing. *Journal of Dental Research* 2005;84:434–9. (Accessed November 16, 2014).
 172. Haubner F, Muschter D, Schuster N, et al. Platelet-rich plasma stimulates dermal microvascular endothelial cells and adipose derived stem cells after external radiation. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2015;61:279–90. eng.
 173. Mazzucco L, Medici D, Serra M, et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion* 2004;44:1013–8. (Accessed November 4, 2014).
 174. Iervolino V, Di Costanzo G, Azzaro R, et al. Platelet gel in cutaneous radiation dermatitis. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 2013;21:287–93. (Accessed November 3, 2014, at 23150187). eng.
 175. Isshiki H, Akira S, Tanabe O, et al. Constitutive and Interleukin-1 (IL-1)-Inducible Factors Interact with the IL-1-Responsive Element in the IL-6 Gene. *Molecular and Cellular Biology* 1990;2757–64.
 176. Jyun-Yi W, Chia-Hsin C, Chau-Zen W, Mei-Ling H, Ming-Long Y, Yan-Hsiung W. Low-Power Laser Irradiation Suppresses Inflammatory Response of Human Adipose-Derived Stem Cells by Modulating Intracellular Cyclic AMP Level and NF-κB Activity. *PLoS one* 2013;(8):e54067.

- 177.** Van der Meeren, A., Bertho J, Vandamme M, Gaugler M. Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. *Mediators of Inflammation* 1997;(6):185–93.
- 178.** Hom DB, Unger GM, Pernell KJ, Manivel JC. Improving surgical wound healing with basic fibroblast growth factor after radiation. *The Laryngoscope* 2005;115:412–22. eng.
- 179.** Pierce GF, Tarpley JE, Tseng J, et al. Detection of Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-AA in Actively Healing Human Wounds Treated with Recombinant PDGF-BB and Absence of PDGF in Chronic Nonhealing Wounds. *The Journal of Clinical Investigation* 1995;96:1336–50. (Accessed January 10, 2016).
- 180.** Mustoe TA, Pierce GF, Morishima C, Deuel TF. Growth Factor-induced Acceleration of Tissue Repair through Direct and Inductive Activities in a Rabbit Dermal Ulcer Model. *J. Clin. Invest.* 1991;87:694–703. (Accessed January 10, 2016).
- 181.** Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Robson LE, Pierce GF. Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *The Lancet* 1992;(339):23–5.
- 182.** Hsu C, Yuan K, Tseng C. The negative effect of platelet-rich plasma on the growth of human cells is associated with secreted thrombospondin-1. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2009;107:185–92. (Accessed February 17, 2016, at 18805712). eng.
- 183.** Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, et al. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 2014;17:186–92. (Accessed November 20, 2014, at 24748436). eng.
- 184.** Liyama K, Hajra L, Liyama M, et al. Patterns of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Rabbit and Mouse Atherosclerotic Lesions and at Sites Predisposed to Lesions Formation. *Circulation research* 1999;85:199–207. (Accessed February 2, 2016).
- 185.** Müller K, Köhn F, Port M, et al. Intercellular adhesion molecule-1: a consistent inflammatory marker of the cutaneous radiation reaction both in vitro and in vivo. *The British journal of dermatology* 2006;155:670–9. (Accessed February 3, 2016, at 16965414). eng.
- 186.** Herrera BS, Coimbra LS, Bastos AS, et al. Platelet-rich plasma stimulates cytokine expression and alkaline phosphatase activity in osteoblast-derived osteosarcoma cells. *Archives of oral biology* 2012;57:1282–9. (Accessed February 3, 2016, at 22487693). eng.
- 187.** Gho YS, Kleinman HK, Sosne G. Angiogenic Activity of Human Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1. *Cancer Research* 1999;(59):5128–32.
- 188.** Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of Laminin and Basement Membrane in the Morphological Differentiation of Human Endothelial Cells into Capillary-like Structures. *The Journal of Cell Biology* 1988;(107):1589–98.

- 189.** Berthod F, Germain L, Tremblay N, Auger FA. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *Journal of cellular physiology* 2006;207:491–8. (Accessed January 14, 2015, at 16453301). eng.
- 190.** Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2015;9:XE01-XE05. (Accessed February 6, 2016, at 26266204). eng.
- 191.** Moser TL, Stack MS, Asplin I, et al. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Cell Biology* 1999;(96):2811–6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=angiostatin+binds+atp+synthetase+moser>

