

**Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität
Rostock**

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Analyse der Rolle des
Glykoprotein hormons Erythropoietin auf den Prozess
der dermalen Wundheilung

Eine intravitalfluoreszenzmikroskopische,
histologische und zellbiologische Untersuchung

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Christian Krüger

aus Hamburg

geboren am 01.10.1982 in Güstrow

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter:

Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Herr Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff

Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Herr Prof. Dr. med. Hans-Oliver Rennekampff

Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie, RWTH Aachen

Tag der Einreichung: 24.10.2012

Tag der Verteidigung: 17.09.2013

1. INHALTSVERZEICHNIS

1.	Inhaltsverzeichnis	I-III
1.1.	Glossar	IV-VI
2.	Zusammenfassung	1
3.	Einleitung	3
3.1.	Historie zur Wundheilung	3
3.2.	Wundheilung	4
3.2.1.	Exsudationsphase	6
3.2.2.	Resorptionsphase	6
3.2.3.	Proliferationsphase	7
3.2.4.	Reparationsphase	10
3.3.	Therapieoptionen zur Verbesserung der Wundheilung	11
3.4.	Erythropoietin	17
4.	Zielsetzung und Aufgaben	23
5.	Material und Methodik	24
5.1.	Versuchstiere	24
5.2.	Experimentelles Modell	25
5.2.1.	Wundheilungsmodell in der Rückenhautkammer der Maus	25
5.2.1.1.	Präparation der Rückenhautkammer und Wundmodell	25
5.3.	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und Stereomikroskopie	27
5.3.1.	Epithelialisierung	28
5.3.2.	Mikrozirkulatorische Parameter	29
5.3.2.1.	Gefäßdurchmesser	29
5.3.2.2.	Blutzellfließgeschwindigkeit	29
5.3.2.3.	Funktionelle Kapillardichte	30
5.4.	<i>In vitro-</i> / <i>ex-vivo</i> -Analysen	31

INHALT	EPO und Wundheilung	II
5.4.1.	WST-1 Assay	31
5.4.2.	Wound Scratch Assay	32
5.5.	Histologie	33
5.5.1.	Hämatoxylin-Eosin	34
5.5.1.1.	Histologische Bestimmung der Zellularität	34
5.5.2.	Histologischer Nachweis von Leukozyten	35
5.6.	Immunhistochemie	35
5.6.1.	Immunhistochemischer Nachweis der initialen Apoptose	36
5.6.2.	Nachweis der terminalen Apoptose	36
5.6.3.	Immunhistochemischer Nachweis von Endothelzellen	37
5.6.4.	Immunhistochemischer Nachweis zellulärer Proliferation	37
5.7.	Elektronenmikroskopie	38
5.8.	Hämatologische Analysen	38
5.9.	Experimentelles Protokoll	39
5.9.1.	Versuchsablauf	39
5.9.2.	Versuchsgruppen	39
5.10.	Statistische Auswertung	40
6.	Ergebnisse	41
6.1.	Dermale Wundheilung in der Rückenhautkammer der Maus	41
6.1.1.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Re-Epithelialisierung	41
6.1.2.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf mikrovaskuläre Parameter der regenerierenden Hautwunde	42
6.1.2.1.	Gefäßdurchmesser	43
6.1.2.2.	Blutzellfließgeschwindigkeit	45
6.1.2.3.	Funktionelle Kapillardichte	46
6.2.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf das Granulationsgewebe und die Wundzusammensetzung der regenerierenden Hautwunde	48
6.3.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Gefäßreifung	52
6.4.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Zellmigration und Zellproliferation	53
6.5.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf das systemische Blutbild	54

7.	Diskussion	56
7.1.	Diskussion von Material und Methodik	56
7.1.1.	Diskussion des Modells	56
7.1.1.1.	Historie des Modells	56
7.1.1.2.	Versuchstiere	58
7.1.1.3.	Anästhesie	58
7.1.1.4.	Vergleich anderer Modelle	59
7.1.1.5.	z-VAD-Fmk	61
7.1.2.	Diskussion der Untersuchungstechniken	62
7.2.	Diskussion der Ergebnisse	63
7.2.1.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Re-Epithelialisierung	63
7.2.2.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf mikrovaskuläre Parameter der regenerierenden Hautwunde	66
7.2.3.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf das Granulationsgewebe und die Wundzusammensetzung der regenerierenden Hautwunde	69
7.2.4.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Gefäßreifung	73
7.2.5.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Zellmigration und Zellproliferation	75
7.2.6.	Effekte von Erythropoietin und zVAD auf das systemische Blutbild	77
7.3.	Klinische Perspektiven	80
8.	Quellen und Literaturangaben	82
9.	Lebenslauf	97
10.	Danksagung	100
	Anhang	
I.	Mikrovaskuläre Parameter distaler Gefäße	I
II.	WST-1-Assay	II
	Thesen zur Dissertation	
	Eidesstattliche Erklärung	

1.1 Glossar

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ANOVA	Analysis of Variance
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
bp	Basenpaare
ca.	zirka
CAE	Chlorazetatesterase
CD	Cluster of Differentiation
CEPO	Carbamyliertes EPO
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	days, Tage
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNS	Desoxy-Ribonukleinsäure
EC	Endothelzelle
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endothelial-Nitric-Oxide-Synthase
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
EPO	Erythropoietin
et al.	et alii, und andere
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

g	Gramm
h	Stunden
H&E	Hämatoxylin&Eosin
H ₂ O	Wasser
HCT	Hämatokrit
HGB	Hämoglobin
HPF	High Power Field
HRP	Horse Radish Peroxydase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	Intercellular-Cell-Adhesion-Molecule
IE	internationale Einheit
iNOS	Inducible-Nitric-Oxide-Synthase
IVM	intravitale Fluoreszenzmikroskopie
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
MSC	Mesenchymale Stammzelle
n	Number, Anzahl
NaCl	Kochsalzlösung
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat

nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
p	statistisches Signifikanzniveau
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PECAM	Platelet/Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule
pH	pH-Wert
RBC	Erythrozytenzahl
RHD	wiederholte Hochdosis (repeated high dose)
RLD	wiederholte Niedrigdosis (repeated low dose)
ROCK	Rho-assoziierte-Proteinkinase
s	Sekunde
SEM	Standardfehler
SHD	einmalige Hochdosis (single high dose)
SMAD	Mothers-against-decapentaplegic-homolog-Protein
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming-Growth-Factor
TNF	Tumor-Necrosis-Factor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
V	Geschwindigkeit
W	Watt
WBC	White blood cells (Leukozytenzahl)
WST-1	Water-Soluble-Tetrazolium-1
z-VAD-fmk	z-VAD-Fluoromethylketone
α-SMA	α-Smooth-Muscle-Actin
μM	Mikro Molar
μm	Mikrometer

2. ZUSAMMENFASSUNG

2.1. Analyse der Rolle des Glykoprotein hormons Erythropoietin auf den Prozess der dermalen Wundheilung

Die kutane Wundheilung ist ein dynamischer Prozess, der neben Inflammation und Proliferation auch durch apoptotische und nekrotische Phänomene gekennzeichnet ist. Aktuelle Untersuchungen konnten zeigen, dass das Glykoprotein hormon Erythropoietin neben seiner hämatopoetischen Wirkung einen zytoprotektiven und anti-inflammatorischen Charakter besitzt sowie auch anti-apoptotische und anti-nekrotische Eigenschaften aufweist. Dieses pleiotrope Wirkprofil könnte den kutanen Wundheilungsprozess an verschiedenen Punkten beeinflussen und damit ein hohes Potential besitzen, die Entwicklung neuer Therapiestrategien im Rahmen der Hautregeneration und Reparatur weiter voranzutreiben.

Im Modell der Hautwundheilung in der Rückenhautkammer an haarlosen SKH-1-*hr* Mäusen (n=47) wurde eine volle dermale Wunde präpariert. Die Tiere wurden nach Randomisierung in fünf Versuchsgruppen eingeteilt, welche eine tägliche i.p. Gabe von entweder 400 IE/kg KG Erythropoietin (EPO) (wiederholte Niedrigdosis (RLD-EPO); n=8), 5.000 IE/kg KG EPO (wiederholte Hochdosis (RHD-EPO); n=12) oder eine einmalige Gabe von 5.000 IE/kg KG EPO nur an Tag 0 (einmalige Hochdosis (SHD-EPO); n=7) erhielten. In zusätzlichen Experimenten wurde durch die tägliche Applikation von 3,3 mg/kg KG i.p. z-VAD-fmk (n=8) analysiert, inwieweit EPO alleinig über anti-apoptotische Effekte die Wundheilung beeinflusst. Physiologische Kochsalzlösung diente als Kontrolle (12,5 ml/kg KG; n=12).

Mittels Lichtmikroskopie und intravitaler Fluoreszenzmikroskopie an den Tagen 3, 6, 9 und 12 nach Wundsetzung konnte die Re-Epithelialisierung sowie Re-vaskularisierung der sich regenerierenden Haut quantifiziert werden. An Tag 12 wurde die Rückenhautkammer für histologische, immunhistochemische, molekularbiologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen asserviert und Blut für entsprechende Laborparameter entnommen. *In vitro* Assays gaben Aufschluss über den

Einfluss von EPO auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von Fibroblasten und Keratinozyten.

SHD-EPO beschleunigte signifikant die Re-Epithelialisierung, reduzierte die Wundzellularität und induzierte die Maturierung der neugeformten mikrovaskulären Netzwerke. Im Gegensatz hierzu führte die Applikation von RHD-EPO zu einer signifikanten Verschlechterung der Wundheilung, sichtbar an einem verzögerten Wundverschluss, einer hohen Zellularität des Granulationsgewebes sowie dem Fehlen der Gefäßreifung. Außerdem resultierte die Gabe von RHD-EPO in einer überhöhten Erythrozytenzahl und vaskulären Funktionsstörungen, was ebenso die Gefäß- und Gewebematurierung in der regenerierenden Wunde verschlechterte.

Interessanterweise zeigte die Applikation von z-VAD ähnliche Einschränkungen im Maturierungsprozess der heilenden Wunde wie RHD-EPO, was auf eine EPO-vermittelte Beeinträchtigung der apoptotischen Zellregression im Granulationsgewebe schließen lässt. Zudem verlangsamte die RHD-EPO-Gabe die Migration von Fibroblasten und Keratinozyten *in vitro*. Die Inkubation der Zellen mit RLD-EPO aber vor allem mit SHD-EPO resultierte hingegen in einem akzelerierten Defektverschluss *in vitro*.

In der vorliegenden Studie konnte anhand eines neuen *in vivo* Modells der Hautwundheilung zum ersten Mal gezeigt werden, dass die RLD-EPO-Gabe sowie besonders die SHD-EPO-Applikation den kutanen Wundheilungsprozess signifikant verbessert und damit der kontinuierlichen Hochdosis-Applikation von EPO (RHD-EPO) eindeutig überlegen ist. Zusätzlich ließ sich, angesichts des eindrücklich nachgewiesenen pleiotropen Wirkprofils von EPO, erstmals eine daraus resultierende phasenspezifische Wirkung der gewählten EPO-Dosierungen auf die Wundheilung erkennen. Die in dieser Arbeit dargelegte umfangreiche Charakterisierung der Epo-spezifischen Wirkung auf die Wundheilungskaskade eröffnet angesichts der weitgefächerten Analyse viele neue Ansätze für die weitere experimentelle Forschung und klinische Therapie. Aktuelle klinische Studien zeigen, dass den bemerkenswerten Ergebnissen der Grundlagenforschung zu EPO eine große Bedeutung für die klinischen Therapie zugesprochen wird.

3. EINLEITUNG

3.1. Historie zur Wundheilung

Die Wundheilung beschäftigt die Menschen schon seit Anbeginn der Zeit. Verletzungen durch Bisse wilder Tiere, Waffen oder Unfälle führten schon früh zur Entwicklung empirischer Behandlungsmaßnahmen. Erste schriftliche Zeugnisse einer Wundheilkunde stammen aus dem alten Ägypten vor mehr als 3500 Jahren. Im Papyrus Ebers (~1550 vor Christus) finden sich beispielsweise neben anatomisch-physiologischen Darstellungen auch Anweisungen zur Behandlung von Wunden und anderen Hauterscheinungen (RÖTHEL 1996). Auch ist der 1862 in Theben gefundene Papyrus Edwin Smith vor allem der Wundheilkunde gewidmet. In dieser auch als Wundenbuch bezeichneten Beschreibung wurde zum ersten Mal zu einer topischen Wundversorgung mit Schmalz, Honig und Flachs und anschließendem Leinenverband geraten (RÖTHEL 1996). Interessanterweise wird die antibiotische Wirksamkeit von Honig bis heute bei der Behandlung von Wundinfektionen eingesetzt (ALCARAZ et al. 2002; RÖTHEL 1996).

Auch im klassischen Griechenland setzte man sich detailliert mit der Wundheilung auseinander. Hippokrates (460-370 vor Christus) berichtet beispielsweise über den Unterschied von scharfen und gequetschten Wunden und der davon abhängigen Heilung oder Eiterung der Wunde: „Die gequetschten Wunden eitern, weil das gequetschte Gewebe sich in Eiter auflösen muss, bevor es durch neues Fleisch ersetzt wird“ (RÖTHEL 1996). Auch die Gefahr der Infektion wurde zu dieser Zeit bereits erkannt. Es wurde mit primitiven, aber wirkungsvollen Strategien versucht diese zu verhindern. So wurde neben der generellen Pflicht zur peinlichen Sauberkeit für den Berufsstand der damaligen Chirurgen der Vorläufer eines antiseptischen Wundverbandes in Form einer in Rotwein getränkten Leinenkompressen eingeführt (LIPPERT 2006; RÖTHEL 1996)

Im Mittelalter erfolgte dann nach einer langen Zeit unveränderter Wundbehandlungsmethoden ein Umbruch, welcher von PARACELSUS (1493-1541), unter Nutzung der damals noch jungen Chemie für neue Therapien eingeleitet wurde. Mit seiner Schrift „Die große Wundartzney“ (Augsburg 1536) machte er sich in diesem Zusammenhang um die Wundbehandlung verdient. Er postulierte, dass die traditionellen Heilmittel den Zweck hatten, die durch äußere Einflüsse vergifteten Dinge zu be-

kämpfen, jedoch nicht neues Gewebe zu erzeugen. Eine Ansicht, welche auch heute noch als richtungweisend angesehen werden kann (RÖTHEL 1997).

Das 19. Jahrhundert war schließlich geprägt durch grundlegende Entdeckungen in Bezug auf die heutigen Wundbehandlungsstrategien. Vor allem der Kampf gegen die Wundinfektion war Gegenstand besonders intensiver Forschungstätigkeit. Berühmte Wissenschaftler, wie *Ignaz Phillip Semmelweis (1818-1865)*, *Louis Pasteur (1822-1895)* und *Robert Koch (1843-1910)* brachten durch ihre Arbeiten über Wundinfektionen und deren Erreger die ersten aseptischen Arbeitsweisen als primäre Prävention auf den Weg. Die Anwendung dieser Erkenntnisse auf die Klinik erfolgte dann erstmals durch den englischen Chirurgen *Joseph Lister (1827-1912)*. Er führte 1867 das Desinfektionsmittel Karbolsäure ein, welches die bis dato hohe postoperative Mortalität entscheidend senken konnte. Diese von vornherein keimfreie Arbeitsweise wurde treffend als „Aseptik“ bezeichnet.

Jene umwälzenden Veränderungen auf dem Gebiet der Wundbehandlung erforderten erstmals seit Jahrhunderten auch neue Verbandstoffe. Lister's neuer Okklusivverband benötigte beispielsweise eine Vielzahl von Verbandstoffen, die in dieser Art und Weise bisher noch nicht verwendet wurden. So wurden sterile und imprägnierte Verbandstoffe zur Wundbehandlung entwickelt. All diese neuen Entwicklungen, ganz gleich, ob es sich um Karbolsäure, Jodoform, Salicylsäure oder Borsäure imprägnierte Watten oder Gazeprodukte handelte, vermochten sekundäre Wundinfektionen drastisch zu reduzieren. Entscheidend trugen hierzu ebenfalls die spätere Entdeckung des Penicillins durch *Alexander Fleming (1881-1955)* und der Sulfonamide durch *Domagk (1865-1964)* bei (LIPPERT 2006; RÖTHEL 1997).

3.2. Wundheilung

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie ist das Grenzorgan zur Umwelt und hat neben Sinnesfunktionen auch die essentielle Aufgabe, Schutz vor äußeren Einflüssen zu bieten (ALLGÖWER *et al.* 1995; ELIAS 2007). Dabei hat jede Funktion ihr genau durchkonstruiertes, morphologisches Korrelat. Die Barrierefunktion wird durch das *Stratum corneum*, der mechanische Schutz durch das Kollagengeflecht der Dermis sowie subkutane Fettpolster und die Thermoregulation durch das Haarkleid, Fettgewebe, dermale Gefäßplexus und Schweißdrüsen realisiert. Darüber hinaus bietet die Haut durch das Melaninpigment und die Hornschicht

Schutz vor ultravioletter Strahlung. Ferner stellt die Sensibilität der Haut eine essentielle Funktion für den Organismus dar. Mittels zahlreicher verschiedener Sensortypen ist sie in der Lage, unterschiedliche Reizqualitäten wahrzunehmen. Neben der Rezeption von Druck-, Dehnungs- und Vibrationsreizen durch Mechanosensoren, wie Meissner-, Vater-Pacini- und Ruffinikörperchen sowie Merkel-Zellen erfolgt die Empfindung von Temperaturreizen über spezialisierte Thermosensoren. Weiterhin ist die Haut in der Lage, durch freie Nervenendigungen die Nozizeption zu gewährleisten. Eine der wichtigsten Aufgaben ist jedoch die Abwehr von Infektionserregern durch ein trockenes, saures Milieu und eine symbiotische Flora auf der Oberfläche zusätzlich zur eigentlichen Barrierefunktion (MOLL 2001).

Eine Störung der Integrität der Haut führt, je nach Schädigung der morphologischen Korrelate, konsekutiv zur Störung einer oder mehrerer ihrer Funktionen. Da dies für den Organismus einen pathologischen Zustand darstellt, reagiert dieser mit einem gezielten Defektverschluss in Form der kutanen Wundheilung.

Der Wundheilungsprozess ist ein dynamisches Geschehen, welches Material ab- (katabole Phase) und aufbaut (anabole Phase). Dies geschieht in vier, durch morphologische als auch histologische Leitkriterien differenzierte Phasen (Abb. 1), welche sich überlappen und nur willkürlich voneinander getrennt werden (TAUTENHAHN *et al.* 2007).

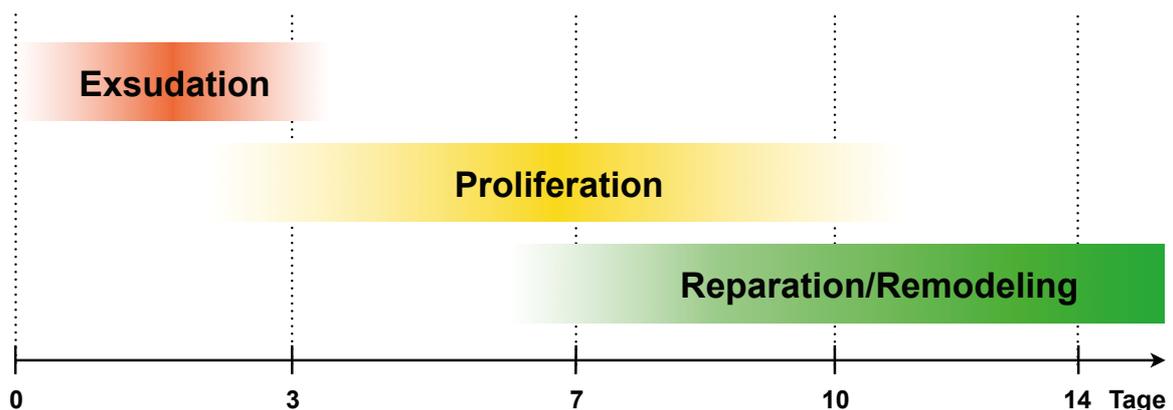


Abbildung 1: Phasen der Wundheilung (modifiziert n. Stramer BM *et al.* 2007)

3.2.1. Exsudationsphase

In den ersten Stunden nach einem Trauma setzt die Entzündungs- oder Exsudationsphase (ca. 1.-8. h) ein. Initiale Mikroblutungen und konsekutive Hämostase führen nach kurzer Zeit zu einem temporären Defektverschluss, welcher die primäre Aufgabe der initialen Phase der Wundheilung darstellt. Nach einer anfänglichen Vasokonstriktion zur Blutstillung (5-10 min) kommt es zu einer reaktiven Vasodilatation, welche die Infiltration von Thrombozyten und Leukozyten in den Wundspalt ermöglicht. Durch die sukzessiv einsetzende thrombotische Okklusion freier Kapillaren kommt es konsekutiv zu einer Blutungsstillung der Wunde und zur Ausbildung eines Fibrin-Blutkoagels, welches die Wunde temporär bedeckt (*TAUTENHAHN et al. 2007*). Besonders die Thrombozyten nehmen in dieser Phase eine entscheidende Rolle ein. Durch die Sekretion wichtiger Wachstumsfaktoren werden vor allem die Chemotaxis, Proliferation und Migration von Zellen sowie die Produktion extrazellulärer Matrix angeregt. Parallel immigrieren auch neutrophile Granulozyten via Diapedese in das Wundgebiet. Ihre primäre Aufgabe ist neben der eigentlichen Entzündungsreaktion das Abtöten von eingedrungenen Mikroorganismen durch Sekretion freier Sauerstoffradikale und Phagozytose sowie die Chemotaxis von Makrophagen und Lymphozyten (*SINGER et al. 1999; SCHEITAUER et al. 2003; MARTIN et al. 2005; EMING et al. 2007*).

3.2.2. Resorptionsphase

Die Resorptionsphase (ca. 1.-4. Tag) ist im Wundheilungsprozess durch die Anwesenheit von spezialisierten Wundmakrophagen gekennzeichnet, welche ab dem zweiten Tag in die Wunde immigrieren (*LEIBOVICH et al. 1975*). Sie werden chemotaktisch durch neutrophile Granulozyten angelockt und differenzieren sich aus im Blut zirkulierenden Monozyten. Ihre Aufgaben im Wundgebiet sind vor allem das zelluläre Débridement, gekennzeichnet durch die Phagozytose von geschädigter Matrix, Zelltrümmern aber auch von Fibrin und persistierenden Neutrophilen (*DIPIETRO 1995; MARTIN&LEIBOVICH 2005*). Daneben produzieren sie außerdem eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (*LEIBOVICH et al. 1976; RAPPOLEE et al. 1988; WERNER et al. 2003*). Getriggert durch diese Chemokine kommt es einerseits zur Fibroblastenproliferation und -migration mit anschließender Differenzierung

zu Fibrozyten und späterer Kollagensynthese, andererseits zur Induktion der Angiogenese durch die Produktion angiogener Wachstumsfaktoren (*LEIBOVICH et al. 1975; SINGER et al. 1999; WERNER et al. 2003*).

3.2.3. Proliferationsphase

In der Proliferationsphase (ca. 3.-10. Tag) steht die Ausbildung des Granulationsgewebes im Vordergrund. Neben der Einwanderung ortsständiger Fibroblasten entlang des Fibrinnetzwerks und der Re-Epithelialisierung ausgehend vom Wundrand beginnt ebenfalls die Angiogenese durch Kapillareinsprossung (*TAUTENHAHN et al. 2007*). Die dabei ablaufende Synthese von Kollagenen, Fibronektinen und anderen Grundsubstanzen durch Fibroblasten unter Beteiligung regulierender Zytokine, wie z. B. Interferon- γ und transforming growth factor (TGF)- β als Grundlage für eine neue Bindegewebsmatrix, dient vor allem dem Verschluss von Gewebelücken und der Wiederherstellung der mechanischen Reißfestigkeit (*WERNER et al. 2003; TAUTENHAHN et al. 2007*). Der Kollagenanteil im Wundbereich steigt im Folgenden an, während die Fibroblastenproliferation sukzessive nachlässt. Es stellt sich allmählich eine Balance zwischen Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix ein (*MADDEN et al. 1971; SINGER et al. 1999; HAFNER et al. 2002*).

Die Re-Epithelialisierung wird durch randständige Keratinozyten oder von epithelialen Stammzellen aus Haarfollikeln und Schweißdrüsen gewährleistet (*BODÓ et al. 2007; MILLER et al. 1998; GARLICK et al. 1994; MARTIN et al. 1997*). Zum einen führen aktivierte Stresssignalwege in am Wundrand lokalisierten epithelialen und nichtepithelialen Zellen zur Ausschüttung einer Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (z. B. epidermal growth factor (EGF), keratinocyte growth factor (KGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), nerval growth factor (NGF)). Zum anderen kommt es durch Wegfall der gegenseitigen Kontaktinhibition und parallel einhergehenden physikalischen Spannungen an Desmosomen und Hemidesmosomen wahrscheinlich zur Freisetzung von Lipidmediatoren und Aktivierung membranständiger Kinasen (Src-Kinasen). Dies führt zu einer erhöhten Permeabilität für Ionen, wie z. B. Kalzium und wirkt in der Folge für die betroffenen Wundrandzellen als initiiertes Signal. Daraufhin erfolgt eine Retraktion und Re-Organisation der intrazellulären Tonofilamente im Sinne einer Polarisierung in Migrationsrichtung (*MITCHISON et al. 1996; MARTIN et al. 1997*). Durch enzymatische Lockerung der interzellulären Desmosomen

via Kollagenase und Elastase migrieren die aktivierten Keratinozyten durch so genanntes „*Shuffling*“ unter dem präformierten Fibrin-Blut-Koagel in die obere Schicht des Granulationsgewebes (*JACINTO et al. 2001*). Diese fibronektinreiche Matrix dient der Zelladhäsion und Migration während der epithelialen Regeneration. Das in diesem Zusammenhang genannte *Shuffling* bezeichnet den Umstand, dass die Wundrandzellen kompetitiv entlang chemo-taktischer Gradienten, welche durch Mediatoren, wie Interleukin-1 (IL-1) aufgebaut werden, in Richtung Defektmitte wandern (*CLARK et al. 1982*). Die Migration erfolgt schließlich durch die Ausprägung so genannter Lamellopodien als füßchenartige Ausstülpungen der Zellmembran, die in Richtung des Wundzentrums ausgerichtet sind. Hierfür ist eine Polymerisation zytoskelettaler Aktinfasern im Bereich der Ausstülpungen und die Neuformierung von fokalen Adhäsionen an die extrazelluläre Matrix unter Mitwirkung von Integrinen notwendig. Die genannten zytoskelettalen Vorgänge werden durch Vertreter aus der Familie der RhoGTPasen (Rho, Rac, Cdc42) reguliert (*NOBES 1999*). Die so genannten kleinen GTPasen sind als Schalter der intrazellulären Faserorganisation zu verstehen. Sie sind essentiell für eine gezielte Re-Epithelialisierung, aber wahrscheinlich auch für die Beendigung des Wundverschlusses mitverantwortlich. Beim Aufeinandertreffen von Keratinozyten gegenüberliegender Wundränder werden die aktivierten GTPasen vermutlich abgeschaltet, was konsekutiv zu einer Re-Organisation des Zytoskeletts führt (*JACINTO et al. 2001*). Die Fusionierung gegenüberliegender Epithelien erfolgt im Zuge des zentralen Defektverschlusses. Hierbei kommt es zur Ausbildung von Filopodien durch die randständigen Epithelzellen. Die Filopodien mit ihren Aktinfasern werden abgebaut und durch interzelluläre Adhärenzkontakte ersetzt, so dass sich die Lücke zwischen den Zellen reißverschlussartig schließt (*JACINTO et al. 2001*). Die zeitgleich zur Re-Epithelialisierung verlaufende Angiogenese ist eine komplexe Kaskade molekularer und zellulärer Ereignisse im Wundbett, mit dem Ziel die nutritive Perfusion des Wundbereichs wiederherzustellen (*Abb. 2*). Als Initiatoren sind neben einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren (z. B. vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF)) auch die Serin-Protease Thrombin bekannt, die während der Hämostase im Wundbereich als fibrinogenspaltendes Enzym fungiert, aber auch unter anderem den endothelialen VEGF-Rezeptor hochreguliert (*WERNER et al. 2003*). Als erster Schritt erfolgt die Bindung der Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren auf den Endothelzellen noch bestehender Gefäße (so genannte „Mutter“-Gefäße (*Abb. 2 A*)). Dies

führt konsekutiv zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden in den Endothelzellen. Aktivierte Endothelzellen sezernieren nun proteolytische Enzyme (z. B. GelatinaseA), welche die sie umgebende Basalmembran auflösen (Abb. 2 B). Somit ist es den Endothelzellen nun möglich, durch die aufgelockerte Basalmembran hindurch in die Wunde zu proliferieren, was auch als „*Sprouting*“ bezeichnet wird. Es ist mittlerweile bekannt, dass sich die Zellen dabei an oberflächlichen Adhäsionsmolekülen, den Integrinen ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$), orientieren. Ferner weiß man, dass die Endothelzellen an der Proliferationsfront Matrixmetalloproteasen (MMP) absondern, welche das umliegende Gewebe lysieren, um die weitere endotheliale Proliferation zu ermöglichen (Abb. 2 C). Die neugebildeten Gefäßsprosse formen tubuläre Kanäle, die durch Verbindung mit anderen Kanälen zu Gefäßschleifen (loops) verschmelzen. Daran anschließend erfolgt die Differenzierung der Schleifen in afferente (arteriell) und efferente (venös) Schenkel (Abb. 2 D) (EMING et al. 2007).

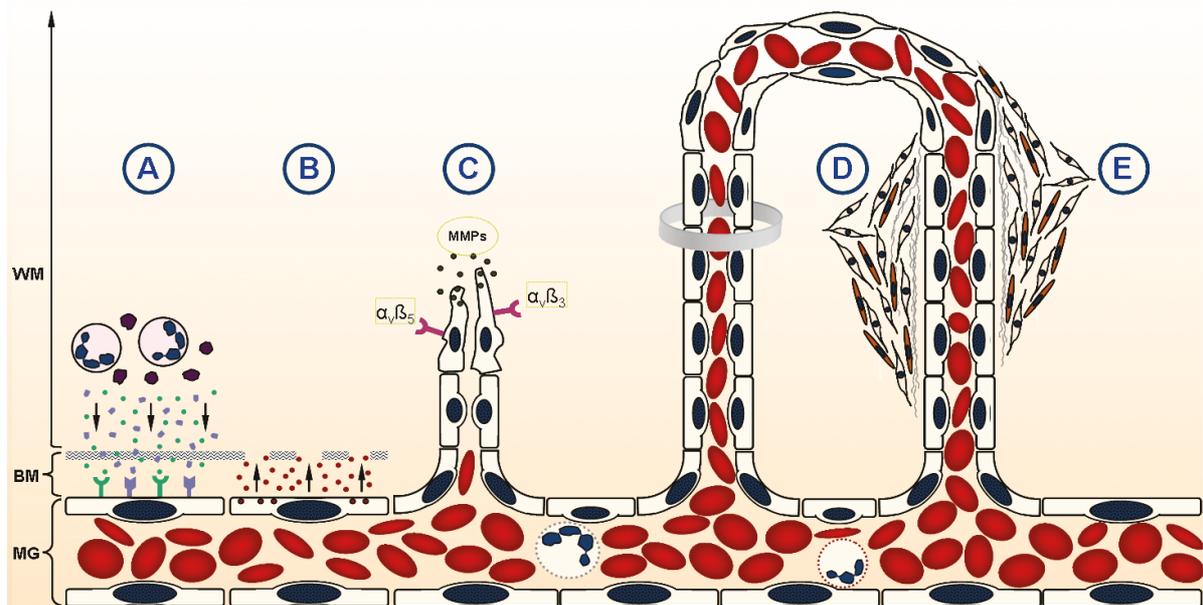


Abbildung 2: Angiogenese in der Wundheilung. Thrombozyten und Leukozyten in der Wunde sezernieren Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche die Endothelzellen bestehender „Mutter“-Gefäße (MG) aktivieren (A). Die aktivierten Endothelzellen setzen Proteasen frei, um die Basalmembran (BM) aufzulösen (B). Danach kommt es zur Proliferation der Endothelzellen, welche dann infiltrativ durch Sezernierung von Matrix-Metalloproteasen (MMP) in die Wundmatrix (WM), orientiert an Integrinen ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$), einwachsen (C). Die neu gebildeten Gefäßsprosse formen tubuläre Kanäle (Ring), die durch Verbindung mit anderen Kanälen zu Gefäßschleifen (loops) verschmelzen (D). Durch die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen, die sich an das präformierte Gefäß anlagern, erfolgt eine Gefäßmaturierung (E). (modifiziert n. The Angiogenesis Foundation 2003)

Da das nun entstandene Gefäß aus Endothelzellen besteht, muss eine Gefäßmaturierung erfolgen, um eine adäquate Wandstabilisierung zu erreichen. Dies erfolgt durch die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen, die sich von außen an die präformierten Gefäße anlagern (*Abb. 2 E*). Als finaler Schritt schließt der beginnende Blutfluss im neu gebildeten Gefäß die Angiogenese ab (*SINGER et al. 1999; LI et al. 2003; JAIN 2003; EMING et al. 2007*).

3.2.4. Reparationsphase

In der reparativen Phase (ca. 7. Tag bis Wochen) kommt es zur zunehmenden Maturierung der Kollagenfasern in Form einer Reifung von Typ III zu Typ I-Kollagen im Verhältnis 1:4 mit Herstellung der ersten Kontinuität des Bindegewebes. Die sukzessive Organisation der Kollagenfasern stellt sich in einer parallelen Ausrichtung und einer zunehmenden Faserverdickung dar. Durch die verstärkte Ausdifferenzierung von Myofibroblasten aus Gewebsfibroblasten, Expression von alpha-smooth-muscle-Actin (α -SMA) und dem zunehmenden Wasserverlust erfolgt die Wundkontraktion, welche die Wundränder einander annähert. Die Re-Epithelialisierung wird nach dem Aufeinandertreffen der Epithelzellen bzw. Keratinozyten der gegenüberliegenden Wundränder abgeschlossen (*BIRK et al. 1990; MARTIN et al. 1997; SINGER et al. 1999; PIATEK&TAUTENHAHN 2006; HINZ et al. 2007*). Die Maturierung des Granulationsgewebes erfolgt in Form der apoptotischen Reduzierung des Zellgehalts insbesondere auf Ebene der Myofibroblasten (*DESMOULIÈRE et al. 1995*). Die ferner einsetzende Gefäßregression erfolgt ebenfalls durch kontrollierten Zelltod von Endothelzellen. Es wird einerseits angenommen, dass die Regression direkte Konsequenz des apoptotischen Zelluntergangs im Gefäß darstellt. Andererseits könnte auch die Apoptose direkte Konsequenz der Regression sein, was vermutlich durch perivaskuläre Degradation der Extrazellulärmatrix mit konsekutivem Gefäßkollaps getriggert wird (*IM et al. 2006*). Wenn in der Wunde keine Reste von Haarfollikeln zu finden sind, dann werden präexistente Hautanhangsgebilde wie z. B. Talg- und Schweißdrüsen nicht neu angelegt (*MARTIN et al. 1997*). Dies liegt vermutlich nicht daran, dass die Epidermis nicht auf Haarwachstumssignale reagieren kann, sondern vielmehr keine dieser Signale von der Dermis erhält (*JAHODA 1992; MARTIN et al. 1997; SINGER et al. 1999*). Außerdem erfolgt eine Re-

Innervierung durch vom Wundrand her einwachsende terminale sensorische Nervenendigungen, stimuliert durch NGF (*WERNER et al. 2003*).

Als Ergebnis der reduzierten Zellproliferationen und der einsetzenden Gewebsregression entwickelt sich im Rahmen der primären Wundheilung eine dichte, gefäßarme Narbe auf Hautniveau (*TAUTENHAHN et al. 2007*). Damit ist die physiologische, dermale Wundheilung abgeschlossen.

3.3. Therapieoptionen zur Verbesserung der Wundheilung

Das therapeutische Management schwer heilender Wunden stellt trotz intensiver Forschungsaktivität nach wie vor einen schwierigen Aspekt der klinischen Tätigkeit dar. Aufgrund der aktuellen demografischen Entwicklung liegt die Inzidenz für chronische Wunden jenseits des 80. Lebensjahres in den westlichen Industrienationen bereits bei 4-5 %. Man schätzt, dass allein in Deutschland ca. vier Millionen Menschen an nicht heilenden, chronischen Wunden leiden (*TILGEN et al. 2007*).

Ein adäquates Wundheilungsmanagement kann supportiv in die regelrechte Heilung eines kutanen Defekts eingreifen. Dies setzt eine exakte Beurteilung und Einteilung der Wunde voraus, mit dem Ziel, ein optimales Wundmilieu für den Ablauf der Defektheilung zu schaffen. Dabei ist, neben der Klärung der Ätiologie, die initiale Korrektur etwaiger lokaler Perfusionsstörungen sowie pharmakologischer wie auch ernährungsbedingter Störungen der Wundheilung von entscheidender Bedeutung (*WICKE et al. 2007*). Zur Beurteilung der Wunde stehen einheitliche Evaluationsprinzipien, wie z. B. das TIME-Konzept (*AYELLO et al. 2004; Tab. 1*) bereit. Auf dieser Basis kann eine regelmäßige Kontrolle und Einschätzung des Wundbetts erfolgen und entsprechend die Therapie individuell gewählt werden.

Ferner ist die initiale Differenzierung zwischen akuten und chronischen Wunden therapeutisch richtungsweisend. Eine akute Wunde ist definiert als frischer, kürzlich erfolgter, dermaler Defekt, direkt vor dem Beginn der Wundheilungsphasen. Die chronische Wunde hingegen ist in einer bestimmten Phase der Wundheilung arretiert, was den Stillstand der Defektdeckung bedingt. Meist sind diese Wunden in der

Entzündungsphase mit fehlendem Progress gefangen und bedürfen einer intensiven medizinischen Betreuung.

Tabelle 1: TIME-Konzept zur Beurteilung des Wundbetts (nach AVELLO et al. 2004)

	Bedeutung	Beurteilung
T	Tissue	Liegen Nekrosen, Fibrinbeläge, Gewebedefekte vor?
I	Infection	Liegen Entzündungszeichen vor?
M	Moisture imbalance	Ist die Wunde trocken oder liegt ein Flüssigkeitsüberschuss vor? Wie ausgeprägt ist das Wundexsudat?
E	Edge of wound	Ist der Wundrand unterminiert? Kommt es bereits zur Re-Epithelialisierung?

In der Behandlung von kutanen Defekten muss weiterhin zwischen grundlegenden Wundheilungsformen unterschieden werden. So stellt die trockene Wundheilung die wohl einfachste und am wenigsten aufwändige Therapieform dar. Diese Art der Wundheilung resultiert in einer nur minimalen funktionellen und kosmetischen Einschränkung des resultierenden Gewebes. Allerdings ist dieses Prinzip lediglich für kleine und oberflächliche Hautdefekte geeignet (SVENSJÖ et al. 2000).

Bei großen vollen dermalen Wunden führt ein Dehydrieren des Defekts zur Ausbildung von Nekrosen, was im Verlauf in einem weiteren Verlust von Gewebe und unerwünschten Narbenbildungen resultiert (ZAWACKI 1974; SVENSJÖ et al. 2000). Es ist in diesem Zusammenhang bereits seit Jahren bekannt, dass z. B. eine topische Behandlung mit Hydrokolloidverbänden die Regeneration der Epidermis fördert. Die besten Ergebnisse können allerdings durch die so genannte „feuchte“ Wundheilung erzielt werden. SVENSJÖ et al. konnten nachweisen, dass das dauerhafte Feuchthalten von vollen dermalen Defekten mit NaCl zu einer deutlichen Reduktion der Nekrosen führt und die Re-Epithelialisierung gegenüber Hydrokolloidbehandlung und insbesondere der klassischen trockenen Wundheilung beschleunigt (SVENSJÖ et al. 2000).

Gleichermaßen muss im Rahmen des Wundheilungsmanagements zwischen der topischen und systemischen Applikation von Substanzen zur Förderung der Wundheilung unterschieden werden. Um im Wundgebiet wirksame Substanzkonzentrationen zu erreichen und gleichzeitig systemische Nebenwirkungen zu vermeiden, ist die topische Applikation hier Mittel der Wahl. Anwendung findet dieses Prinzip beispielsweise in der Therapie mit Gelen, welche mit Wachstumsfaktoren angereichert sind (STEED 2006; PUOLAKKAINEN *et al.* 1995; MAEDA *et al.* 2001). Ebenso können periläsionale Injektionen von Substanzen, wie z. B. *Granulozyten/Makrophagen stimulierender Faktor* (GM-CSF), die kutane Wundheilung beschleunigen (GROVES *et al.* 2000; CIANFARANI *et al.* 2006). Die systemische Applikation von Antibiotika zur Behandlung und Prävention von bakteriellen Wundinfektionen ist seit Jahren etabliert.

Zur Behandlung von schlecht heilenden Wunden stehen eine Vielzahl von unterschiedlichen Substanzen zur Verfügung. Neben traditionellen Agentien wie Honig oder bestimmten Kräutermischungen konnten durch das zunehmende Verständnis der Wundpathophysiologie moderne Therapeutika entwickelt werden (ANDERSON 2006; GUPTA *et al.* 2008) (Tab. 1). So stellen z. B. Hydrokolloide und Alginat, welche in Form von Verbänden zur Absorption von Wundexsudat Verwendung finden, eine der aktuell am häufigsten gebrauchten Adjuvantien dar (DEALEY 1993; STAIANO-COICO *et al.* 2000; BOATENG *et al.* 2008). Daneben ist die lokale Behandlung von chronischen Wundheilungsstörungen mit essentiellen Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM), wie z. B. Kollagenen und Hyaluronsäure, ebenfalls etabliert (HODDE *et al.* 2007; BOATENG *et al.* 2008).

Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang aber besonders die Therapie mit rekombinanten Wachstumsfaktoren. Durch gezielte Beeinflussung der Prozesse im Verlauf der kutanen Wundheilung konnten hiermit in den letzten Jahren entscheidende Behandlungsfortschritte besonders bei chronischen Wundheilungsstörungen erzielt werden (Tab. 2). Aktuell steht jedoch nur PDGF-BB alleinig als Wirkstoff Becaplermin (Regranex[®], Ethicon Inc.) zur Therapie des diabetogenen Ulcus cruris zur Verfügung (LI *et al.* 2008; EMING *et al.* 2007; GÜNTER&MACHENS 2012).

Tabelle 2: Übersicht über Substanzen zur Verbesserung der Wundheilung

Substanz	Funktion	Referenzen
Alginate	Absorption von Wundexsudat	<i>BOATENG et al. 2008</i> <i>THOMAS 2000</i>
Hyaluronsäure	Auffüllen von Defekten	<i>SHALOM et al. 2008</i> <i>DAVID-RAOUDI et al. 2008</i>
Hydrokolloide	Absorption von Wundexsudat	<i>THOMAS 2008</i> <i>HEYNEMAN et al. 2008</i>
med. Honig	Antimikrobielle Funktion	<i>ROBSON 2009</i> <i>MOLAN 2006</i>
r-bFGF	Stimulation der Fibroblastenproliferation und -migration	<i>XING et al. 2003</i> <i>FU et al. 1999</i>
rEGF	Re-Epithelialisierung	<i>HARDWICKE et al. 2008</i> <i>DANILENKO et al. 1995</i>
rEPO	Re-Epithelialisierung	<i>GALEANO et al. 2006</i> <i>BUEMI et al. 2004</i>
rGM-CSF	Chemotaxis von Entzündungszellen	<i>GROVES et al. 2000</i> <i>CIANFARANI et al. 2006</i>
rKGF-2	Keratinocytenproliferation und -migration	<i>SMITH 2000</i> <i>SOLER et al. 1999</i>
rPDGF-BB (Becaplermin)	Stimulation der Fibroblastenproliferation	<i>STEED 2006</i> <i>WIEMAN 1998</i>
rTGF-beta1	Stimulation der Bildung extrazellulärer Matrix	<i>PIERCE et al. 1992</i> <i>BECK et al. 1990</i>
rVEGF (Telbermin)	Stimulation der Neoangiogenese	<i>HANFT 2008</i> <i>GALIANO et al. 2004</i>

Weiterhin zählt das chirurgische Débridement, welches zur Entfernung nekrotischen Gewebes angewendet wird und für den Progress der Wundheilung unerlässlich ist, zu den Therapieoptionen von chronischen Wunden. Nekrotische Gewebeschichten stellen eine mechanische Barriere für die Fibroblastenmigration dar und erschweren zudem die Beurteilung des Wundbetts. Ferner begünstigt nekrotisches Material die Kontamination der Wunde mit Bakterien und damit sekundäre Infektionen. *STEED et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass Patienten mit chronischen Wunden von einem regelmäßigen Wunddébridement profitieren (*STEED et al. 1996*).

Darüber hinaus stellt die Modifikation des proteolytischen Gleichgewichts der Wunde einen neuen Therapieansatz dar. *GRINNELL et al.* konnten z. B. zeigen, dass die chronische Wunde eine hohe proteolytische Aktivität aufweist und es somit zur Degradation von Matrixproteinen, wie Fibronectin und Vitronectin, kommt, was den physiologischen Wundheilungsprozess entscheidend behindert (*GRINNELL et al. 1992*). *LAUER et al.* wiesen des Weiteren nach, dass *VEGF-A*, ein essentieller Mediator der Angiogenese, im Millieu chronischer Wunden ebenfalls proteolytisch degradiert wird (*LAUER et al. 2000*). Momentan ist jedoch kein Produkt zugelassen, das spezifisch die Aktivität unterschiedlicher Proteasen inhibieren könnte (*EMING et al. 2007*). *Romer et al.* konnten jedoch zeigen, dass der komplette Verlust spezifischer MMPs oder Plasminogen keinen förderlichen Effekt auf die Wundheilung hat (*ROMER et al. 1996*).

Einen weiteren Ansatz zur Heilungsverbesserung chronischer Hautdefekte stellt die Modulation der Entzündung dar. Die bereits etablierte Vakuumbehandlung zur Beseitigung überschüssiger Entzündungsmediatoren stellt hierbei eine viel versprechende Therapie dar (*ARMSTRONG et al. 2005*). Ferner zeigen Studien, dass z. B. die topische Gabe von Infliximab, einem TNF- α -Inhibitor, immunmodulatorisch in die gestörte Wundheilung eingreifen kann (*STREIT et al. 2006*).

Aufgrund der zunehmenden Entwicklungen auf dem Gebiet des Tissue Engineerings ist es heutzutage möglich, ganze Gewebeschichten der Haut zu ersetzen. Dies spielt besonders bei tiefen Verbrennungen mit völligem Verlust der Dermis, aber auch bei chronischen Wundheilungsstörungen eine entscheidende Rolle (*PHAM et al. 2007*). Durch die Kombination von synthetischen und bioaktiven Polymeren, wie z. B. Silikon- und Nylonmatrizes mit Kollagen (Biobrane™), können heute wirksame Hautersatzmittel angeboten werden (*ANDREADIS et al. 2006; BOATENG et al. 2008*).

Ferner ist es möglich, in diese Matrices verschiedenste Hautzellen, wie z. B. Fibroblasten (Dermagraft®) oder Keratinozyten (Epicel®), einzubetten und damit die Regeneration tiefer kutaner Defekte zu beschleunigen (*HORCH et al. 2005*). Diese extrazellulären Matrices stellen darüber hinaus ein ideales strukturelles Gerüst für die Einbettung von Wachstumsfaktoren dar, um einerseits die Stabilität dieser Faktoren und andererseits ihre Verfügbarkeit während der Defektheilung zu modulieren (*HUBBELL et al. 2006; LUTOLF et al. 2005; WHITAKER et al. 2001*).

Die Behandlung chronischer Wunden mit lebenden Zellen ist seit mehr als 20 Jahren etabliert. Autologe Keratinozyten werden hierfür in einer Kulturschale angezchtet und anschließend mit einer Gaze aufgenommen, um zusammen einen zellulären Wundverband zu erhalten. Durch neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der Stammzellforschung ist es möglich, dieser alten Therapieform eine neue revolutionäre Richtung zu geben. So konnten z. B. *LEE et al.* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass eine Therapie mit stromalen Knochenmarkzellen gegenüber der mit Fibroblasten zu einer höheren Kollagenkonzentration in der Wunde und einer deutlich schnelleren Epithelialisierung führt (*LEE et al. 2007*). Auch mesenchymale Stammzellen (MSC), welche sich zu Fett-, Knochen-, Muskel- und Knorpelgewebe sowie Endothel differenzieren können, wurden auf ihr Potential zur Verbesserung der Wundheilung untersucht. *FALANGA et al.* zeigten, dass die Applikation kultivierter MSC aus dem Knochenmark (KM) auf kutane Wunden einen förderlichen Einfluss auf deren Heilung besitzt (*FALANGA et al. 2007*).

Die Möglichkeiten der Gentherapie zur Behandlung von Wunden wurden in den letzten 20 Jahren in vielen Studien untersucht. Durch direkten Gentransfer in die Wunde bzw. indirekten Gentransfer über kultivierte Zellen sowie virale als auch nonvirale Vektoren wurde evaluiert, inwieweit sich die Gentherapie zur Verbesserung der kutanen Wundheilung eignet (*JENSEN 2007*). So konnten *EMING et al.* 1995 zeigen, dass topisch applizierte Keratinozyten, die mit dem Gen für humanen PDGF A retroviral transfiziert wurden, die dermale Wundheilung *in vivo* signifikant verbessern können (*EMING et al. 1995*). Dieses Prinzip der endogenen Erhöhung bestimmter Zytokinkonzentrationen direkt in der Wunde wurde auch von *SUN et al.* aufgegriffen und auf chronische Wunden angewendet. Durch die Applikation von adenoviralem FGF (aFGF) bzw. einem aFGF-enthaltenden Plasmid direkt auf die Wunde konnte die Expression von FGF gesteigert und dadurch eine Beschleunigung des kutanen Defektverschlusses *in vivo* erreicht werden (*SUN et al. 1997*). Darauf folgende Studien

ergaben neue therapeutische Ansätze, die vor allem die Überexpression von z. B. VEGF (SAARISTO *et al.* 2006), KGF-1 (LIN *et al.* 2006), IGF-1 (JESCHKE *et al.* 2004) und SDF-1 α (BADILLO *et al.* 2007) in der Wunde nutzten, um die Heilung zu unterstützen.

3.4. Erythropoietin

Die Charakterisierung von EPO nahm mit dem beginnenden 20. Jahrhundert seinen Anfang. CARNOT und DEFLANDRE stellten 1906 erstmals die Hypothese von einem humoralen Faktor auf, welcher die Blutbildung regulieren sollte. Zu diesem Schluss kamen sie, nachdem sie in ihren Experimenten nachweisen konnten, dass Serum von anämischen Tieren in normalen Tieren die Erythrozytenzahl erhöhen konnte. Dieser hämatopoetische Effekt konnte bei vorheriger Inaktivierung des transfundierten Serums bei 56°C nicht beobachtet werden. Somit musste im Serum ein Faktor enthalten sein, der die Erythropoese steuern konnte (CARNOT *et al.* 1906). Weitere Experimente von SANDOR konnten 1932 zeigen, dass dieser Faktor auch im Serum von Tieren zu finden war, die unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden (SANDOR 1932). BONSDORFF und JALAVISTO gaben diesem Faktor dann 1948 schließlich den Namen Erythropoietin (BONSDORFF *et al.* 1948). Als eigentlicher Entdecker gilt jedoch ALLAN JACOB ERSLEV, der die Existenz von EPO in seinen Experimenten erstmals zweifelsfrei nachweisen konnte (ERSLAV *et al.* 1953). GOLDWASSER und JACOBSON konnten dann bereits 1957 indirekt nachweisen, dass EPO in der Niere synthetisiert wird (JACOBSON *et al.* 1957). Die erste Isolierung von EPO aus dem Urin erfolgte schließlich durch MIYAKE *et al.* 1977. Erst 1988 konnten KOURY *et al.* zeigen, dass die peritubulären Interstitialzellen der Hauptsyntheseort für EPO in der Niere sind (KOURY *et al.* 1988). Dass die Leber einen sekundären Syntheseort für EPO darstellt, wurde 1991 ebenfalls durch KOURY *et al.* entdeckt (KOURY *et al.* 1991). Aktuelle Untersuchungen von Bodó *et al.* konnten zusätzlich humane Haarfollikel als extrarenale Quelle von EPO identifizieren (BODÓ *et al.* 2007).

Anfang der 1980er Jahre gelang es schließlich, das humane EPO-Gen zu identifizieren und eine erfolgreiche Klonierung und Expression von rekombinantem EPO (rhEPO) in *Escherichia coli* durchzuführen (LEE-HUANG 1984; LIN *et al.* 1985). JACOBS *et al.* erreichten es dann 1985 auch in Säugetierzellen rhEPO zu exprimieren, was den Weg zur großtechnischen Herstellung von rhEPO ebnete und die The-

rapie von Anämien aufgrund chronischer Niereninsuffizienz, Tumorleiden oder schwerer Infektionen revolutionieren sollte (JACOBS *et al.* 1985; Adamson *et al.* 1990; Jelkmann *et al.* 2000).

Mittlerweile sind fünf verschiedene rekombinante Erythropoietine bekannt: Epoetin- α , - β , - δ , - ω und Darbepoietin- α . All diese EPO-Analoga haben eine identische Aminosäuresequenz, unterscheiden sich jedoch in ihren Zuckerseitenketten, was durch den Produktionsprozess bedingt wird. Darüber hinaus besitzt Darbepoietin- α zwei zusätzliche Seitenketten, die eine höhere pharmakologische Halbwertszeit und Wirksamkeit bewirken (JOYEUX-FAURE 2007).

EPO ist ein Glykoproteinormon, mit einer Sequenz aus 165 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 30,4 kDa. Es besitzt vier Zuckerseitenketten, wovon drei N-glykosidisch und eine O-glykosidisch assoziiert sind. Diese glykosylierten Ketten sind für die Produktion und Sekretion des reifen EPO wie auch für seine biologische Aktivität verantwortlich. Darüber hinaus benötigt EPO für seine biologische Aktivität zwei Disulfidbrückenbindungen im Molekül (CHONG *et al.* 2002). Neben den renalen, peritubulären Interstitialzellen und den Hepatozyten wurden bislang viele weitere Syntheseorte von EPO im Körper beschrieben. Besonders periphere Endothelzellen, glatte Myozyten, Kardiomyozyten und humane Haarfollikel sind als sekundäre Produktionsorte beschrieben (MAIESE *et al.* 2005; JOYEUX-FAURE 2007; BODÓ *et al.* 2007). Hauptaufgabe von EPO ist die Regulierung der Erythropoese durch Inhibition der Apoptose von erythroiden Progenitorzellen. EPO wird heute als rekombinantes Analogon Epoetin- α vor allem zur Therapie der renalen Anämie angewendet (JELKMANN 2004).

Die physiologischen Blutspiegel von EPO liegen zwischen 6-32 mU/ml und die Halbwertszeit beträgt circa 2-13 h (FOLEY 2008). Es gibt keinen Unterschied der EPO-Spiegel bezüglich des Geschlechts und die physiologischen Spiegel bei Kindern entsprechen den Werten bei Erwachsenen. Eine Änderung der EPO-Spiegel im Alter tritt nicht ein. Der Verlauf der Serumkonzentration von EPO über den Tag bei normal trainierten Menschen ist relativ konstant mit einem leichten Anstieg um Mitternacht und einem Tief in den frühen Morgenstunden (ADAMSON 1996). Bei Leistungssportlern, wie Marathonläufern, konnte hingegen ein Anstieg der EPO-Konzentration im Blut direkt nach Belastung und noch 31 h später nachgewiesen werden (SCHWANDT 1991).

Produktion und Sekretion von EPO und seinem Rezeptor (EPO-R) werden durch die Sauerstoffversorgung des jeweiligen Gewebes genau reguliert. *In vitro* und *in vivo* Studien konnten zeigen, dass sowohl Anämie als auch Hypoxie die stärksten Stimulatoren der EPO-Synthese darstellen. Die Synthese von EPO findet beim Erwachsenen vor allem in den interstitiellen Zellen des peritubulären Nierenrindengewebes als auch zum geringen Teil in der Leber und dem Gehirn statt (JELKMANN 1992; FANDREY 2004). Im Rahmen der Fetogenese wird Erythropoietin hauptsächlich in der Leber gebildet (MAXWELL *et al.* 1997). Getriggert durch eine defizitäre Gewebeoxygenierung kommt es zu einer hypoxieabhängigen Gentranskription von EPO und EPO-R durch die Aktivierung des hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) Signalweges (MAIESE *et al.* 2005). Daneben wurden bereits andere Aktivatoren, wie z. B. tumor necrosis factor- α (TNF- α) oder Interleukin-6 (IL-6), beschrieben, die zu einer Erhöhung der EPO und EPO-R Konzentration führen können (MAIESE *et al.* 2005). EPO wird daraufhin in den Blutkreislauf sezerniert und gelangt ins Knochenmark, wo sich erythroide Progenitorzellen mit EPO-R befinden. Die EPO-EPO-R-Bindung löst eine Konformationsänderung des EPO-R aus, die die beiden assoziierten Janus-Kinasen 2 (JAK2) einander annähert und sie sich damit durch Transphosphorylierung aktivieren (Abb. 3 A). Nacheinander phosphorylieren die JAK2 Moleküle acht Tyrosinreste an der zytoplasmatischen Domäne des EPO-R, die dann als Bindungsstellen für verschiedene intrazelluläre Signalproteine fungieren. Diese Proteine werden stufenweise an Tyrosinresten phosphoryliert und damit aktiviert. Eines dieser Signalproteine ist der so genannte signal transducer and activator of transcription-5 (STAT-5) (Abb. 3 B). Aktiviert durch JAK2-Phosphorylierung dissoziiert STAT-5 vom EPO-R ab, dimerisiert, und wird dann in den Zellkern transloziert (Abb. 3 C). Die Bindung des STAT-5-Dimers an spezifische DNA-Sequenzen in der Promotorregion aktivierbarer Gene führt daraufhin sukzessive zur Transkription (Abb. 3 D). So wird unter Einfluss von EPO z. B. der Apoptoseinhibitor Bcl-xL (basal cell lymphoma extra large) vermehrt exprimiert, der für das Überleben der erythroiden Progenitorzellen in ihrer terminalen Maturierungsphase essentiell ist (WEISS 2003).

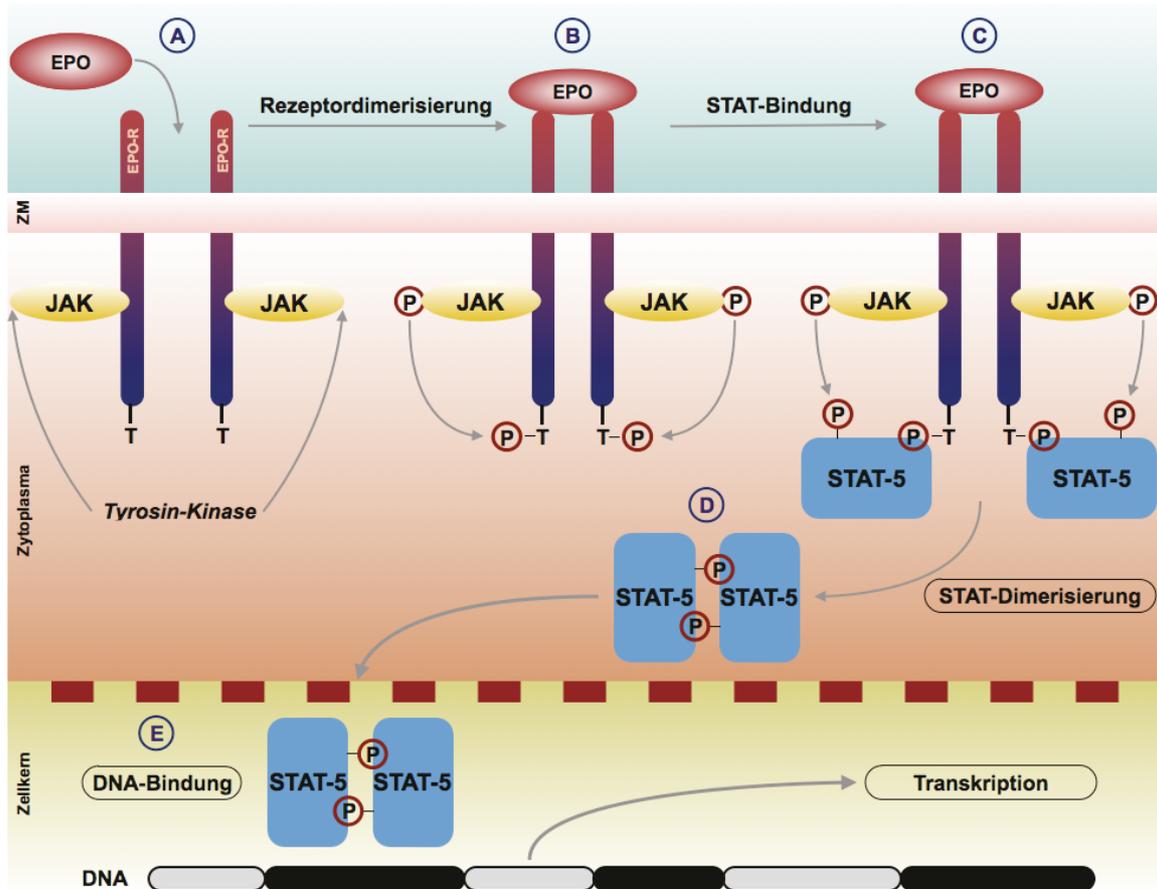


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des JAK2/STAT-5 Signalweges nach EPO-EPO-R Bindung. (A) Nach EPO-EPO-R Bindung kommt es zur Dimerisierung des EPOR und zur Transphosphorylierung der assoziierten JAK2-Moleküle. (B) Anschließend erfolgt die Phosphorylierung der Tyrosinreste an der zytosomatischen Domäne des EPO-R, welche daraufhin als Bindungsstellen für STAT-5 dienen. (C) Aktiviert durch JAK2-Phosphorylierung dissoziiert STAT-5 vom EPO-R ab und dimerisiert. (d) Nach Translokation in den Zellkern aktiviert das STAT-5-Dimer durch Bindung an spezifische Promotorenregionen die Gentranskription (E). (modifiziert n. www.lifetechnologies.com)

In den letzten Jahren konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass EPO und EPO-R in die intrazellulären Signalkaskaden einer Reihe von nicht-hämatopoetischen Organen, wie z. B. dem Gehirn (RODRIGUEZ *et al.* 2010; LI *et al.* 2005; MASUDA *et al.* 1993&1994; MORISHITA *et al.* 1997; MARTI *et al.* 1996; BRINES *et al.* 2005), dem kardiovaskulären System (BELESLIN-COKIC *et al.* 2004; CAI *et al.* 2003; TRAMONTANO *et al.* 2003; MORAKKABATI *et al.* 1996; AMMARGUELLAT *et al.* 1996; ANAGNOSTOU *et al.* 1994; HEIDENREICH *et al.* 1991), dem respiratorischen System (ZHANG *et al.* 2008), dem gastrointestinalen System (SERENO *et al.* 2006; MCPHERSON *et al.* 2007; JUUL *et al.* 2001), dem endokrinen System (OZTÜRK *et al.* 2007; FENJVES *et al.* 2003) sowie den weiblichen (MASUDA *et al.* 2000; YASUDA *et al.* 1998&2001) als auch den männlichen Reproduktionsorganen (MAGNANTI *et al.* 2008;

YAMAZAKI *et al.* 2004; KOBAYASHI *et al.* 2002) eingebunden sind. Gleichzeitig zeigte sich, dass EPO neben seinen hämatopoetischen Merkmalen z. B. auch neuroprotektive (BRINES *et al.* 2000), kardioprotektive (PARSA *et al.* 2003; VILARINHO *et al.* 2012; TENG *et al.* 2011), nephroprotektive (RJIBA-TOUATI *et al.* 2011) und hepatoprotektive (LE MINH *et al.* 2007; SHIMODA *et al.* 2009) Eigenschaften besitzt. Bei genauerer Analyse dieser Effekte offenbarte sich in zahlreichen Experimenten ein pleiotropes Wirkprofil von EPO mit vor allem anti-inflammatorischer und antioxidativer Wirkung, welches z. B. den Ischämie-Reperfusionsschaden am Herzen, der Niere, der Leber und des Darms limitieren konnte (ABDELRAHMAN *et al.* 2004; AKISU *et al.* 2001; BULLARD *et al.* 2005; CALVILLO *et al.* 2003; PATEL *et al.* 2004; SOLAROGLU *et al.* 2004; VESEY *et al.* 2004; SHARPLES *et al.* 2004&2005). Es konnte nachgewiesen werden, dass diese durch EPO vermittelten zytoprotektiven Effekte auf eine Reduktion von Sauerstoffradikalen, Reduktion von Lipidperoxidation, Reduktion von interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM), Reduktion leukozytärer Infiltration in das Gewebe als auch durch eine Reduktion der trauma-assoziierten Freisetzung von TNF- α , IL-1 β und IL-6 zurückzuführen sind (AKISU *et al.* 2001; Solaroglu *et al.* 2004; Bany-Mohammed *et al.* 1996; LIU *et al.* 2006; SUN *et al.* 2005).

Ebenfalls wurden die protektiven Eigenschaften von EPO in Zusammenhang mit anti-apoptotischen Mechanismen gebracht (FISHBANE *et al.* 2005; CHONG *et al.* 2003). Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass EPO sowohl die Proliferation und Migration von reifen Endothelzellen als auch die eines pro-angiogenen Phänotyps stimuliert (RIBATTI *et al.* 1999). Verschiedene Studien demonstrierten zudem, dass EPO eine vergleichbare pro-angiogene Wirkung wie VEGF besitzt (JAQUET *et al.* 2002). Dieser Effekt kann durch die EPO vermittelte Rekrutierung von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen verstärkt werden, was schließlich in den Prozess der Angiogenese resultiert (BAHLMANN *et al.* 2004; HEESCHEN *et al.* 2003). Aktuell wird von einigen Forschern angenommen, dass die nicht-hämatopoetischen Effekte von EPO durch einen heterotrimären Rezeptor, bestehend aus einem EPO-R Molekül in Kombination mit einem Dimer des Zytokin- β -Rezeptors, hervorgerufen werden. Diese Hypothese basiert auf einer *in vivo* Studie, in der hämatopoetisch nicht wirksame EPO-Derivate eine Gewebsschutz bewirkten (LEIST *et al.* 2004).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die endogene Synthese sowie exogene Applikation von EPO als auch die Expression von EPO-R in nicht-hämatopoetischen Zellen im direkten Zusammenhang mit einer verbesserten Gewe-

be- und Organfunktion stehen. Im Moment ist davon auszugehen, dass EPO vor allem im Rahmen der Wundheilung eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen in einer synchronisierenden und koordinierenden Weise beeinflusst, mit dem Ziel eine schnellere und gerichtete Gewebsprotektion und -regeneration zu bewirken. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind allerdings bis heute noch nicht ausreichend verstanden und bedürfen deshalb weiterer experimenteller und klinischer Studien.

4. ZIELSETZUNG UND AUFGABEN

Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, die Effekte von EPO auf die physiologische Hautregeneration in unterschiedlichen Dosierungen zu analysieren. Wie in aktuellen Untersuchungen gezeigt werden konnte, zeichnet sich EPO durch ein pleiotropes Wirkprofil aus, was neben der bekannten hämato-poetischen Funktion auch vorteilhafte Effekte auf die Gewebsregeneration haben könnte (JELKMANN *et. al* 2004). Da gerade die Entwicklung neuer innovativer Therapeutika und Wundheilungsstrategien angesichts der aktuellen demografischen Entwicklung einen essentiellen Stellenwert einnimmt und die Rolle von EPO im Prozess der Wundheilung noch nicht vollständig geklärt ist, stellten sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragen:

1. Inwieweit beeinflusst EPO die dermale Re-Epithelialisierung als eine der zentralen Funktionen der Wundheilung?
2. Gibt es dosisabhängige Effekte von EPO auf die mikrovaskuläre Architektur der regenerierenden Hautwunde?
3. Vermag EPO das Proliferations- und Migationsverhalten von Fibroblasten und Keratinozyten *in vitro* zu modulieren?
4. Zeigen sich unter Einfluss von EPO strukturelle und zelluläre Veränderungen im Aufbau des Granulationsgewebes der regenerierenden Wunde?
5. Hat EPO Einfluss auf apoptotische Vorgänge des zellulären Remodeling im Granulationsgewebe der heilenden Hautwunde?

5. MATERIAL UND METHODIK

5.1. Versuchstiere

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden haarlose SKH-1-*hr* Mäuse aus eigener Inzucht (Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock, Rostock) verwendet (*Abb. 4*). Bei diesen Tieren handelt es sich um euthyme und immunkompetente Mäuse, die bei homozygoter Ausprägung einen Defekt auf Chromosom 14 (*hr/hr*) besitzen, der dazu führt, dass die Mäuse am 10. Lebenstag ihr bis zu diesem Zeitpunkt normales Haarkleid von cranial nach kaudal verlieren. Die Haarfollikel bleiben zwar erhalten, sind jedoch überwiegend leer (*BROOKE 1926; PANTELEYEV et al. 1998*). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit SKH-1-*hr* Mäuse zur intravitalmikroskopischen Evaluierung der Wundheilung verwendet.

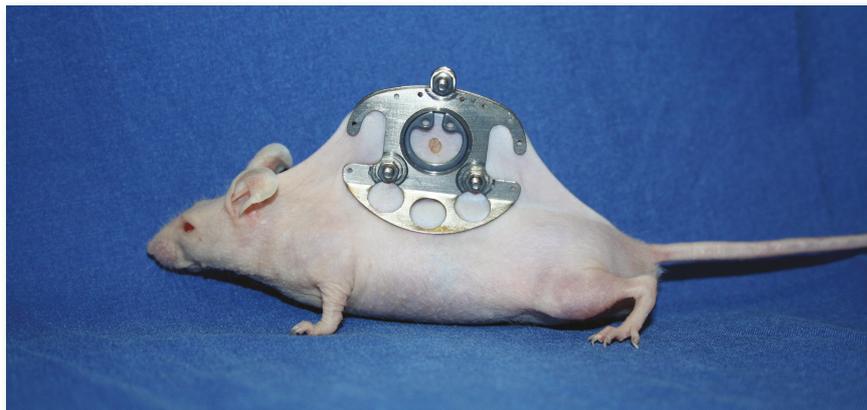


Abbildung 4: Darstellung einer männlichen, haarlosen, homozygoten SKH-1-*hr* Maus nach erfolgreicher Implantation einer Rückenhautkammer und Wundsetzung.

Für die Versuche wurden 12-16 Wochen alte, männliche, homozygote SKH-1-*hr* Mäuse ($n=47$) mit einem Körpergewicht zwischen 25-35 g verwendet. Alle Tiere wurden in Einzelkäfigen (Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland) bei einem zwölfstündigen Tag- und Nachtrhythmus, einer Umgebungstemperatur von 24 °C und einer Luftfeuchtigkeit von ~50 % untergebracht, mit Zugang zu Standardfutter (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Die Versuche an den Mäusen erfolgten in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzrichtlinien für Labortiere, nach Genehmigung des Antrages durch das Landesamt für Landwirt-

schaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (AZ: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-001/08).

5.2. Experimentelles Modell

5.2.1. Wundheilungsmodell in der Rückenhautkammer der Maus

5.2.1.1. Chirurgische Präparation der Rückenhautkammer und der Wunde

Um die dermale Wundheilung *in vivo* evaluieren zu können, wurde den Mäusen eine Rückenhautkammer (Irola-Industriekomponenten, Schonach, Deutschland) implantiert. Diese Rückenhautkammer besteht aus zwei symmetrischen Titanrahmen, einem wechselbaren Deckgläschen und einem Sprengring, welche zusammen ein Gewicht von ~4,0 g haben. Vor der Implantation wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von Ketaminhydrochlorid (90 mg/kg KG; Ketamin 10 %, Bela-Pharm, Vechta Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg KG; Rompun 2 %, Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Durch Verwendung eines beheizten Präparationstisches (K. Effenberger, Medizinisch-Technischer Gerätebau, Pfaffing, Deutschland) konnte die Aufrechterhaltung der physiologischen Körpertemperatur von 37,5 °C gewährleistet werden. Nach Desinfektion (Betaisodona[®], Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland) wurde unter Gegenlicht durch vorsichtige bimanuelle Extension eine Hautdoppelschicht in der dorsalen Medianlinie der Maus entwickelt und mittels zweier temporärer Fäden an einem Fixierungsbügel befestigt. Anschließend wurde die Rückseite der Titankammer an der Hautfalte durch vier Nähte (Prolene 4-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) befestigt und die zwei Fixierschrauben an der Kammerbasis präpariert (LEHR *et al.* 1993). Unter Durchlicht wurde dann im Zentrum der Kammer eine kreisrunde Fläche mit ca. 2,5 mm Durchmesser markiert und diese anschließend unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Leica M651 MSD, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) mikrochirurgisch bis auf den Panniculus carnosus der Gegenseite exzidiert. An der nicht verwundeten Kammergegenseite blieb die Haut mit quer-gestreifter Skelettmuskulatur vollständig erhalten (Abb. 5). Damit wurde eine 3-6 mm² große volle dermale Wunde geschaffen.

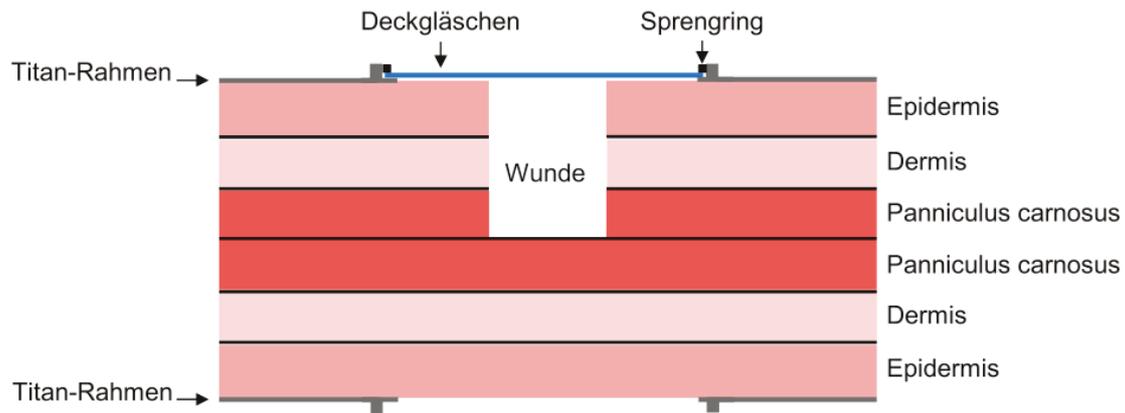


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Querschnitts einer vollen dermalen Wunde nach mikrochirurgischer Präparation unter Intakthaltung der Kammergegensseite.

Unter ständigem Feuchthalten der Wunde mittels physiologischer Kochsalzlösung (Ecotainer® NaCl 0,9%; Braun, Melsungen Deutschland) wurde dann die Vorderseite der Kammer ohne Deckglaschen und Sprengring aufgesetzt und mit drei Schrauben befestigt. Daraufhin wurde die Kammer unter Vermeidung von Luftschlüssen mit einem Deckglaschen bedeckt und anschließend durch einen Sprengring sicher fixiert. Abschließend wurden die beiden temporären Haltefäden entfernt und die Wunde mittels eines Stereomikroskops, welches mit einem Videosystem (S-VHS ET, JVC, Tokyo, Japan) gekoppelt war, zur späteren planimetrischen Auswertung auf Video aufgenommen (Abb. 6). Die Mäuse konnten sich anschließend drei Tage in Einzelkäfigen von Narkose und Operation erholen.



Abbildung 6: Repräsentative stereomikroskopische Bilder einer implantierten Rückenhautkammer (A) und der präparierten Wunde (B).

5.3. Intravitale Fluoreszenz- und Stereomikroskopie

Im Untersuchungszeitraum wurden die Versuchstiere jeweils an Tag 3, 6, 9 und 12 narkotisiert und auf einem beheizten Präparationstisch gelagert. Daraufhin erfolgte die retrobulbäre Injektion von 0,1 ml, 2 % Fluoresceinisothiocyanat-markiertem Dextran (FITC-Dextran; Sigma-Chemical, Deisenhofen, Deutschland; MG 150 kDa) zur Darstellung der Architektur des perfundierten Gefäßnetzwerkes. FITC-Dextran wurde als Plasmamarker verwendet, da es wasserlöslich ist und zudem nur sehr geringe Interaktionen mit Organismus-spezifischen Proteinen eingeht (SCHRÖDER *et al.* 1976). Abschließend wurde die Maus zur intravital-mikroskopischen Untersuchung auf einer speziell angefertigten Plexiglasplatte gelagert und fixiert.

Mittels hochauflösender, intravitale Fluoreszenzmikroskopie (Axiotech vario, Zeiss, Jena, Deutschland) erfolgte die Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter unter Verwendung eines Objektivs (20x/0,5 W; Achroplan[®], Zeiss) an den Tagen 3, 6, 9 und 12 *post vulnerationem*. Die Wunde wurde hierfür in drei Gefäßbereiche eingeteilt (Abb. 7). Der innere Bereich beinhaltete die zirkulären Gefäße am vordersten Wundrand (Abb. 7 A) und der mittlere Bereich die radiären Gefäße im bereits reepithelialisierten Wundareal (Abb. 7 A). Der äußere Bereich wurde durch Gefäße, die in einer Entfernung von mindestens 4,0 mm die normale dermale Mikrozirkulation repräsentierten, gebildet (Abb. 7 A). Hierbei wurden für jeden Bereich bis zu vier Gesichtsfelder für ca. 30 s in 20facher Vergrößerung aufgenommen (SORG *et al.* 2007).

Alle beobachteten Mikroskopbilder wurden durch ein Video-System (S-VHS Panasonic AG 7350-E, Matsushita, Tokio, Japan) für die offline Evaluierung durch eine CCD-Kamera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) aufgenommen und auf einem Bildschirm mit Zwischenschaltung eines Zeitgenerators (VTG-33, For-A, Japan) dargestellt. Sämtliche Analysen mikrozirkulatorischer Parameter sowie die Planimetrie der Wunde wurden offline, d.h. nach Beendigung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie durch Wiedergabe des Videobandes mit dem computer-assistierten Bildverarbeitungssystem CapImage (Version, 7.4, Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Hierdurch konnte der Untersuchungszeitraum und die Belastung für das Versuchstier auf ein Minimum reduziert werden.

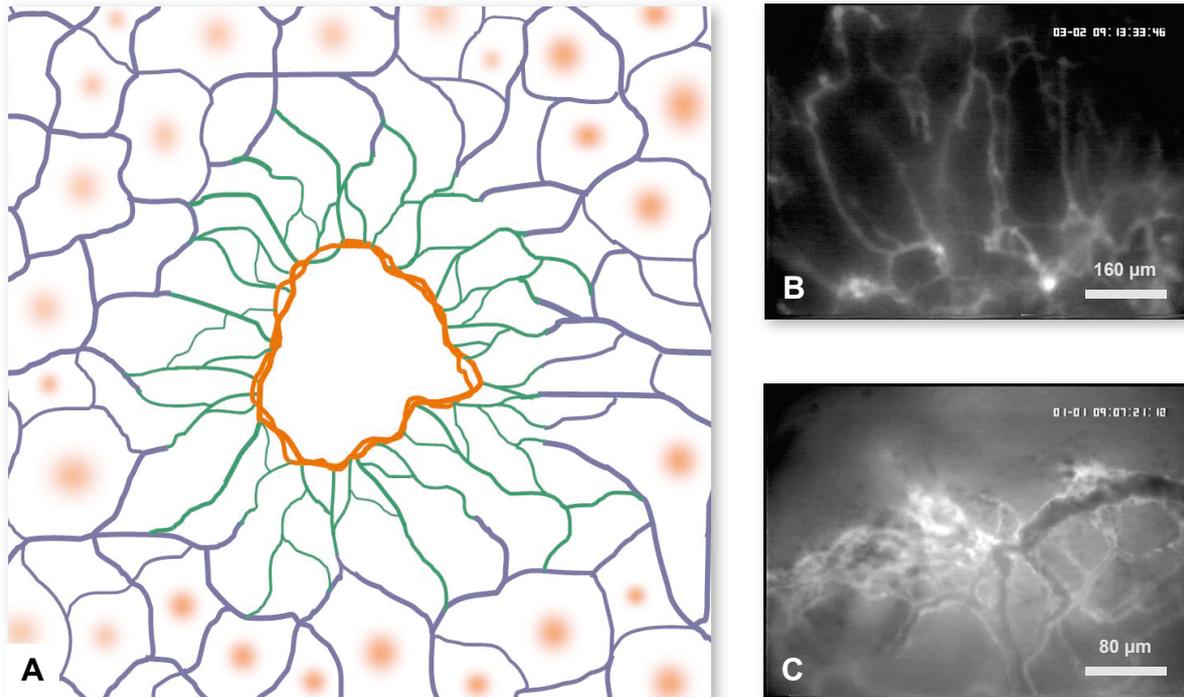


Abbildung 7: Schematische und repräsentative intravitalmikroskopische Darstellung neugebildeter Gefäßnetzwerke einer regenerierenden Hautwunde. In (A) ist die typische Formation der Neovaskularisation bestehend aus zirkulär verlaufenden Gefäßen am Wundrand (orange), radiärer Gefäßnetzwerke (grün) sowie der nicht-traumatisierten (physiologischen) und netzartig um die Haarfollikel verlaufenden Mikrozirkulation zu erkennen. Die Abbildung (B) zeigt die intravitalmikroskopische Darstellung radiärer Gefäße nach Applikation von 2%igem FITC-Dextran an Tag 6 nach Wundsetzung, welche in die zirkulär verlaufenden, unregelmäßig und dilatierten Gefäße des Wundrandes (C) einmünden.

Die Epi-Illuminations-Vorrichtung beinhaltete eine 100 W Quecksilberlampe mit einem Blaufilter (Exzitation: Wellenlänge = 450-490 nm; Emission: Wellenlänge >515 nm). Während des chirurgischen Eingriffs sowie der mikrozirkulatorischen Messungen waren die Tiere spontanatmend. Nach dem Versuch erwachten die Tiere in Einzelkäfigen aus der Narkose und hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Nach der intravitalmikroskopischen Untersuchung an Tag 12 und der Blutentnahme wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkose eingeschläfert.

5.3.1. Epithelialisierung

Zur Erfassung der Epithelialisierung wurden die Wunden an den Tagen 0, 3, 6, 9 und 12 nach Wundsetzung mittels eines Stereomikroskops, welches mit einem Videosystem gekoppelt war, in 40facher Vergrößerung für ca. 20 s auf Videoband aufgenommen. Die anschließende Auswertung erfolgte offline durch Wiedergabe des Videobandes mittels eines computerassistierten Bildverarbeitungssystems

(CapImage). Hierbei wurde im Standbild die einwandernde Epithelfront der regenerierenden Wunde an den jeweiligen Untersuchungstagen manuell nachgezeichnet und anschließend die eingeschlossene Fläche vom Programm berechnet. Diese Fläche wurde in prozentualer Relation zur Wundfläche an Tag 0 des jeweiligen Tieres gesetzt, um das Voranschreiten der Re-Epithelialisierung anhand der noch nicht mit Epithel bedeckten Wundfläche zu evaluieren. Der Wundverschluss wurde als abgeschlossen angesehen, wenn 100% der initialen Wundfläche mit Epithel bedeckt waren.

Aus den errechneten Einzelwerten wurde der Mittelwert gebildet und die Re-Epithelialisierung für die jeweilige Versuchsgruppe und Untersuchungstag in Prozent der initialen Wundfläche angegeben.

5.3.2. Mikrozirkulatorische Parameter

5.3.2.1. Gefäßdurchmesser

Die Durchmesser der beobachteten Gefäße wurden computerassistent (CapImage) im Videostandbild durch manuelle Verbindung zweier Punkte am Gefäßrand, die senkrecht zum Gefäßverlauf liegen, quantifiziert. Hierfür wurden an den Tagen 3, 6, 9 und 12 nach Wundsetzung anhand jedes Tieres bis zu fünf Gefäße sowohl aus dem zirkulären, radiären wie auch distalen Bereich des Gefäßnetzwerkes der regenerierenden Wunde untersucht. Die Quantifizierung der Gefäßdurchmesser im Verlauf des Experimentalzeitraums gestattete Aussagen über mögliche Maturierungsprozesse bzw. rheologische Effekte auf die Wundmikrozirkulation. Bei dieser Methode waren die Gefäßgrenzen eindeutig bestimmbar, da der Plasmamarker FITC-Dextran in Epi-Illumination auch den Erythrozyten-freien Plasmasaum darstellt. Aus den Einzeldurchmessern aller untersuchten Gefäße des jeweiligen Gefäßbereiches wurde innerhalb der zugehörigen Gruppe und des jeweiligen Zeitpunktes der Mittelwert gebildet und in μm angegeben.

5.3.2.2. Blutzellfließgeschwindigkeit

Die Messung der Blutzellfließgeschwindigkeit an den Tagen 3, 6, 9 und 12 wurde in den Gefäßen durchgeführt, an denen zuvor bereits die Bestimmung des jeweiligen Durchmessers erfolgte. Hierfür wurde die computerassistent Line-Shift-

Diagramm-Methode angewendet (KLYSCZ *et al.* 1997). Entlang der Flussrichtung des zu messenden Gefäßes wird hierzu eine zentral im Lumen gelegene Messlinie definiert (Abb. 8 A) und anschließend das Videoband für ca. 12 s in Echtzeit abgespielt. Währenddessen wird fortlaufend für jedes Halbbild entlang der Messlinie das Grauwertprofil erstellt und in einem Bildspeicher aufgezeichnet. Aus den aneinander gereihten Grauwertprofilen erzeugt das Programm ein Line-Shift-Diagramm, in dem helle bzw. dunkle schräge Linien zu erkennen sind, wenn sich während der Messung Plasmalücken bzw. Erythrozyten entlang der Messlinie bewegt haben (Abb. 8 B). Aus der Steigung dieser Linien kann anschließend die Blutzellfließgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ errechnet werden (KLYSCZ *et al.* 1997). Aus den erhaltenen Einzelwerten wurde der Mittelwert gebildet und für den jeweiligen Versuchszeitpunkt und Gefäßbereich in $\mu\text{m/s}$ angegeben.

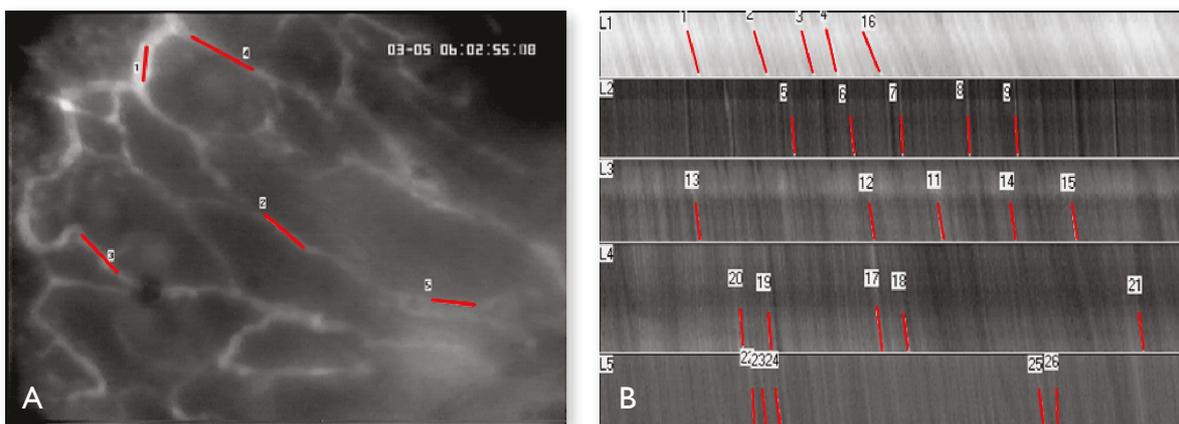


Abbildung 8: Intravitalmikroskopische Aufnahme radiärer Gefäße (A) mit fünf definierten Messlinien (1-5) zur Erfassung der Blutzellfließgeschwindigkeit. Nach Abspielen des Videobandes für etwa 12 s entsteht das Line-Shift-Diagramm (B) für jede der einzelnen Messlinien (L1-5), anhand derer die Geschwindigkeit des Blutflusses ($\mu\text{m/s}$) aus der Steigung (rote Linien) der aneinander gereihten Grauwertprofile errechnet werden kann.

5.3.2.3. Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte (FCD) wird definiert als die Länge aller perfundierten Kapillaren pro Untersuchungsfläche bzw. festgelegtem Beobachtungsbereich und gilt als Maß für die nutritive Gewebepfusion (NOLTE *et al.* 1995).

Zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte wurden mittels Caplimage in einer standardisierten Messfläche alle perfundierten Kapillaren manuell nachgezeichnet

und anschließend der Quotient aus der Länge aller perfundierten Gefäße und der Standardfläche berechnet. An den Tagen 3, 6, 9 und 12 nach Wundsetzung wurden so pro Tier aus jedem Gefäßbereich bis zu vier Gesichtsfelder im Videostandbild analysiert. Aus den erhaltenen Einzelwerten wurde der Mittelwert gebildet und für den jeweiligen Versuchszeitpunkt und Gefäßbereich in cm/cm^2 angegeben.

5.4. *In vitro- / ex-vivo* Analysen

5.4.1. WST-1 Assay

Um den Einfluss von EPO auf die Zellproliferation zu quantifizieren, wurde der Water-Soluble-Tetrazolium (WST)-1 Assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Dieser Assay ist ein kolorimetrisches Verfahren zur Quantifizierung der Zellproliferation. Er beruht auf dem Prinzip, dass metabolisch aktive Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase System eine enzymatische Umsetzung des aufgenommenen schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) in das dunkelrote Formazan bewirken. Eine durch Proliferation gesteigerte Aktivität dieser enzymatischen Reaktion bewirkt eine erhöhte Umsetzung zu Formazan. Dieser Farbumschlag kann mit einem Spektralphotometer photometrisch gemessen werden und korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der angesetzten Kultur (*BERRIDGE et al. 1996*).

Zur Durchführung wurden 4×10^3 Zellen pro well sowohl Fibroblasten (L929) als auch Keratinozyten (HaCaT) auf 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und anschließend für 48 h mit Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, low-glucose 1 g/l; PAA, Cölbe, Deutschland) ohne fötalem Kälberserum (FCS) oder unter Zusatz von jeweils 10% FCS, bFGF (20 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, USA), KGF (10 ng/ml; R&D Systems) oder EPO (5 IE/ml bzw. 50 IE/ml; ERYPO, Jansen-Cilag, Neuss, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; PAA, Cölbe) gereinigt und für 4 h mit DMEM und dem Zellproliferationsreagenz WST-1 inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde alle 30 min die Extinktion der Proben durch einen bichromatischen ELISA-Reader (TECAN CM Sunrise; Grödig, Salzburg,

Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Alle Versuche wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt.

5.4.2. Wound Scratch Assay

Um den Einfluss von EPO auf die Zellmigration von Fibroblasten und Keratinozyten zu evaluieren, wurde der Wound-Scratch-Assay durchgeführt. Dieser etablierte Assay ist in der Lage die Zellmigration während der *in vivo* Wundheilung *in vitro* zu imitieren (RODRIGUEZ *et al.* 2005; LIANG *et al.* 2007).

Fibroblasten (L929) und Keratinozyten (HaCaT) wurden auf Petrischalen (d=3,5 cm) zu 5×10^5 Zellen ausgesät und unter Zugabe von DMEM versetzt mit 10% FCS bis zu einer Konfluenz von >90% bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium entfernt und der Zellmonolayer mit einer sterilen 10 µl Pipettenspitze rautenförmig eingeritzt, um vier künstliche Wunden zu erzeugen. Anschließend wurden die Fibroblasten- und Keratinozytenkulturen wieder mit DMEM unter Zusatz von 10 % FCS und zu den *in vivo* Versuchen äquivalenten Dosen EPO inkubiert. Die hierbei verwendeten EPO-Konzentrationen wurden entsprechend der *in vivo* applizierten Menge EPO errechnet.

In vivo wurden als wiederholte Niedrigdosis (RLD) 400 IE/kg KG EPO verabreicht, was ~10 IE pro Versuchstier entspricht. Bei einem normalen zirkulierenden Blutvolumen des Tieres von ca. 7-8% des KG (~2,0 ml) ist demnach eine Konzentration von 5 IE/ml EPO äquivalent. Die wiederholte Hochdosisgabe (RHD) von 5.000 IE/kg KG EPO war *in vivo* 10x so hoch, wie in der RLD-Gruppe, so dass als Äquivalenzdosis 50 IE/ml EPO für diesen Versuch verwendet wurde. Zur Simulation der einmaligen Hochdosisgabe (SHD) von 5.000 IE/kg KG EPO nur an Tag 0 wurden die Zellen mit Kulturmedium unter Zusatz von 50 IE/ml EPO für 24 h inkubiert, das EPO-haltige Medium entfernt und anschließend durch DMEM, versetzt mit 10 % FCS, ausgetauscht.

Als Positivkontrollen wurden zellspezifische, promigratorische Zytokine gewählt. Für die Gruppe der Fibroblasten wurde bFGF (20 ng/ml; R&D Systems) und für die Keratinozyten KGF (10 ng/ml; R&D Systems) verwendet. Das Kulturmedium mit 10 % FCS diente für alle Versuchsgruppen als Negativkontrolle (Tab. 3).

Tabelle 3: Versuchsgruppen WST-1- und Wound Scratch Assay

RLD-EPO	5 IE/ml EPO
RHD-EPO	50 IE/ml EPO
SHD-EPO	50 IE/ml EPO nur an Tag 0
Positiv-Kontrolle Fibroblasten	20 ng/ml bFGF
Positiv-Kontrolle Keratinozyten	10 ng/ml KGF
Negativ-Kontrolle	10 % FCS

Mittels Phasenkontrastmikroskopie (Leica DM IL, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden die Scratch Assays in 10facher Vergrößerung nach jeweils 0, 24, 48 und 72 h evaluiert und durch eine angeschlossene Digitalkamera (Canon Powershot, Canon, Tokyo, Japan) im Graustufenformat fotografiert und gespeichert.

Die quantitative Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte mittels computergestützter Graustufen-Densitometrie (CapImage). Anhand dieses Messverfahrens wurde durch Festlegung eines oberen und unteren Schwellenwertes für jedes Bild die freie Fläche zwischen den Zellen berechnet. Die jeweils gemessenen Flächen wurden prozentual in Relation zu den Ausgangsflächen (0 h) gesetzt. Die erhaltenen Werte wurden als arithmetisches Mittel der einzelnen Gruppen in Prozent der initialen Wundfläche angegeben. Alle Experimente wurden dreifach durchgeführt.

5.5. Histologie

Zur histologischen Evaluation der Wundheilung wurden die Rückenhautkammern am Ende des Untersuchungszeitraums explantiert und die Hautdoppelschicht samt Wunde exzidiert. Die erhaltenen Präparate wurden für 2-3 Tage in 4 % Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden zur weiteren Untersuchung 4 µm dicke Präparate mittels eines Mikrotoms (Leica RM 2145, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Im nächsten Schritt erfolgte die Entparaffinierung der Präparate mittels Xylol bei Raumtemperatur über 30 min sowie die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe unter abschließendem Waschen in aqua destillata (*aqua dest.*) für weitere Analysen.

5.5.1. Hämatoxylin-Eosin

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Methode, die auf einer Kombination von zwei Farbstoffen basiert. Hämatoxylin färbt den Zellkern aber auch saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk blau, während Eosin das Zytoplasma, Kollagen und proteinhaltige Lösungen nuanciert rot färbt. Um dies zu erreichen, wurden die vorbereiteten Präparate für 10 min mittels Hämatoxylin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gefärbt und direkt danach für 7 min unter fließendem Wasser gebläut. Nach einer kurzen Wäsche mit aqua dest. Wurden die Präparate für 2 min mit Eosin (0,1 %; Sigma) gefärbt, kurz mit aqua dest. Gewaschen und anschließend eingedeckt.

5.5.1.1. Histologische Bestimmung der Zellularität

Die Zellularität ist ein Maß für den Zellgehalt eines Gewebes. Sie wird angegeben als Fläche in mm^2 , die von Zellen bedeckt ist. Der Zellgehalt im Granulationsgewebe der Wunde an Tag 12 nach Wundsetzung wurde in dieser Arbeit als Marker der Gewebematurierung während der Wundheilung genutzt. Die physiologische Reifung des Granulationsgewebes umfasst neben der Erhöhung des Kollagengehalts auch die sukzessive apoptotische Regression der Zellzahl (*DESMOULIÈRE et al. 1995&1997*).

Zur Bestimmung der Zellularität wurden die vorher angefertigten H&E-Präparate mittels einer Digitalkamera (ColorViewII, Olympus, Hamburg, Deutschland) gekoppelt an ein Lichtmikroskop (BX 51, Olympus, Hamburg, Deutschland) in 10facher Vergrößerung im Graustufenformat fotografiert und die digitalen Bilder mittels CapImage ausgemessen. Hierfür wurde ein Ausschnitt einer Wunde ausgewählt und für diesen Bereich die oberen und unteren Schwellenwerte festgelegt um die Fläche, die mit Zellen bedeckt ist, zu berechnen. Diese Werte wurden daraufhin auf alle Bilder angewendet. Es wurden für jede Wunde ca. $1,0 \text{ mm}^2$ des Granulationsgewebes analysiert und die Fläche bedeckt mit Zellen in mm^2 angegeben.

5.5.2. Histologischer Nachweis von Leukozyten

Die Färbung der histologischen Wundpräparate mit der AS-D-Chloracetat-Esterase-Reaktion (CAE) ermöglichte die selektive Darstellung und Quantifizierung von immigrierten polymorphkernigen Granulozyten (*Burstone 1957*). Bei dieser zytochemischen Methode hydrolysiert eine spezifische Granulozytenesterase die Esterbindungen von Naphthol AS-D Chlorazetat und setzt Naphthol frei. In Anwesenheit von Diazoniumsalz wird damit ein rot-violetter Farbniederschlag am Ort der Leukozytenesterase gebildet. Damit gefärbte Granulozyten sind mit hohem Kontrast histologisch erkennbar (*VIJAYASEKARAN et al. 1998*).

Nach Entparaffinierung der Präparate in absteigender Alkoholreihe und anschließender Spülung mit aqua dest. erfolgte die Färbung in CAE-Lösung bei 37 °C für 30 min. Daraufhin wurden die Schnitte wiederum mit aqua dest. gewaschen und mittels Hämatoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland: 6,0 g/l Hämatoxylin, 0,6 g/l Natriumjodat, 52,8 g/l Aluminiumsulfat) gegengefärbt. Abschließend erfolgte die Konservierung der Präparate durch aufsteigende Alkoholreihe. Nach dem Eindecken wurden die Schnitte manuell ausgezählt und als Anzahl CAE-positiver Zellen pro High Power Field (n/HPF) angegeben.

5.6. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an formalinfixierten Paraffinschnitten durchgeführt. Hierfür wurden von den vorher in Paraffin eingebetteten Wunden mittels eines Mikrotoms (Leica RM 2145, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) 4 µm breite Präparate angefertigt und nach Entparaffinierung und Rehydrierung auf einem poly-L-Lysin beschichteten Objektträger platziert. Die Demaskierung der Proteine zur Freilegung antigener Epitope erfolgte durch Erhitzen in einer mit Zitratpuffer (0,01 M, pH 6,0) gefüllten Küvette in der Mikrowelle bei 700 W. Nach Abkühlen im Puffer bei Raumtemperatur (ca. 20 min) wurden die Präparate zur Blockierung der endogenen Peroxidase 5 min mit Wasserstoffperoxid (3 %) behandelt. Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen des Präparats mit aqua dest. die Inkubation mit Blocklösung (ProteinBlock, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) für 15 min zur Reduzierung unspezifischer Antikörperbindungen. Nach Abklopfen des Proteinblocks wurden die Präparate dann mit dem jeweiligen Primärantikör-

per bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Präparate auf Raumtemperatur gebracht und dreimal mit aqua dest. gespült. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper und die anschließende Zugabe des jeweiligen Chromogens. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayer's Hämalaun und die konservierende Eindeckung der Präparate.

Die quantitative Auswertung der Präparate erfolgte mittels Lichtmikroskopie (BX 51, Olympus). Hierfür wurden in 40facher Vergrößerung die positiven Zellen in 6 bis 10 aufeinander folgenden HPF's pro Präparat ausgezählt und als positive Zellen pro HPF (n/HPF) angegeben.

5.6.1. Immunhistochemischer Nachweis der initialen Apoptose

Das Enzym Kaspase-3 spielt im Rahmen der Apoptose eine entscheidende Rolle. Im ungespaltenen Zustand inaktiv wird es während des kontrollierten Zelltods durch gezielte Proteolyse in ein p17 und p12 Fragment gespalten und damit aktiviert. Diese biologisch aktive Form ist für die proteolytische Spaltung vieler Schlüsselproteine der Zelle verantwortlich, was konsekutiv zum apoptotischen Absterben der Zelle führt. Aktivierte Kaspase-3 gehört zu den sogenannten Effektor-kaspasen und ist somit ein guter Marker für die beginnende Apoptose (*NICHOLSON et al. 1995; DATTA et al. 1997; NAKAZONO-KUSABA et al. 2004*)

Um aktivierte Kaspase-3 positive Zellen in der Wunde quantitativ erfassen zu können, wurden die vorbereiteten Präparate mit dem primären Antikörper (D175; 1:500; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:20; Dako). Als Chromogen wurde 3,3'-Diaminobenzidin (S3000; Dako) verwendet.

5.6.2. Nachweis der terminalen Apoptose

Ein Kennzeichen der Apoptose ist die Aufspaltung der nukleären DNS durch Endonukleasen in Fragmente von ca. 180 bp. Die terminale Desoxynucleotidyl Transferase-vermittelte dUTP nick end labeling Methode (TUNEL) weist diese DNA-Fragmente nach (*GAVRIELI et al. 1992*). Das Enzym Terminaldesoxyuridyltransferase reagiert nur mit 3'-OH-Enden von DNA und fügt an sie biotinylierte Polydesoxyuridylnukleotide an. Diese Biotinenden reagieren nun ihrerseits mit Avidin, das an ei-

ne Peroxidase gekoppelt ist. Diese Peroxidase katalysiert die Farbreaktion, die im histologischen Präparat sichtbar wird. Hierfür wurden die Präparate mittels eines fertigen Kits (ApopTag® Peroxidase *In situ* Apoptosis Detection Kit S7101; Chemicon, Hofheim, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers angefärbt und anschließend die TUNEL-positiven Zellen pro HPF (n/HPF) manuell ausgezählt.

5.6.3. Immunhistochemischer Nachweis von Endothelzellen

Das endotheliale Oberflächenmolekül platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) wird auch als CD-31 bezeichnet und gilt als der sensitivste und spezifischste Marker, um Endothelzellen und damit Gefäße nachzuweisen (ALBELDA *et al.* 1991; NEWMAN *et al.* 2003).

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Präparate mit dem primären Antikörper gegen CD-31 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem an alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten Sekundärantikörper (LSAB Kit; Dako) nach Vorschrift des Herstellers. Als Chromogen wurde Fuchsin verwendet.

5.6.4. Immunhistochemischer Nachweis zellulärer Proliferation

Das Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ist ein 36 kDa-Protein, welches einerseits als Teil einer Signalkette die Zellzyklusprogression reguliert und zum anderen als Co-Faktor der DNA-Polymerase δ an der DNA-Neusynthese beteiligt ist. Intrazellulär liegt es in zwei Formen vor: eine Form ist DNA-gebunden und stellt die aktive Form dar, während der nukleoplasmatische Anteil einen Reservepool darstellt (TAKASAKI *et al.* 1981; MIYAGAWA *et al.* 1989).

Zur Quantifizierung proliferierender Zellen in der Wunde wurden die Präparate mit dem primären Antikörper gegen PCNA (1:200; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, England) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (LSAB-Kit; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers. Als Chromogen diente 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC).

5.7. Elektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Perizyten im Wundbereich wurden neben den intravitalem Experimenten zusätzlich jeweils 4 Tiere aus allen Versuchsgruppen euthanasiert und ihre Hautwunden für eine elektronenmikroskopische Analyse asserviert. Die erhaltenen Proben wurden mit 2 % Glutaraldehyd gepuffert mit 0,12 M Natriumcacodylat (pH 7,4) fixiert. Danach erfolgte die Postfixation in drei Schritten mittels 1 % Osmiumtetroxid in 100 mM Natriumcacodylat (pH 7,4) für 1 h bei 4 °C. Nach Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe unter Infiltration mit Propylenoxid wurden die Wunden abschließend in Araldite 502 (Serva, Heidelberg, Germany) eingebettet. Mittels eines Ultramicrotoms (Ultracut; SWS, Leica, Bensheim, Germany) wurden semidünne Schnitte für die Kontrolle per Lichtmikroskop sowie ultradünne Schnitte angefertigt. Die ultradünnen Präparate wurden daraufhin zur weiteren Analyse mit 2 % Uranylazetat in H₂O für 15 min gefärbt und mit einem Tecnai G2 Transmissionselektronenmikroskop (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) bei 100 kV untersucht.

5.8. Hämatologische Analysen

Zur Blutanalyse wurde am Ende des Beobachtungszeitraums und nach Vertiefen der Narkose mittels medianer Laparotomie das Abdomen der Mäuse eröffnet und durch Verlagerung des Darmkonvoluts die V. cava inferior zur Blutentnahme dargestellt. Die systemische Blutzellanalyse wurde mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (Sysmex KX21, Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt. Sie umfasste neben der Bestimmung der Leukozyten- (WBC in $\times 10^9/l$) und Erythrozytenzahl (RBC in $\times 10^{12}/l$) auch die Angabe des Hämoglobin- (HGB in mmol/l) sowie Hämatokritwertes (HCT in l/l).

5.9. Experimentelles Protokoll

5.9.1. Versuchsablauf

Nach Randomisierung und Zuordnung zu den einzelnen Versuchsgruppen wurden im Modell der Hautwundheilung in der Rückenhautkammer haarlose SKH-1-*hr* Mäuse mittels intraperitonealer Applikation von Ketamin (90 mg/kg KG) und Xylazin (25 mg/kg KG) anästhesiert und auf einem beheizten Präparationstisch zur Aufrechterhaltung der physiologischen Körpertemperatur von 37,5 °C gelagert. Anschließend erfolgte die mikrochirurgische Präparation einer vollen dermalen Wunde. Im Versuchszeitraum erfolgte zudem die tägliche Bestimmung der Körpermasse zur gewichtsadaptierten i.p. Applikation der getesteten Substanzen. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurde die Rückenhautkammer zur Asservierung der Wunde explantiert und die Tiere euthanasiert.

5.9.2. Versuchsgruppen

Der Prozess der kutanen Wundheilung wurde an insgesamt 47 haarlosen SKH-1-*hr* Mäusen evaluiert. Die Tiere wurden nach Randomisierung in fünf Versuchsgruppen eingeteilt, welche eine tägliche i.p. Gabe von 400 IE/kg KG EPO (ERYPO, Jansen-Cilag, Neuss, Deutschland; RLD-EPO; n=8), 5.000 IE/kg KG EPO (RHD-EPO; n=12) bzw. einmalig 5.000 IE/kg KG EPO (SHD-EPO; n=7) erhielten. Zusätzlich wurde eine Versuchsgruppe mit täglich 3,3 mg/kg KG i.p. z-VAD-fmk (R&D Systems; n=8) behandelt. Physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl; B. Braun, Melsungen, Deutschland) diente als Kontrolle und wurde in gleicher Weise und in äquivalenter Dosierung (12,5 ml/kg KG; n=12) verabreicht (*Tab. 4*).

Tabelle 4: Versuchsgruppen Intravitalmikroskopie SKH-1-*hr* Mäuse

RLD-EPO	1 x 8 Tiere	Applikation von EPO 400 IE/kg KG tgl.
RHD-EPO	1 x 12 Tiere	Applikation von EPO 5.000 IE/kg KG tgl.
SHD-EPO	1 x 7 Tiere	Applikation von EPO 5.000 IE/kg KG nur an Tag 0
z-VAD-fmk	1 x 8 Tiere	Applikation von z-VAD-fmk 3,3 mg/kg KG tgl.
Kontrolle	1 x 12 Tiere	Kontrollgruppe mit Gabe von 12,5 ml/kg KG tgl.

5.10. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als statistischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben und auf Normalverteilung innerhalb jeder Gruppe analysiert. Dabei ergeben sich die Mittelwerte der einzelnen Parameter aus den Einzelwerten pro Tier pro Versuchsgruppe.

Nachdem eine Analyse der Interaktionen bezüglich Zeitpunkt und Gruppe mittels „two way analysis of variance“ (2-way ANOVA) durchgeführt wurde, folgte die separate Ermittlung von Unterschieden zwischen den Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt mittels „one way analysis of variance“ (1-way ANOVA). Anschließend wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, zu einem bestimmten Zeitpunkt, durch den Holm-Sidak-Test und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für multiple Paarvergleiche geprüft.

Signifikante Unterschiede von Werten innerhalb einer Gruppe wurden mittels Varianzanalyse für wiederholte Messungen gefolgt von einem entsprechenden post-hoc Paarvergleich und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferronie analysiert.

Falls eine Normalverteilung der Werte ausgeschlossen wurde, erfolgte der Gruppenvergleich mittels Kruskal Wallis Varianzanalyse. Anschließend wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen durch den Dunn's Test mit Korrektur des alpha-Fehlers für statistische Berechnungen bei Messwiederholungen bestimmt.

Sämtliche statistische Tests erfolgten unter Verwendung der *SigmaStat* Software (Version 3.5, Jandel Corporation, SanRafael, CA, USA). Bei der Prüfung wurden Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

6. ERGEBNISSE

6.1. Dermale Wundheilung in der Rückenhautkammer der Maus

Die täglich Inspektion der Versuchstiere zeigte eine gute Toleranz gegenüber der Implantation der Rückenhautkammer sowie keine Anzeichen für physische Beschwerden oder Veränderungen im Ess- oder Trinkverhalten über den gesamten Versuchszeitraum.

6.1.1. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Re-Epithelialisierung

Die Größe der Wundfläche war mit einer Durchschnittsfläche von $5.0 \pm 0.3 \text{ mm}^2$ direkt nach Wundsetzung in allen Gruppen vergleichbar und nicht signifikant unterschiedlich. In den darauf folgenden planimetrischen Messungen der Wundfläche wies die Kontrollgruppe (NaCl) einen kontinuierlichen Prozess der Re-Epithelialisierung auf mit einem $50 \pm 5 \%$ Wundverschluss an Tag 6 und einer kompletten Re-Epithelialisierung an Tag 12 ($100 \pm 0 \%$) nach Wundsetzung (*Abb. 9*).

Unter EPO-Applikation zeigten sich dosisabhängige Unterschiede in der Epithelialisierung der regenerierenden Wunde. So resultierte die Behandlung mit RHD-EPO in einer signifikant verzögerten Re-Epithelialisierung mit einer nur $32 \pm 3 \%$ Deckung an Tag 6 und $64 \pm 7 \%$ an Tag 9 sowie einem immer noch inkomplettem Wundverschluss an Tag 12 ($92 \pm 3 \%$) (*Abb. 9*).

Bemerkenswerterweise akzelerierte die SHD-EPO Applikation signifikant die Wundepithelialisierung mit einem $73 \pm 9 \%$ Wundverschluss an Tag 6, einer annähernd kompletten Defektdeckung bereits an Tag 9 ($92 \pm 3 \%$) sowie einer vollständig re-epithelialisierten Wunde an Tag 12 ($100 \pm 0 \%$). Die kontinuierliche Applikation von RLD-EPO resultierte besonders an Tag 6 in einer deutlichen Verlangsamung der Defektdeckung ($41 \pm 6 \%$) bei einer sonst vergleichbaren Re-Epithelialisierung an Tag 3, 9 und 12 gegenüber der Kontrollgruppe (*Abb. 9*).

Versuchstiere, welche mit einer regelmäßige Gabe von zVAD behandelt wurden, zeigten eine statistisch signifikante Verzögerung des Wundverschlusses an Tag 6 ($23 \pm 4 \%$) sowie über alle anderen Zeitpunkte eine deutliche Verlangsamung des Re-Epithelialisierungsprozesses gegenüber den Kontrolltieren (*Abb. 9*).

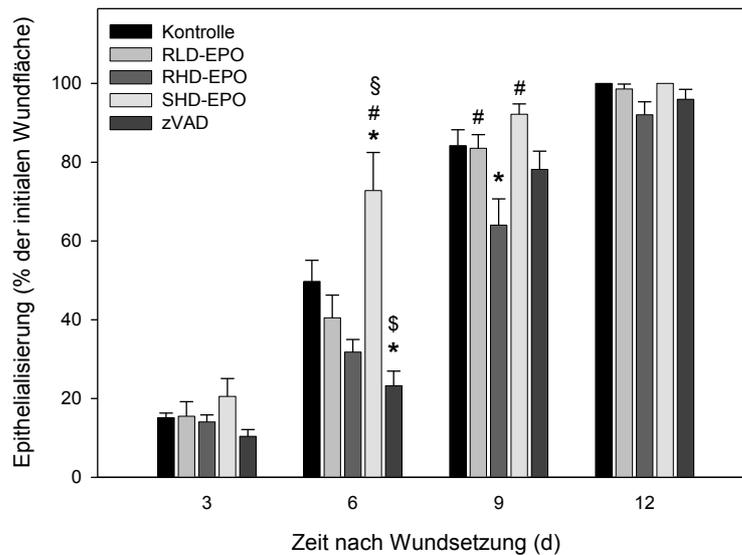


Abbildung 9: Quantitative planimetrische Analyse der Epithelialisierung (% der initialen Wundfläche). Die Tiere wurden täglich entweder mit NaCl (Kontrolle; 0,9% NaCl; 12,5ml/kg KG; n=12), RLD-EPO (400 IE/kg KG; n=8), RHD-EPO (5000IE/kg KG; n=12), oder SHD-EPO, welches einmalig am Tag der Wundsetzung gegeben wurde (5000IE/kg KG; n=7) behandelt. Ergänzend erhielten n=8 Mäuse täglich den Pan-Kaspase-Inhibitor zVAD-fmk (zVAD; 3,3 mg/kg KG). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; # $p < 0.05$ vs. RHD-EPO; ; $p < 0.05$ vs. RLD-EPO.

6.1.2. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf mikrovaskuläre Parameter der regenerierenden Hautwunde

Wie *Sorg et al.* bereits beschrieb, ist die Revaskularisierung der heilenden Wunde durch einen inneren und äußeren Ring neugebildeter Gefäße charakterisiert (*SORG et al. 2007*). Der innere Ring zeigt hierbei zirkulär verlaufende Gefäße direkt am Wundrand der sich re-epithelialisierenden Wundoberfläche mit großen und unregulären Gefäßdurchmessern. Im Gegensatz hierzu ist der äußere Bereich, welcher sich unterhalb des neugebildeten Epithels befindet, durch radiär verlaufende Gefäße gekennzeichnet, welche kleiner und weniger heterogen im Durchmesser sind. Die äußeren radiär verlaufenden Gefäße stellen die Verbindung des zirkulären Gefäßrings mit der physiologischen Hautmikrozirkulation her und wachsen fortwährend zum Zentrum der Wunde, bis die Defektheilung abgeschlossen ist. Dieses klare Muster differenziert verlaufender neu geformter Gefäße konnte auch in dieser Studie beobachtet werden (*Abb. 10*).

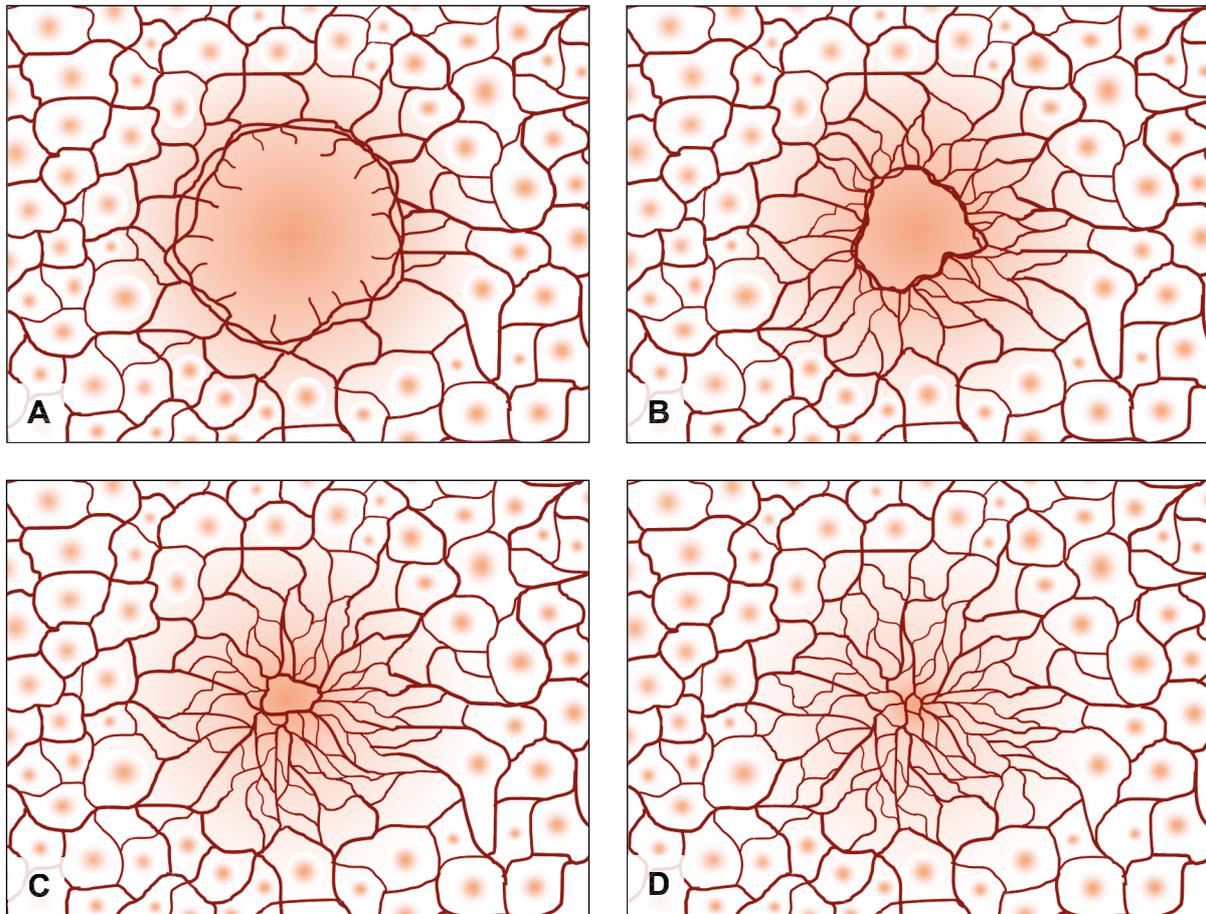


Abbildung 10: Physiologische mikrovaskuläre Architektur der regenerierenden dermalen Wunde im Verlauf der Revaskularisierung (A) 3 Tage, (B) 6 Tage, (C) 9 Tage und (D) 12 Tage post vulnerationem (SORG et al. 2012).

6.1.2.1. Gefäßdurchmesser

In der Kontrollgruppe zeigten die zirkulären Gefäße eine Reduzierung der Gefäßdurchmesser über 12 Tage von initial $21 \pm 1 \mu\text{m}$ an Tag 3 auf $16 \pm 1 \mu\text{m}$ an Tag 12 (Abb. 11 A). Zirkuläre Gefäße der mit RLD-EPO und insbesondere der mit SHD-EPO behandelten Versuchstiere wiesen an Tag 6 und 9 vergrößerte Durchmesser auf, maturierten dann jedoch ähnlich wie unter Kontrollbedingungen (Abb. 11 A).

Im Gegensatz hierzu resultierte die Applikation von RHD-EPO in einer Inhibition der Gefäßreifung sichtbar an der Aufrechterhaltung der initial erhöhten Gefäßkaliber im Verlauf des Experiments (Abb. 11 A). Darüber hinaus konnte in den mit RHD-EPO behandelten Tieren sogar eine Zunahme der Gefäßdurchmesser auf $25 \pm 1 \mu\text{m}$ an Tag 12 beobachtet werden (Abb. 11 A). Die tägliche Applikation von

zVAD führte nach initial erniedrigten Gefäßdurchmessern an Tag 3 ($18 \pm 1 \mu\text{m}$) und einem Anstieg auf $22 \pm 1 \mu\text{m}$ an Tag 6, zu einer kontinuierlichen Reduzierung der Gefäßkaliber auf $16 \pm 2 \mu\text{m}$ ähnlich wie in der Kontrollgruppe (Abb. 11 A).

Der äußere Bereich neu geformten Epithels war charakterisiert durch radiär verlaufende Gefäße, welche sich durch kleinere Durchmesser als im zirkulären Bereich auszeichneten (Abb. 11 B). Interessanterweise konnten in Wunden von Tieren, welche mit EPO oder zVAD behandelt wurden, an Tag 3 keine radiären Gefäße beobachtet werden. Die radiären Gefäße unterschieden sich nicht signifikant in ihrem Durchmesser zwischen den Gruppen bis Tag 9 nach Wundsetzung mit Gefäßdurchmessern zwischen 10-12 μm . Tiere, welche mit RHD-EPO behandelt wurden, zeigten einen gegenüber Kontrolltieren signifikanten Anstieg der Gefäßdurchmesser von $11 \pm 0 \mu\text{m}$ an Tag 6 auf $13 \pm 1 \mu\text{m}$ am Ende des Versuchszeitraums (Abb. 11 B).

Die physiologische Hautmikrozirkulation wurde durch Gefäße distal der Wunde repräsentiert. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und EPO- bzw. zVAD-Behandlung beobachtet werden (s. Anhang).

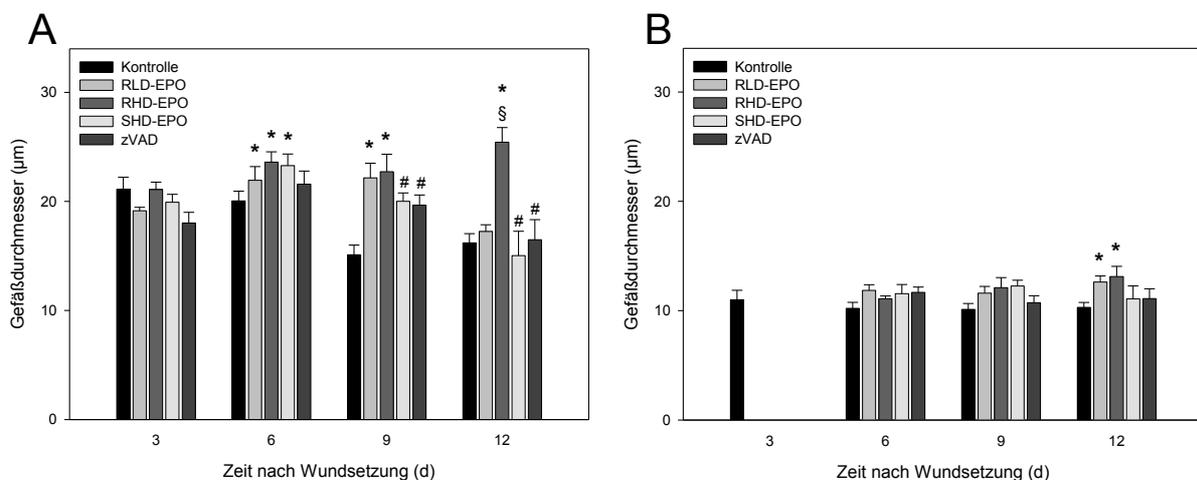


Abbildung 11: Quantitative Analyse der Gefäßdurchmesser (μm) im zirkulären (A) und radiären (B) Gefäßbereich. Die Tiere wurden täglich entweder mit NaCl (Kontrolle; 0,9% NaCl; 12,5ml/kg KG; n=12), RLD-EPO (400 IE/kg KG; n=8), RHD-EPO (5000IE/kg KG; n=12), oder SHD-EPO, welches einmalig am Tag der Wundsetzung gegeben wurde (5000IE/kg KG; n=7) behandelt. Ergänzend erhielten n=8 Mäuse täglich den Pan-Kaspase-Inhibitor zVAD-fmk (zVAD; 3,3 mg/kg KG). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; # $p < 0.05$ vs. RHD-EPO; ; § $p < 0.05$ vs. RLD-EPO.

6.1.2.2. Blutzellfließgeschwindigkeit

Unter Kontrollbedingungen konnte im zirkulären Gefäßbereich eine kontinuierliche Verlangsamung der Blutzellfließgeschwindigkeit von initial $422 \pm 49 \mu\text{m/s}$ an Tag 3 auf $315 \pm 68 \mu\text{m/s}$ am Ende des Versuchszeitraums beobachtet werden (*Abb. 12 A*). Die Gabe von RHD-EPO resultierte in einer statistisch signifikanten Reduktion der Fließgeschwindigkeit in zirkulären Gefäßen sowohl an Tag 9 ($156 \pm 18 \mu\text{m/s}$) als auch Tag 12 ($177 \pm 28 \mu\text{m/s}$) (*Abb. 12 A*). Ähnlich konnte auch in RLD-EPO behandelten Tieren eine signifikante Verlangsamung des zirkulären Blutflusses an Tag 12 ($187 \pm 21 \mu\text{m/s}$) beobachtet werden (*Abb. 12 A*).

Darüber hinaus zeigte sich nach Behandlung der Versuchstiere mit zVAD ebenfalls eine deutliche Reduktion der Blutzellfließgeschwindigkeit an Tag 9 ($209 \pm 48 \mu\text{m/s}$) sowie eine signifikante Verlangsamung des Blutflusses an Tag 12 ($222 \pm 27 \mu\text{m/s}$) vergleichbar zur RLD-EPO- und RHD-EPO-Gruppe (*Abb. 12 A*). Die Applikation von SHD-EPO konnte im zirkulären Gefäßbereich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe erzielen (*Abb. 12 A*).

Im radiären Gefäßbereich zeichnete sich die Kontrollgruppe durch annähernd konstante Blutzellfließgeschwindigkeiten zwischen $361\text{-}418 \mu\text{m/s}$ über den gesamten Versuchszeitraum aus (*Abb. 12 B*). Auch hier resultierte die Behandlung der Tiere mit Hochdosis-EPO in einer signifikanten Verlangsamung des Blutflusses an Tag 9 ($257 \pm 36 \mu\text{m/s}$) und 12 ($225 \pm 29 \mu\text{m/s}$) (*Abb. 12 B*). Interessanterweise zeigte die Applikation von zVAD nach initial erhöhten Werten von $594 \pm 107 \mu\text{m/s}$ an Tag 6 eine kontinuierliche Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit bis auf $347 \pm 28 \mu\text{m/s}$ an Tag 12 (*Abb. 12 B*). Des Weiteren waren die beobachteten Flussgeschwindigkeiten der zVAD-Gruppe gegenüber der RHD-EPO-Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum signifikant erhöht (*Abb. 12 B*). Nach der Applikation von RLD- bzw. SHD-EPO konnten über die Zeit von 12 Tagen keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden (*Abb. 12 B*).

Der distale Gefäßbereich wies unter Kontrollbedingungen über den gesamten Versuchszeitraum annähernd konstante Blutzellfließgeschwindigkeiten zwischen $340\text{-}351 \mu\text{m/s}$ auf (*s. Anhang*). Vergleichbar zum zirkulären und radiären Gefäßbereich der regenerierenden Wunde konnte unter Gabe von RHD-EPO auch hier eine signifikante Verlangsamung der Flussgeschwindigkeiten an Tag 9 ($204 \pm 21 \mu\text{m/s}$) und 12 ($204 \pm 33 \mu\text{m/s}$) beobachtet werden (*s. Anhang*). Darüber hinaus zeigte die Appli-

kation von zVAD signifikant erhöhte Werte gegenüber der RHD-EPO-Gruppe an diesen Tagen (s. Anhang). Interessanterweise beeinflusste die Gabe von SHD- bzw. RLD-EPO die Blutzellfließgeschwindigkeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant (s. Anhang).

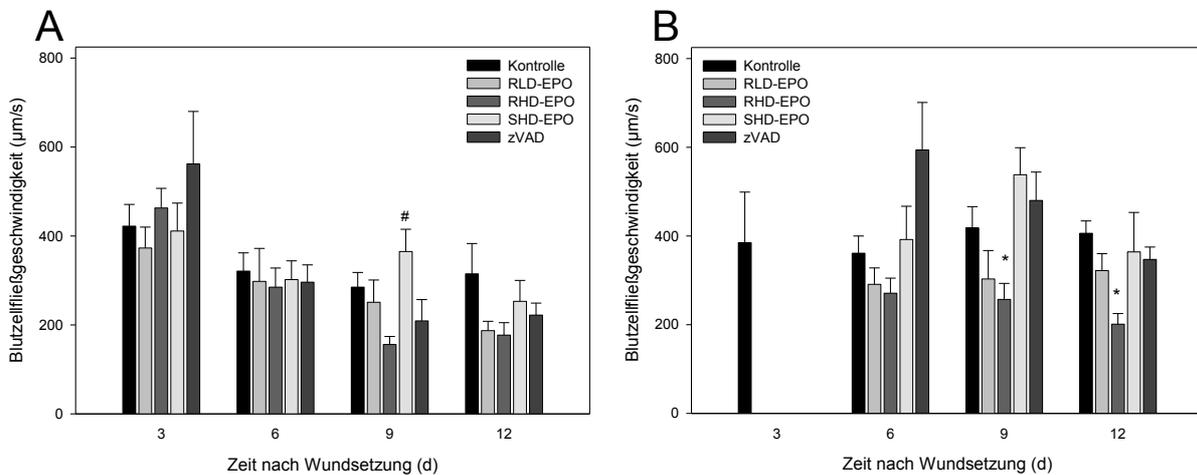


Abbildung 12: Quantitative Analyse der Blutzellfließgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) im zirkulären (A) und radiären (B) Gefäßbereich. Die Tiere wurden täglich entweder mit NaCl (Kontrolle; 0,9% NaCl; 12,5ml/kg KG; $n=12$), RLD-EPO (400 IE/kg KG; $n=8$), RHD-EPO (5000IE/kg KG; $n=12$), oder SHD-EPO, welches einmalig am Tag der Wundsetzung gegeben wurde (5000IE/kg KG; $n=7$) behandelt. Ergänzend erhielten $n=8$ Mäuse täglich den Pan-Kaspase-Inhibitor zVAD-fmk (zVAD; 3,3 mg/kg KG). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SE angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test.

* $p < 0.05$ vs. Kontrolle; [#] $p < 0.05$ vs. RHD-EPO.

6.1.2.3. Funktionelle Kapillardichte

In den mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrolltieren nahm die funktionelle Kapillardichte im zirkulären Gefäßbereich am Wundrand fortwährend von $131 \pm 4 \text{ cm/cm}^2$ an Tag 3 auf $39 \pm 3 \text{ cm/cm}^2$ an Tag 12 ab (Abb. 13 A).

Die RLD-EPO-Applikation führte analog zur Kontrolle ebenfalls zu einer kontinuierlichen Abnahme der Kapillardichte des zirkulären Gefäßnetzwerks mit initialen Werten von $143 \pm 5 \text{ cm/cm}^2$ zu Beginn des Versuches und $79 \pm 16 \text{ cm/cm}^2$ an Tag 12 (Abb. 13 A). Die einmalige Hochdosis-Gabe von EPO erwies sich gleichermaßen effektiv, sichtbar an der sukzessiven Reduktion der initial auf Kontrollniveau liegenden zirkulären Kapillardichten auf $57 \pm 13 \text{ cm/cm}^2$ am Ende des Versuchszeitraums (Abb. 13 A). Interessanterweise übertrafen die Werte der zirkulären Gefäßdichten von RHD-EPO behandelten Tieren signifikant die der Kontrolltiere mit Werten von über

160 cm/cm² über eine Zeit von 12 Tagen (Abb. 13 A). Im selben Maße resultierte die Gabe von zVAD in annähernd konstant signifikant erhöhten Kapillardichten mit Werten von über 145 cm/cm² im zirkulären Gefäßnetzwerk der regenerierenden Wunde (Abb. 13 A). Somit konnten sowohl in der RHD-EPO als auch in der zVAD Gruppe keine Anzeichen für eine Gefäßregression, wie sie in den anderen Versuchsgruppen beobachtet werden konnte, gefunden werden. Die Gefäßdichte der radiären Gefäßbereiche blieb in den Kontrolltieren mit Werten zwischen 146-157 cm/cm² annähernd konstant, aber erhöhte sich leicht unter EPO oder zVAD Behandlung (Abb. 13 B). Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen im radiären Gefäßbereich (Abb. 13 B).

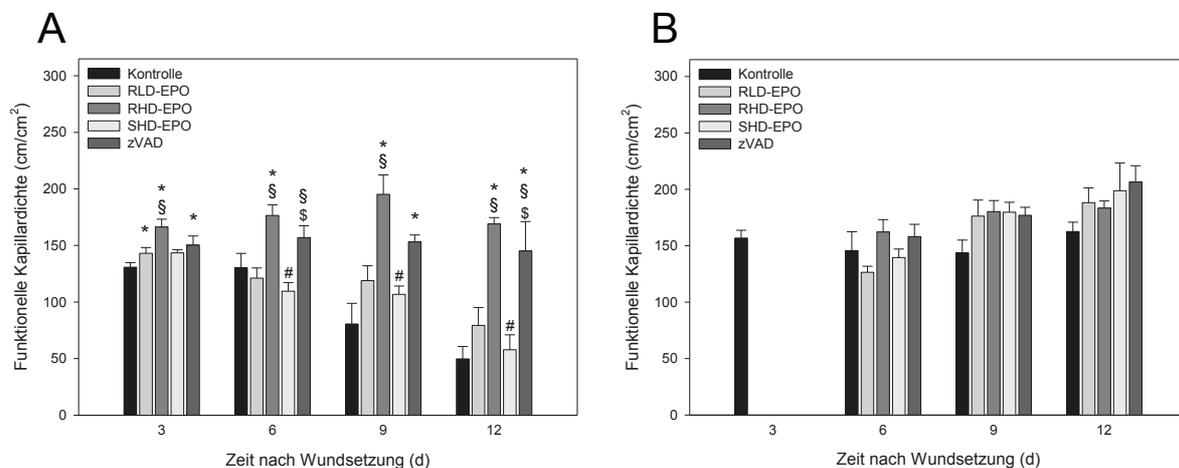


Abbildung 13: Quantitative Analyse der funktionellen Kapillardichte (cm/cm²) im zirkulären (A) und radiären (B) Gefäßbereich. Die Tiere wurden täglich entweder mit NaCl (Kontrolle; 0,9% NaCl; 12,5ml/kg KG; n=12), RLD-EPO (400 IE/kg KG; n=8), RHD-EPO (5000IE/kg KG; n=12), oder SHD-EPO, welches einmalig am Tag der Wundsetzung gegeben wurde (5000IE/kg KG; n=7) behandelt. Ergänzend erhielten n=8 Mäuse täglich den Pan-Kaspase-Inhibitor zVAD-fmk (zVAD; 3,3 mg/kg KG). Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. *p<0.05 vs. Kontrolle; #p<0.05 vs. RHD-EPO; §p<0.05 vs. RLD-EPO; §p<0,05 vs. SHD-EPO.

Im distalen Gefäßbereich zeigte die physiologische Hautmikrozirkulation unter Kontrollbedingungen konstante Werte zwischen 183-194 cm/cm² über den gesamten Versuchszeitraum von 12 Tagen. Interessanterweise führte die EPO oder zVAD Applikation zu einer leichten Erhöhung der funktionellen Kapillardichten. Es konnten jedoch zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede in den erhaltenen Werten beobachtet werden (s. Anhang).

6.2. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf das Granulationsgewebe und die Wundzusammensetzung der regenerierenden Hautwunde

An H&E gefärbten Paraffinschnitten zeigte sich in der Graustufenwert basierten Analyse der Zellularität an Tag 12, dass Tiere, welche mit RHD-EPO oder zVAD behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle einen signifikant erhöhten Zellgehalt aufwiesen (Abb. 14 A). Interessanterweise resultierte die Applikation von SHD-EPO in einem gegenüber der RHD-EPO-Gruppe signifikant erniedrigtem Zellgehalt (Abb. 14 A). Gleichermäßen konnte RLD-EPO die Wundzellularität deutlich reduzieren (Abb. 14 A).

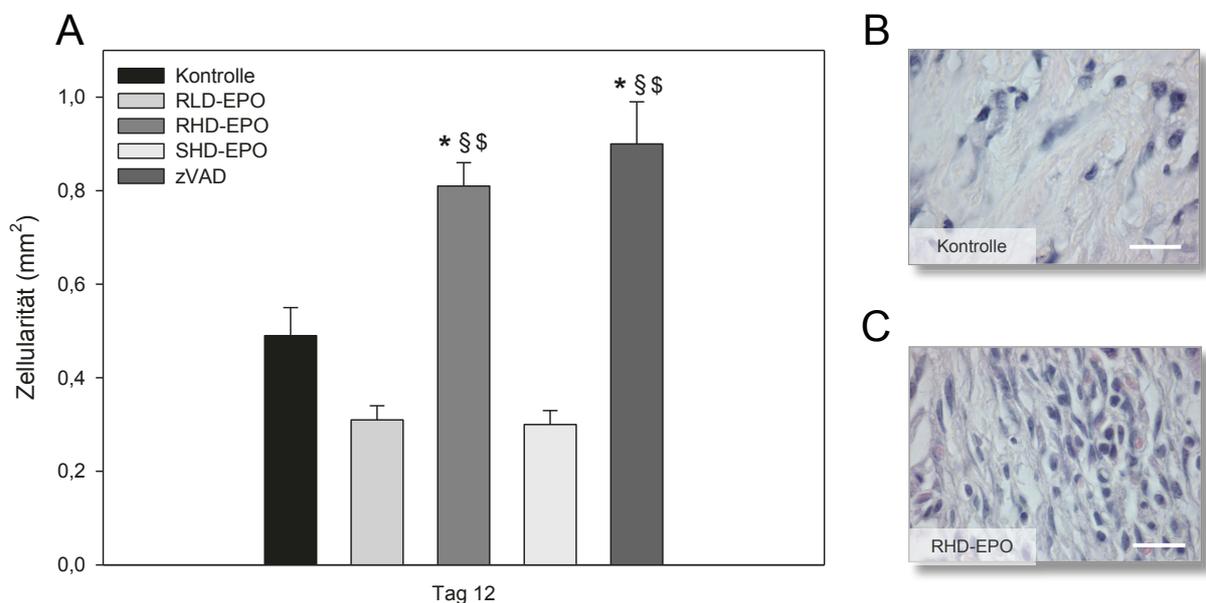


Abbildung 14: Quantitative histologische Analyse (A) und repräsentative Bilder der Zellularität im Granulationsgewebe 12 Tage nach Wundsetzung mittels Nachweis von HE-Färbung (B,C). Die Tiere wurden täglich entweder mit NaCl (Kontrolle; 0,9% NaCl; 12,5ml/kg KG; n=12), RLD-EPO (400 IE/kg KG; n=8); RHD-EPO (5000IE/kg KG; n=12), oder SHD-EPO, welches einmalig am Tag der Wundsetzung gegeben wurde (5000IE/kg KG; n=7) behandelt. Ergänzend erhielten n=8 Mäuse täglich den Pan-Kaspase-Inhibitor zVAD-fmk (zVAD; 3,3 mg/kg KG). Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. * $p < 0.001$ vs. Kontrolle; # $p < 0.001$ vs. RHD-EPO; § $p < 0.001$ vs. RLD-EPO. Skalierungsbalken=20µm (B,C)

In mittels CAE angefärbten Paraffinschnitten konnte der Leukozytengehalt des Granulationsgewebes der heilenden Hautwunde an Tag 12 eindeutig quantifiziert werden. Die Applikation von hochdosiertem EPO resultierte in einem persistierenden

Granulationsgewebe charakterisiert durch eine deutlich erhöhte Leukozyteninfiltration an Tag 12 nach Wundsetzung, welche im Vergleich zur Kontrolle bzw. der SHD-EPO Gruppe 2,2 und 3,3 mal so hoch war (Abb. 15 A).

Zu betonen ist hierbei, dass die Behandlung mit SHD-EPO den Leukozytengehalt des Granulationsgewebes gegenüber der Kontrollgruppe deutlich reduzieren konnte (Abb. 15 A). Diese Resultate unterstreichen die Hypothese eines Maturierungsprozesses innerhalb der Wunden in der SHD-EPO- wie auch RLD-EPO-Gruppe mit einer beschleunigten Auflösung des Granulationsgewebes und einer verkürzten Entzündungsphase.

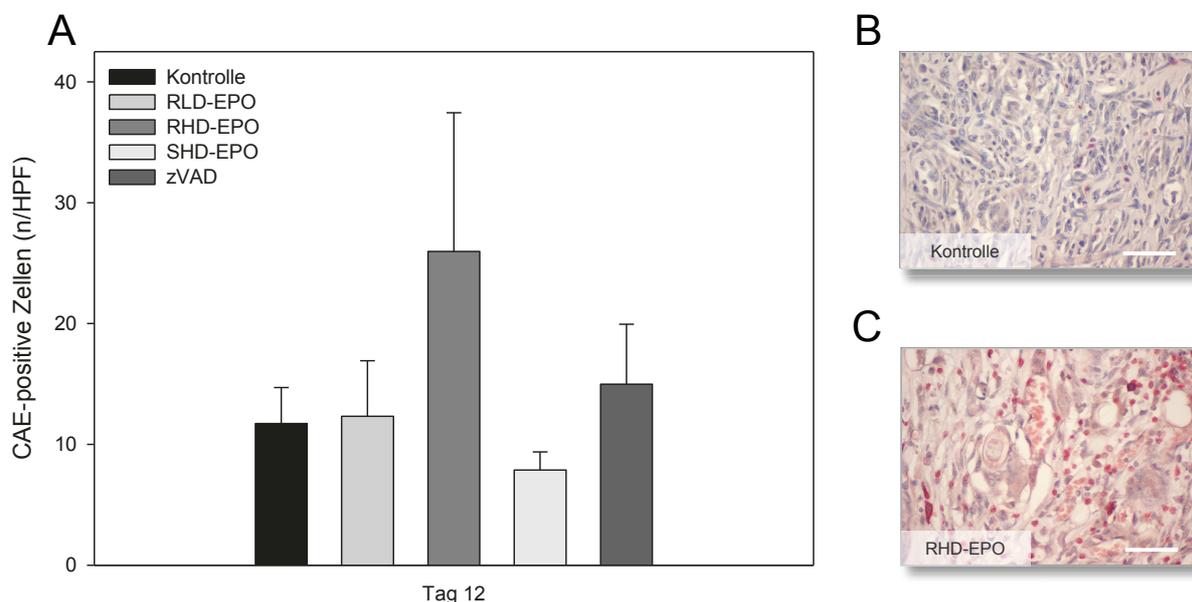


Abbildung 15: Quantitative histologische Analyse (A) und repräsentative Bilder der Leukozytenzahl im Granulationsgewebe 12 Tage nach Wundsetzung mittels Nachweis von CAE positiven Zellen (B,C). Die Tiere wurden täglich entweder mit NaCl (Kontrolle; 0,9% NaCl; 12,5ml/kg KG; n=12), RLD-EPO (400 IE/kg KG; n=8); RHD-EPO (5000IE/kg KG; n=12), oder SHD-EPO, welches einmalig am Tag der Wundsetzung gegeben wurde (5000IE/kg KG; n=7) behandelt. Ergänzend erhielten n=8 Mäuse täglich den Pan-Kaspase-Inhibitor zVAD-fmk (zVAD; 3,3 mg/kg KG). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. * $p < 0.001$ vs. Kontrolle; # $p < 0.001$ vs. RHD-EPO; § $p < 0.001$ vs. RLD-EPO. Skalierungsbalken=50 μ m (B,C)

Die Analyse des Endothelzellmarkers CD-31 als Parameter der Angiogenese ergab im Granulationsgewebe der Kontrollwunden eine mikrovaskuläre Dichte von 18 ± 2 Mikrogefäße/HPF an Tag 12 (Abb. 16 A). Dem gegenüber resultierte die RHD-EPO-Gabe in einer signifikant erhöhten Gefäßdichte von 40 ± 6 Mikrogefäßen/HPF, was auf eine Verzögerung der Maturierung des neugeformten mikrovaskulären

Netzwerks durch die hochdosierte EPO-Gabe schließen lässt (Abb. 16 A). Interessanterweise resultierte die Applikation von zVAD bzw. SHD-EPO in signifikant reduzierten Mikrogefäßdichten im Vergleich zur Hochdosis-EPO-Gruppe (Abb. 16 A). Des Weiteren wiesen die anderen Untersuchungsgruppen mit Werten von 13-21 Mikrogefäßen/HPF keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle auf (Abb. 16 A).

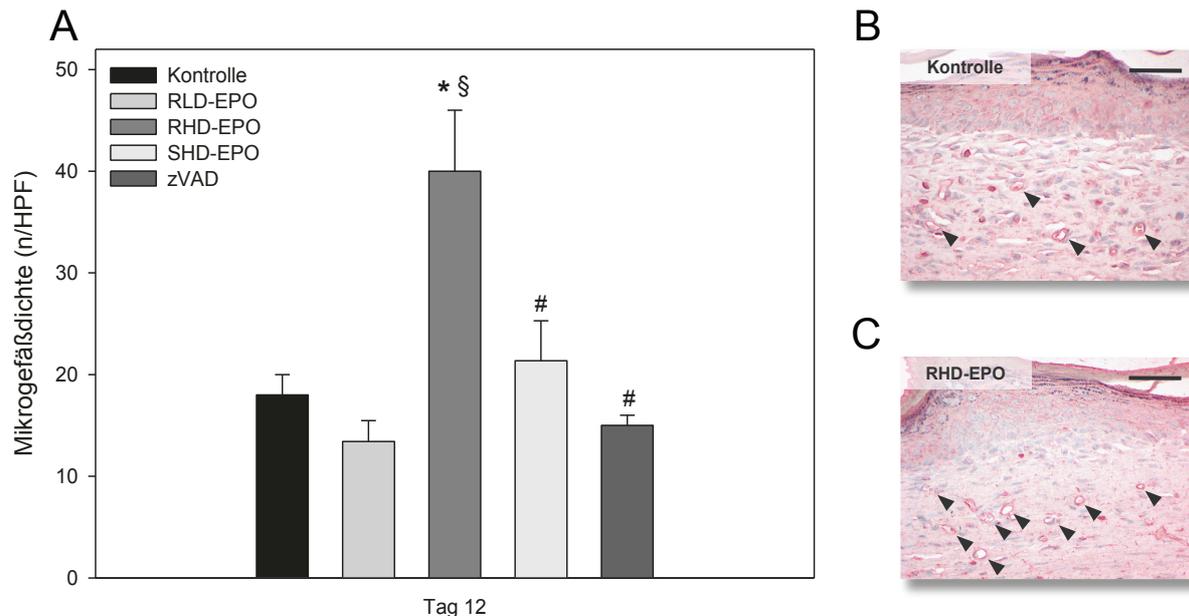


Abbildung 16: Quantitative histologische Analyse (A) und repräsentative Bilder der Mikrogefäßdichte im Granulationsgewebe 12 Tage nach Wundsetzung mittels Nachweis von CD31 positiven Endothelzellen (B,C s.Pfeilspitzen). Die Tiere wurden täglich entweder mit NaCl (Kontrolle; 0,9% NaCl; 12,5ml/kg KG; n=12), RLD-EPO (400 IE/kg KG; n=8), RHD-EPO (5000IE/kg KG; n=12), oder SHD-EPO, welches einmalig am Tag der Wundsetzung gegeben wurde (5000IE/kg KG; n=7) behandelt. Ergänzend erhielten n=8 Mäuse täglich den Pan-Kaspase-Inhibitor zVAD-fmk (zVAD; 3,3 mg/kg KG). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. * $p < 0.001$ vs. Kontrolle; # $p < 0.001$ vs. RHD-EPO; § $p < 0.001$ vs. RLD-EPO. Skalierungsbalken=100 μ m (B,C)

Der Nachweis von Zellapoptose im Wundgebiet mittels aktivierter Kaspase-3 Immunhistochemie zeigte in der RHD-EPO- und SHD-EPO-Gruppe eine leicht reduzierte Anzahl Apoptose positiver Zellen gegenüber der Kontrollgruppe an Tag 12 (Abb. 17). Die Gabe von zVAD erwies sich als sehr effektiv in der Reduktion apoptotischer Zellen in den Gewebsschnitten aus dem Wundbereich (Abb. 17), jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nachgewiesen werden (Abb. 17).

Im Rahmen der TUNEL-Analyse ließen sich gegenüber der Kontrolle gleichmaßen erniedrigte Werte Apoptose-positiver Zellen in Wunden der RHD-EPO- und SHD-EPO-Gruppe an Tag 12 nachweisen (Abb. 17). Wunden, welche mit zVAD behandelt wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrolle auch hier eine deutlich reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen im Wundbereich auf (Abb. 17). Es konnten jedoch untereinander keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 17).

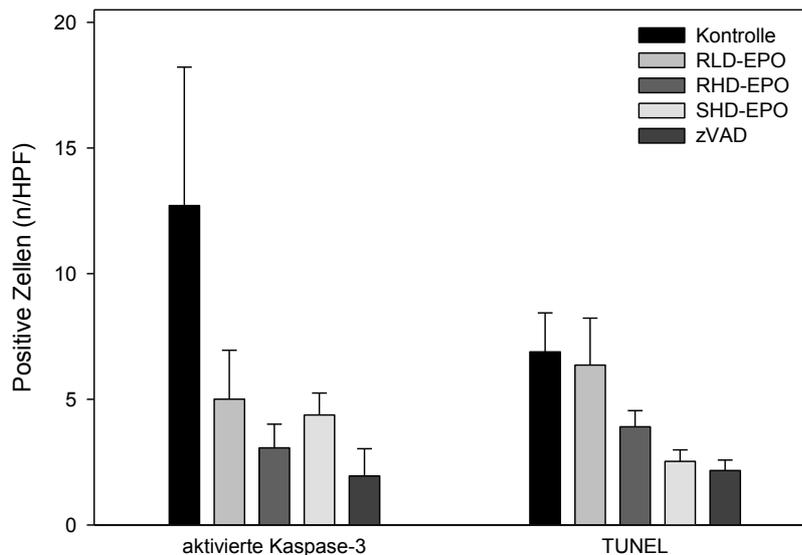


Abbildung 17: Quantitative histologische Analyse apoptotischer Zellen im Granulationsgewebe 12 Tage nach Wundsetzung mittels Nachweis aktivierter Kaspase-3 und TUNEL. Die Tiere wurden täglich entweder mit NaCl (Kontrolle; 0,9% NaCl; 12,5ml/kg KG; n=12), RLD-EPO (400 IE/kg KG; n=8); RHD-EPO (5000IE/kg KG; n=12), oder SHD-EPO, welches einmalig am Tag der Wundsetzung gegeben wurde (5000IE/kg KG; n=7) behandelt. Ergänzend erhielten n=8 Mäuse täglich den Pan-Kaspase-Inhibitor zVAD-fmk (zVAD; 3,3 mg/kg KG). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test.

Die immunhistochemische Analyse von PCNA wies eine hohe Proliferationsaktivität sowohl in den basalen Anteilen des Wundrandes als auch im Granulationsgewebe auf. Hierdurch konnte eine deutliche Demarkierung des regenerierenden Gewebes gegenüber den nichtverwundeten Hautschichten beobachtet werden. Die RHD-EPO-Gruppe wies eine deutlich erhöhte Anzahl proliferierender Zellen im Wundgebiet (40 ± 6 PCNA-positive Zellen/HPF) gegenüber der Kontrolle (18 ± 2 PCNA-positive Zellen/HPF) und zVAD-Exposition (15 ± 1 PCNA-positive Zellen/HPF) auf (s. Anhang).

6.3. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Gefäßreifung

In den elektronenmikroskopischen Analysen der neugebildeten Gefäße im Granulationsgewebe der Kontroll-, RLD-EPO- und SHD-EPO-Gruppe konnten regulär Endothelzellen und Perizyten nachgewiesen werden, welche zudem eine dichte und kompakte Basalmembran, eng anliegend, überzogen (Abb. 18 A,B). Im Gegensatz hierzu zeigten die Gefäße aus Wunden der RHD-EPO Gruppe häufig nur eine solitäre Endothelzellschicht unter Abwesenheit von Perizyten (Abb. 18 C,D). Wenn Perizyten diese Gefäße umgaben, dann konnte meist nur ein lockerer Kontakt zu den Endothelzellen beobachtet werden (Abb. 18 D). Zusätzlich fehlte in diesen Wunden häufig die Basallamina, was die These einer durch RHD-EPO vermittelten Verzögerung der Gefäßmaturierung unterstreicht (Abb. 18 D).

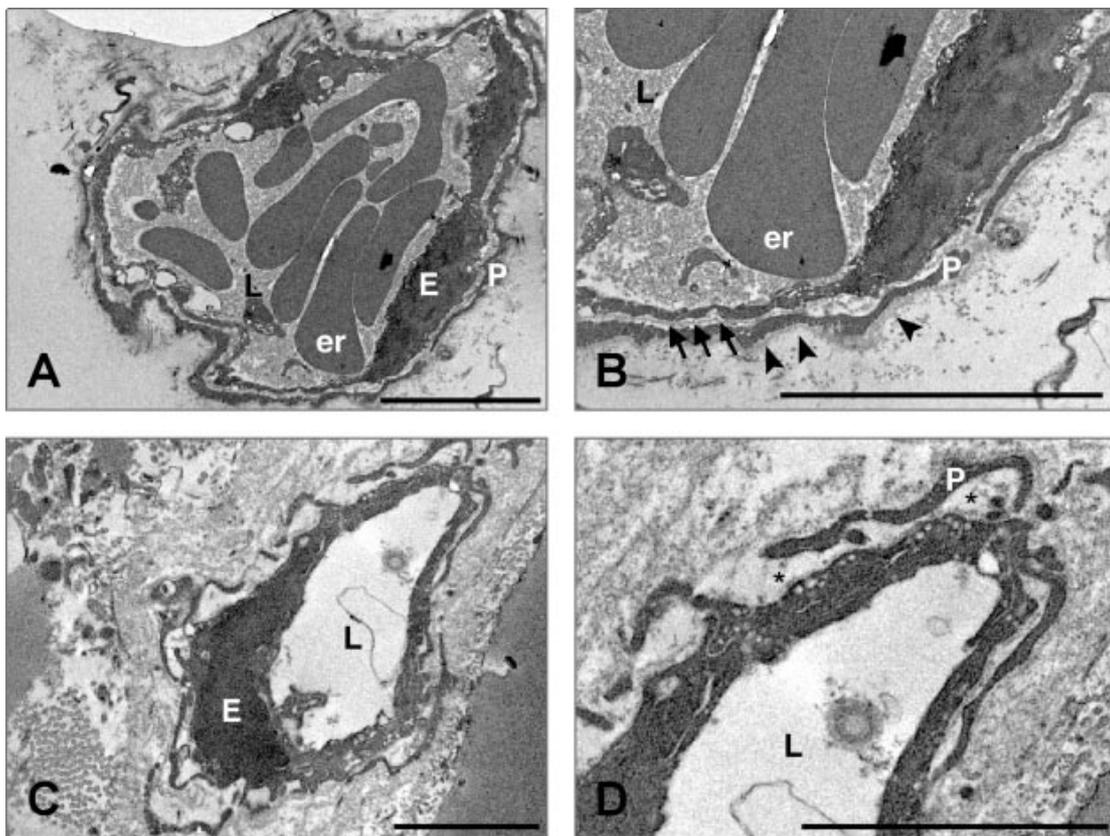


Abbildung 18: Repräsentative Bilder der transmissionselektronenmikroskopischen Analyse neugebildeter Gefäße im Granulationsgewebe eines Versuchstiers der RLD-EPO Gruppe (A,B) sowie der RHD-EPO-Gruppe (C,D). In Bild B ist eine normale Gefäßmaturierung mit Ausbildung einer Basalmembran (Pfeile) und Perizytenüberzug abgebildet (B), während in Bild D die Perizyten nur einen losen Kontakt (Sternchen) zu den Endothelzellen vorweisen. Zudem zeigen die Perizyten der mit RLD-EPO behandelte Maus (A,B) sowohl einen luminalen (Pfeile) als auch abluminalen (Pfeilspitzen) Überzug mit einer Basalmembran. E, Endothelzelle; P, Perizyt; er, Erythrozyt, L, Lumen, Skalierungsbalken=5µm (A,B); 2µm (C,D).

6.4. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Zellmigration und Zellproliferation

Das Migrationsverhalten von Fibroblasten und Keratinozyten, welches mittels des Wound Scratch Assays analysiert wurde, zeigte in beiden untersuchten Zelllinien in allen Versuchsgruppen einen kontinuierlichen Wundverschluss über 72 h (Abb. 19 A,B). Hierbei ließen die Fibroblasten unter Kontrollbedingungen einen Verschluss der initialen Wundfläche von 61 ± 2 % und die Keratinozyten von 76 ± 3 % am Ende des Versuchszeitraums erkennen (Abb. 19 A,B). Erwartungsgemäß erwiesen sich bFGF bzw. KGF als stark pro-migratorische Zytokine, sichtbar am signifikant schnelleren Wundverschluss gegenüber 10 % FCS (Abb. 19 A,B).

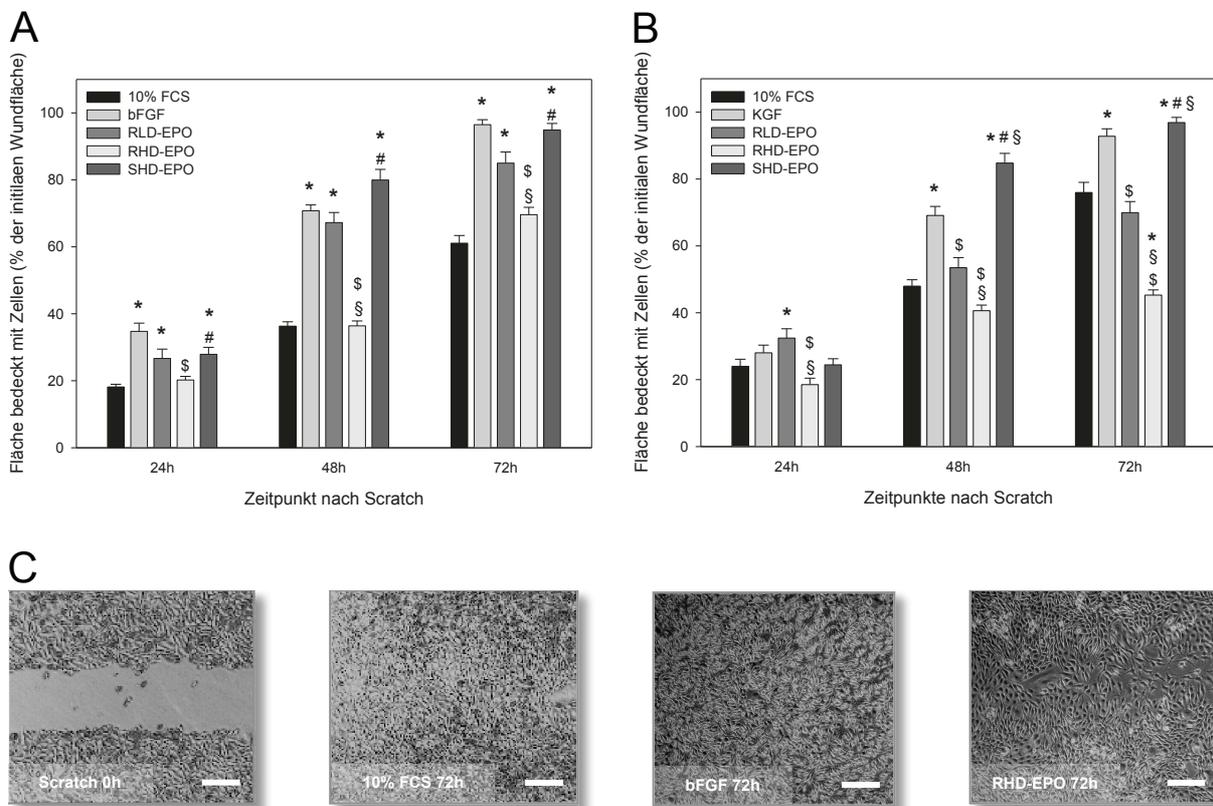


Abbildung 19: Quantitative Erfassung der *in vitro* Zellmigration über 72h mittels Wound-Scratch-Assay an Fibroblasten (L929) (A) und Keratinozyten (HaCaT) (B) sowie repräsentative Bilder (C). Die Zellen wurden entweder mit 10% FCS, 20ng/ml bFGF (nur Fibroblasten), 10ng/ml KGF (nur Keratinozyten), 5IE/ml EPO (RLD-EPO), 50IE/ml EPO (RHD-EPO) oder entsprechend einer initialen Gabe von 50IE/ml EPO mit anschließender Entfernung des Mediums nach 24h und Exposition von 10% FCS (SHD-EPO). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. Skalierungsbalken=400 μ m. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; # $p < 0.05$ vs. RHD-EPO; § $p < 0.05$ vs. RLD-EPO; § $p < 0,05$ vs. bFGF oder KGF.

Bemerkenswerterweise stellte sich die einmalige Hochdosis-Gabe von EPO an Tag 0 als gleichermaßen effektiv heraus, die Migration von Fibroblasten und Keratinozyten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant zu verbessern (*Abb. 19 A,B*). Darüber hinaus konnte RLD-EPO die Migration nur von Fibroblasten signifikant beschleunigen (*Abb. 19 A*). Im Gegensatz hierzu resultierte die wiederholte Hochdosis-Applikation von EPO in einer signifikanten Verschlechterung des *in vitro* Wundverschlusses bei beiden untersuchten Zelllinien (*Abb. 19 A,B*).

Das Proliferationsverhalten von Fibroblasten und Keratinozyten bei verschiedenen EPO-Dosierungen konnte mit dem WST-1 Assay eindeutig analysiert werden. So wiesen die Fibroblasten eine deutlich erhöhte Zellteilungsrate unter Zugabe von RLD-EPO auf, welche sogar die Werte der Positivkontrolle (bFGF) übertraf (*s. Anhang*). Interessanterweise tendierte das Proliferationsverhalten unter RHD-EPO auf Kontrollniveau (*s. Anhang*). Insgesamt konnte ein signifikanter Anstieg aller Versuchsgruppen gegenüber der Negativkontrolle (kein FCS) festgestellt werden (*s. Anhang*). Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zugabe von EPO und 10 % FCS nachgewiesen werden (*s. Anhang*).

Die Analyse des Proliferationsverhaltens der Keratinozyten zeigte erstaunlicherweise in der RHD-EPO- und RLD-EPO-Gruppe deutlich erhöhte Werte gegenüber der Kontrolle auf (*s. Anhang*). Auch hier konnten gleichermaßen, wie bei den Fibroblasten, die Zellteilungsraten der Positivkontrolle (bFGF) eindeutig übertroffen werden (*s. Anhang*). Die Negativkontrolle (kein FCS) wies erwartungsgemäß die niedrigste Proliferationsrate auf und hob sich im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen signifikant ab (*s. Anhang*).

6.5. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf das systemische Blutbild

Das aus den Versuchstieren entnommene venöse Blut zeigte in der Kontroll- sowie zVAD- und SHD-EPO-Gruppe physiologische Werte im Bereich der Erythrozytenzahl, des Hämoglobins und Hämatokrits (*Abb. 20 A,B,C*). Tiere, welche mit einer wiederholten niedrigdosierten oder hochdosierten EPO-Gabe behandelt wurden, ließen hingegen einen signifikanten dosisabhängigen Anstieg der Werte für Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit erkennen (*Abb. 20 A,B,C*). Zu betonen ist hier-

bei, dass besonders die Applikation von RHD-EPO in einer deutlichen Veränderung der Rheologie resultierte, sichtbar an einer starken Erythrozytose mit Werten von $13,0 \pm 0,1$ sowie einer Hämatokrienerhöhung auf $82 \pm 0,01$ % (Abb. 20 A,B). Darüber hinaus konnte in allen mit EPO behandelten Gruppen interessanterweise ein gegenüber der Kontrolle und zVAD signifikanter Anstieg der Leukozyten beobachtet werden (Abb. 20 D).

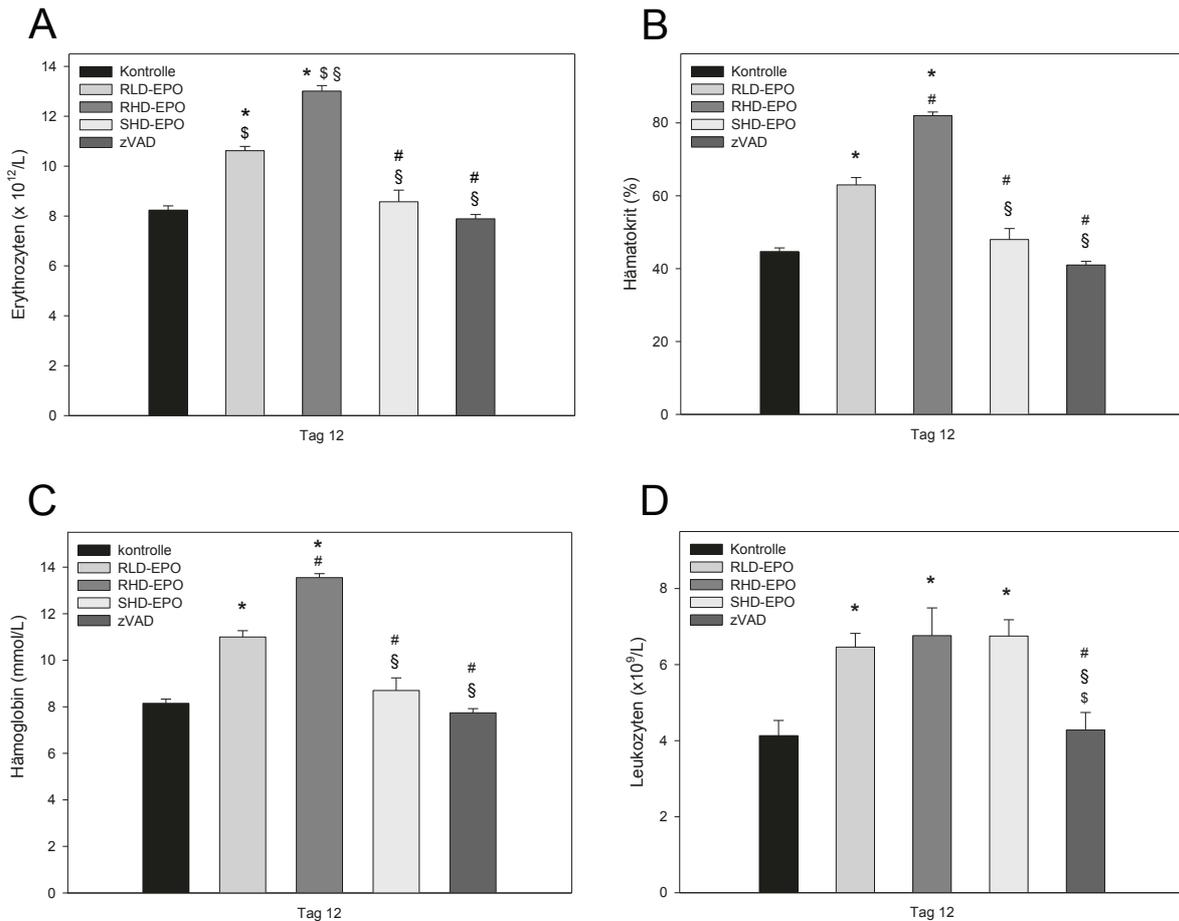


Abbildung 20: Quantitative Analyse der Blutbilder 12 Tage nach Wundsetzung. Die Tiere wurden täglich entweder mit NaCl (Kontrolle; 0,9% NaCl; 12,5 ml/kg KG; n=12), RLD-EPO (400 IE/kg KG; n=8); RHD-EPO (5000 IE/kg KG; n=12), oder SHD-EPO, welches einmalig am Tag der Wundsetzung gegeben wurde (5000 IE/kg KG; n=7) behandelt. Ergänzend erhielten n=8 Mäuse täglich den Pan-Kaspase-Inhibitor zVAD-fmk (zVAD; 3,3 mg/kg KG). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. RLD-EPO; \$ $p < 0,05$ vs. RHD-EPO, § $p < 0,05$ vs. SHD-EPO.

7. DISKUSSION

7.1. Diskussion von Material und Methodik

7.1.1. Diskussion des Modells

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten anhand des neuen Modells der Hautwundheilung in der Rückenhautkammer der haarlosen SKH-1 Maus die Effekte von EPO auf den Prozess der Wundheilung der Haut sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch untersucht werden. Neben der direkten Visualisierung der Revascularisierung und Neoangiogenese der sich regenerierenden Haut mittels Intravitalmikroskopie konnte die Blutfließgeschwindigkeit, der Gefäßdurchmesser und die funktionelle Kapillardichte quantitativ und qualitativ erfasst werden. Hierfür wurden die Wunden entsprechend der neuformierten Gefäßarchitektur in drei Untersuchungsbereiche eingeteilt (s. *Abb. 7 A*). Der entscheidende Vorteil dieses neuen Tiermodells besteht in der repetitiven und reproduzierbaren Analysemöglichkeit der Revascularisierung der heilenden Wunde unter Ausschluss einer Manipulation durch das Versuchstier (*SORG et al. 2007*).

7.1.1.1. Historie des Modells

Seit mehr als sieben Jahrzehnten ist die Implantation von Kammern im Tierversuch zum Zweck der mikroskopischen und mikrozirkulatorischen Untersuchung eines der etabliertesten Modelle der medizinischen Forschung. Während der letzten Jahrzehnte wurden eine Vielzahl von *in vivo* als auch *in vitro* Modellen zur Analyse des Wundheilungsprozesses vorgestellt, wobei nur wenige eine direkte mikrozirkulatorische Untersuchung der regenerierenden Hautwunde zulassen (*SORG et al. 2007*). Neben Modellen mit einfachen Hautwunden von voller dermaler Dicke (*GALIANO et al. 2004, MICHAELS et al. 2007; JACOBI et al. 2002; WONG et al. 2011*), Modellen zur Untersuchung ischämischer Hautlappen (*CHANG et al. 2007; CERADINI et al. 2008; CHANG et al. 2010; WONG et al. 2011*), Druckulzera (*REID et al. 2004; SAITO et al. 2008, WONG et al. 2011*) oder Hauttransplantaten (*GEER et al. 2004; GUERRET et al. 2003; WONG et al. 2011*) erwies sich die Rückenhautkammer als zuverlässige und vergleichbare Methode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der Wund-

heilung. Im Jahre 1924 wurde zum ersten Mal durch *SANDISON* eine transparente Untersuchungskammer in ein Kaninchenohr implantiert. Dies ermöglichte erstmals das Studium von Wachstum und Verhalten lebender Zellen durch die Intravitalmikroskopie (*SANDISON et al. 1928*). Um die Implantation zu erleichtern und die Bildqualität zu erhöhen, wurde diese Technik in den darauf folgenden Jahren durch viele Modifikationen erweitert (*ALGIRE 1943; ARFORS et al. 1970*). Die erstmalige Anwendung der Kammertechnik auf die Maus, zur Untersuchung des Wachstums und der Vaskularisierung von Tumorgewebe, erfolgte durch *ALGIRE 1943*. Ein großer Nachteil dieser Methode war jedoch, dass sich das Gewebe, was in der Kammer untersucht werden sollte, hauptsächlich aus Granulationsgewebe der parallel ablaufenden physiologischen Wundheilung zusammensetzte. Somit wurden Studien zur Neoangiogenese von Tumoren in der Ohrkammer durch die zusätzlich stattfindenden revaskularisierenden Prozesse beeinflusst (*MENGER et al. 2002; LASCHKE et al. 2011*).

Unter Verwendung der dorsalen Hautdoppelschicht als Ort der Kammerimplantation konnten die Angiogenese und Bildung von Granulationsgewebe im Untersuchungsgebiet minimiert werden. Nach der erstmaligen Einführung dieser Technik auf Ratten (*PAPENFUSS et al. 1979*) und Hamster (*ENDRICH et al. 1980*) erfolgte die Anwendung der Rückenhautkammer auf die Maus durch *LEHR et al. 1993* (*LEHR et al. 1993; LASCHKE et al. 2011*).

Das in dieser Präparationsmethode zu untersuchende Gewebe besteht aus quergestreifter Muskulatur (*Panniculus carnosus*), Subkutis und Kutis. Neben der *in vivo* Analyse von Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion, der Gefäßpermeabilität, Genexpression, Zellmigration und Gewebeoxygenierung bietet diese Methode auch die Möglichkeit, zelluläre Apoptose und Nekrose im Untersuchungsgebiet darzustellen (*MENGER et al. 2002*). Aufgrund dieses weiten Anwendungsspektrums ist die Rückenhautkammer in der Maus ein ideales Modell zum Studium der Mechanismen während der Wundheilung, des Tumorwachstums, von Ischämie und Hypoxie, von Organtransplantation sowie in der Biomaterialforschung und des Tissue Engineerings (*MENGER et al. 2002*). Heutzutage ist die Rückenhautkammer in der Maus das am häufigsten verwendete chronische Modell zur Untersuchung von Angiogenese und Mikrozirkulation durch repetitive Intravitalmikroskopie (*MENGER et al. 2002*).

7.1.1.2. Versuchstiere

Die haarlose SKH-1-*hr* Maus stellt für die Analyse von Wundheilungsprozessen ein ideales Versuchstier dar. Aufgrund der fehlenden Haare und leeren Haarfollikel ist eine exakte mikrovaskuläre Beurteilung insbesondere der Wundränder und Wundperipherie möglich. Die SKH-1 Mäuse mit dem Merkmal *hr/hr* werden mit vollem Haarkleid geboren, verlieren jedoch die Haare von kranial nach kaudal bis zum 20. Lebenstag. Dies erspart die Entfernung der Haare mittels Rasierer und chemischer Epilation. Da es hierbei oft zu Mikrotraumen der Haut kommen kann, stellt die präexistente Haarlosigkeit einen großen Vorteil dar. Üblicherweise kommt es auch zur Ausbildung von follikulären Zysten auf der Haut. Die Mäuse sind euthym und voll immunkompetent, haben allerdings gegenüber ihren behaarten Artgenossen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen und eine erhöhte Anfälligkeit für traumatische Schädigungen der Haut. Dies verlangt eine angepasste und sorgfältige Tierhaltung.

7.1.1.3. Anästhesie

Die quantitative und qualitative Analyse der kutanen Wundheilung mittels Stereo- und Intravitalmikroskopie setzt aufgrund der hohen Präzision der Aufnahmen ruhige Untersuchungsbedingungen voraus. Dafür ist eine Narkose des Versuchstiers, wie hier mittels Ketamin/Xylazin, unvermeidlich.

Die durch Ketamin verursachte dissoziative Anästhesie beschreibt einen Bewusstseinszustand, in dem sich gewisse Bereiche des ZNS im Zustand der Inhibition und andere im Zustand der Exzitation befinden. In diesem Zusammenhang zeigen sich Narkosequalitäten wie Analgesie, d.h. die Ausschaltung des Schmerzempfindens, sowie die Anästhesie, d.h. die Aufhebung des Bewusstseins. Gleichzeitig kommt es aufgrund der erregenden Eigenschaften von Ketamin zu einer motorischen Starre (Katalepsie). Aufgrund der geringen kardiopulmonalen Beeinträchtigung der Versuchstiere sowie der während der Narkose erhaltenen Schutzreflexe eignet sich Ketamin hervorragend für Kurznarkosen ohne signifikante Beeinflussung des Untersuchungsergebnisses. Eine Störung der vitalen Funktionen des Versuchstiers durch Ketamin wie z. B. Atemdepression, Hypoxämie und Hyperkapnie, werden erst in ho-

hen Dosen und bei intravenöser Applikation klinisch relevant (CARROLL & HARTSFIELD 1996).

Der α_2 -Rezeptoragonist Xylazin ist ein Myorelaxans, welches zudem auch eine sedativ-hypnotische Wirkung auf den Kreislauf des Versuchstiers besitzt. Diese kann von Tierart zu Tierart unterschiedlich ausgeprägt sein. Da die Wirkung von Xylazin durch exogene Störungen und Stress negativ beeinflusst wird, sollten die Versuchstiere bis zum Wirkungseintritt nicht durch haptische oder akustische Reize gestört werden. Für Xylazin wurden in der Vergangenheit Nebenwirkungen wie z. B. Bradykardien (WRIGHT 1982), AV-Blöcke 2. Grades (ALEF & OECHTERING 2008), ein Abfall des Herzminutenvolumens (MUIR *et al.* 1979) und eine Verringerung der Inotropie (BENSON & THURMON 1990) beschrieben.

7.1.1.4. Vergleich anderer Modelle

Eine Einteilung der experimentellen Wundheilungsmodelle kann in akute und chronische Wundmodelle erfolgen. Akute Modelle zeichnen sich durch eine schnelle Zuführung von entweder Schnitt- oder Defektwunden und eine ebenso rasche Gewebsregeneration aus, ohne eine präexistente Beeinträchtigung des Versuchorganismus. Sie sollen die akute Gewebstraumatisierung während eines chirurgischen Eingriffs oder eines akuten Unfalls simulieren (DAVIDSON 1998).

Die Verletzung der Haut z. B. mit einer scharfen Klinge resultiert in einer schnellen, lokal begrenzten Zerstörung der kutanen Integrität ohne ausgedehnte Kollateralschäden zu verursachen oder Gewebe zu entfernen. Als Folge kommt es zu einer raschen Extravasation und Einschwemmung von Plasma und Blutzellen in die Wunde. Nach erfolgter Hämostase kommt es dann konsekutiv zur Formierung eines Blutkoagels und damit eines temporären Wundverschlusses. Andere dermale Traumen, beispielsweise hervorgerufen durch Elektrokauter oder laserchirurgische Instrumente, verursachen weniger Exsudation aber dafür größere Kollateralschäden im umliegenden Gewebe. Das Ausmaß der bei akuten Traumen erzeugten Wundgröße ist unter anderem abhängig von der Menge an subkutanem Fettgewebe, der dermalen Retraktionskräfte im Wundgebiet sowie der untersuchten Spezies. Tiere mit einer mobilen Haut über der subkutanen Faszie wie z. B. Nagetiere und Hunde reagieren auf dermale Traumen mit einer initial größeren Klaffung der Wunde als beispielsweise der Mensch oder das Schwein. Bei diesen höherentwickelten Spezies führt ein

Trauma zu einer geringeren Wundgröße, da die Haut mit den subkutanen Strukturen verwachsen ist und damit eine geringere Verschieblichkeit aufweist (*DAVIDSON 1998*).

Des Weiteren kann zwischen Modellen der primären und sekundären Wundheilung unterschieden werden. Bei Versuchsanordnungen mit primärer Wundheilung kommt es nach Wundsetzung zu einem mechanischen Verschluss der Wunde z. B. mittels adaptierender Hautnaht, zur Minimierung der Gewebslücke und Forcierung der Heilung. Aufgrund der dadurch bedingten geringen Ausbildung von Granulationsgewebe eignen sich diese Wunden nicht für histologische Analysen, dafür aber hervorragend für biomechanische Untersuchungen (*DAVIDSON 1998*).

Experimentelle Modelle mit sekundärer Wundheilung, d.h. ohne mechanische Readaptation der erzeugten Wundränder, resultieren konsekutiv in einem ausgeprägteren Fibrinkoagel, Granulationsgewebe und einer höheren zu überbrückenden Distanz im Rahmen der Re-Epithelialisierung. Hier spielt besonders bei Nagetieren die Wundkontraktion eine entscheidende Rolle. Durch sie werden die initialen Wundränder einander angenähert und damit die Distanz zur epithelialen Deckung verringert. Diese Tatsache erschwert die Vergleichbarkeit von Modellen am Nagetier zum Menschen besonders bei der Analyse der Re-Epithelialisierung (*DAVIDSON 1998*).

Bei Tiermodellen mit Defektwunden werden lokale Traumata mit teilweiser oder vollständiger Entfernung von Hautgewebe durchgeführt. Die entstandene Gewebslücke führt zu einer ausgeprägteren Bildung von Granulationsgewebe als es bei lokalen Schnittwunden der Fall ist. Dementsprechend sind Defektwunden für intravitalmikroskopische, histologische und biochemische Analysen ideal. Ein großer Vorteil dieser Defektwunden besteht außerdem in der Möglichkeit der Okklusion der Wunde, um eine feuchte Wundheilung zu simulieren oder z. B. die topische Applikation von Testsubstanzen durchzuführen (*BREUING et al. 1992*). Weiterhin kann mithilfe des in diesem Modell verwendeten geschlossenen Kammersystems eine Affektion der Wunde durch das Versuchstier verhindert werden (*SORG et al. 2007*). Die in dieser Studie durchgeführte chirurgische Präparation der Wunde mit voller dermalen Dicke stellt aufgrund der sukzessiven Exzision der einzelnen Hautschichten die gründlichste und reproduzierbarste Methode der Wundsetzung dar. Andere Wundheilungsmodelle, welche z. B. mit standardisierten Biopsiestanzen arbeiten (*SABA et al. 2002*), haben den entscheidenden Nachteil, dass die Tiefe des gesetzten Defekts nur unzu-

reichend gesteuert werden kann. Lediglich die Wundgröße ist annähernd konstant und vergleichbar.

Da die Haut von Nagetieren im Gegensatz zum Menschen eine dünne subkutane Muskelschicht (*Panniculus carnosus*) aufweist, reagiert diese auf Wunden, die die volle dermale Dicke umfassen, mit einer Wundkontraktion. Dies ist jedoch im Rahmen der experimentellen Analyse der Wundheilungsprozesse ein entscheidender Nachteil, da eine vergleichbare Beurteilung der sekundären Wundheilung unter den Versuchstieren aber vor allem in Bezug auf den Menschen nicht möglich ist. Dies führte auf Basis der Modelle der offenen Rückenhautwunde zur Entwicklung von Hilfsmitteln zur mechanischen Retraktion der Wundränder (sog. *splinted full thickness wound models*) (*GALIANO et al. 2004; WONG et al. 2011*). Hiermit konnte eine Wundkontraktion verhindert und damit die sekundäre Heilung der Wunde besser untersucht werden (*GALIANO et al. 2004*).

Als Weiterentwicklung der bisherigen Wundheilungsmodelle bietet die Rückenhautkammer in der haarlosen Maus ebenfalls eine Ausschaltung der Wundkontraktion durch die Fixierung der Haut mittels Implantation von zwei Titanrahmen. Damit kann ein Annähern der Wundränder durch Myofibroblastenkontraktion verhindert und die untersuchte Re-Epithelialisierung alleinig auf die Keratinozytenmigration zurückgeführt werden (*SORG et al. 2007*). Darüber hinaus sind mit dieser neuen Methode repetitive intravitalfluoreszenzmikroskopische Analysen von identischen mikrovaskulären Segmenten als auch der Makroskopie der Wunde über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen möglich. Angesichts des physiologischen Ablaufs der kutanen Defektdeckung zeigt sich diese Zeitspanne als ideal zur vollständigen Abbildung der mikrovaskulären Wundheilungsprozesse. Allerdings ist jedoch für jede Untersuchung eine erneute Narkose des Versuchstiers notwendig und jede Analyse mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) schließt die Applikation von potentiell toxischen Farbstoffen ein. Dementsprechend muss zur Erholung des Versuchstiers eine gewisse Karenzzeit zwischen den Analysen eingehalten werden.

7.1.1.5. z-VAD-fmk

Um Effekte von EPO auf apoptotische Vorgänge in der maturierenden Hautwunde zu evaluieren, wurde in dieser Studie vergleichend zu EPO der zellgängige Breitspektrum-Kaspase-Inhibitor z-VAD-fmk appliziert. z-VAD-fmk besitzt ein Moleku-

largewicht von 453,5 Da und gehört zu den synthetischen Peptidinhibitoren. Er enthält die für Kaspasensubstrate obligate Aminosäure Aspartat am C-Ende des Peptids. Die vierte Aminosäure in der Peptidkette ist durch den Benzyloxycarbonylrest ersetzt, wodurch z-VAD-fmk unspezifisch an die aktiven Zentren von allen bisher bekannten Kaspasen binden kann. Die Fluoromethylgruppe bindet kovalent an das aktive Zentrum der jeweiligen Kaspase und führt zu einer sofortigen und irreversiblen Hemmung der Kaspaseaktivität (GARCIA-CALVO *et al.* 1998; BORNER *et al.* 1999). Damit stellt z-VAD-fmk ein ideales Werkzeug zur Evaluierung apoptotischer Vorgänge dar (VAN NOORDEN 2001).

7.1.2. Diskussion der Untersuchungstechniken

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie angewendet, da sie für die qualitative und quantitative Analyse der mikrovasculären Wundheilungsprozesse eine ideale Technik darstellt.

Neben indirekten Methoden zur Beurteilung der Mikrozirkulation, wie beispielsweise der Mikrosphärentechnik (PHIBBS *et al.* 1967), der Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs (KESSLER *et al.* 1976; CONZEN *et al.* 1988; VOLLMAR *et al.* 1992), der Xenon-Clearance-Technik (HENDEL 1983), der photochemischen Plethysmografie (WEBSTER & PATTERSON 1976), der Laser-Doppler-Flowmetrie (VOLLMAR *et al.* 1994; CHAVEZ-CARTAYA *et al.* 1995) oder verschiedener Farbstofftechniken (ELIAS & PETTY 1953), besitzt die in dieser Studie genutzte intravitale Fluoreszenzmikroskopie den entscheidenden Vorteil der direkten Visualisierung des Gefäßnetzwerks. Dies ist gerade in Bezug auf die adäquate Charakterisierung der Architektur bzw. von Maturationprozessen des Gefäßsystems in der heilenden Wunde von wesentlicher Bedeutung.

Der entscheidende Prozess im Ablauf der Wundheilungskaskade und die primäre Intention des Organismus nach Wundsetzung ist die rasche Wiederherstellung der dermalen Integrität durch Migration und Proliferation von Fibroblasten und Keratinozyten zum Verschluss der Wunde. Es gibt eine Vielzahl von etablierten *in vitro* Assays, die das Migrations- und Proliferationsverhalten von Fibroblasten und Keratinozyten unter variablen Bedingungen untersuchen lassen (STATON *et al.* 2004). Neben anderen Methoden, wie dem Auszählen der Zellen als direktes Maß der Proliferation, dem durchflusszytometrischen Nachweis der DNA-Synthese mittels

BrdU-Assay als indirekter Parameter der Proliferationsaktivität (BÖHMER 1982) oder der Boyden-Kammer (BOYDEN 1962) als Migrationsassay, haben sich der in dieser Studie verwendete Wound Scratch Assay und der WST-1-Assay als besonders geeignet erwiesen, das Migrations- und Proliferationsverhalten sowohl von Fibroblasten als auch Keratinozyten unter EPO-Applikation zu untersuchen. Der Vorteil dieser beiden Assays liegt neben der guten Reproduzierbarkeit in der einfachen Handhabung bei hoher Aussagekraft.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

EPO hat das Potential, viele Prozesse in der Geweberegeneration zu fördern. Dies deutet darauf hin, dass es eine mögliche Rolle in der Förderung der dermalen Wundheilung haben könnte. Die vorliegende Studie ist die erste, in der unter identischen experimentellen Bedingungen die regenerativen Effekte wiederholter systemischer, niedrig (RLD-EPO) und hoch (RHD-EPO) dosierter EPO-Applikation wie auch der initialen einmaligen Hochdosierung (SHD-EPO) auf die entscheidenden Vorgänge im Rahmen der Wundheilung untersucht wurden.

7.2.1. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Re-Epithelialisierung

Der rasche Verschluss eines Hautdefekts durch Re-Epithelialisierung stellt für den Organismus einen entscheidenden Prozess dar, um sich vor Infektionen und anderen exogenen Noxen zu schützen. Hierfür ist ein genau reguliertes Zusammenspiel verschiedener Zellen und Mediatoren essentiell. Das pleiotrope Wirkprofil von EPO, welches bislang mit anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen und zytoprotektiven Eigenschaften charakterisiert wurde, könnte in diesen komplexen Vorgang entscheidend eingreifen und ihn beschleunigen.

FATOUROS et al. konnten bereits Ende der 1990er Jahre zeigen, dass EPO *in vivo* die Heilung von intestinalen Anastomosen in Wistar-Ratten signifikant verbessern konnte. Im Rahmen ihrer Studie zeigte sich in den mit EPO behandelten Tieren eine deutlich erhöhte Wundzugfestigkeit gegenüber unbehandelten Tieren. Sie schlussfolgerten daraus, dass der protektive Effekt von EPO neben der besseren Sauerstoffbereitstellung im Wundgebiet durch den erhöhten Hämatokrit, aber auch durch eine EPO-vermittelte pro-mitogene Wirkung auf die bei der Wundheilung beteiligten Zelltypen zurückzuführen ist. Gleichsam postulierten sie in diesem Zusam-

menhang, dass die Effekte Zeichen einer direkten Wirkung von EPO als Wachstumshormon auf verschiedene Rezeptoren sein könnten (*FATOUROS et al. 1999*). Interessanterweise untersuchten *FATOUROS et al.* ebenfalls die simultane Behandlung sowohl mit EPO als auch mit GM-CSF, um die Heilung der Wunden zu beschleunigen. Allerdings zeigte sich in diesen Versuchen, dass GM-CSF vermutlich die EPO-vermittelten protektiven Wirkungen hemmt, was auf eine kompetitive Interaktion beider Substanzen an den selben Rezeptor hinweist (*FATOUROS et al. 1999*). *HAROON et al.* waren die Ersten, die einen Einfluss von EPO auf die fibrin-induzierte Wundheilung *in vivo* nachweisen konnten. Sie implantierten hierfür kleine mit Fibrin befüllte Kammern in das subkutane Gewebe von Ratten und beobachteten die sukzessive Ausbildung des Granulationsgewebes unter verschiedenen lokalen EPO-Konzentrationen. Hier zeigte sich bereits eine dosisabhängige Beschleunigung der Ausbildung von Granulationsgewebe in der Fibrinmatrix mit einer deutlich erhöhten Angiogenese unter EPO-Administration gegenüber den Kontrollen. In derselben Studie konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die Ausschaltung von EPO durch einen löslichen EPO-R und EPO-Antikörper die Wundheilung respektive Bildung von Granulationsgewebe verlängert. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass ein System aus EPO und EPO-R ein wichtiger Teil der Wundheilungskaskade mit vor allem pro-mitogenen und pro-angiogenen Wirkungen sein könnte (*HAROON et al. 2003*). Diese positiven Effekte von EPO auf die Wundheilung konnten *GALEANO et al.* ebenfalls auf die Re-Epithelialisierung beobachten. In einer *in vivo* Studie zur Heilung von Verbrennungswunden konnten sie zeigen, dass die re-epithelialisierte Wundfläche zum Ende des Versuchs in EPO behandelten Tieren signifikant größer war und vor allem die Geschwindigkeit des Wundverschlusses deutlich höher als bei den Kontrolltieren war (*GALEANO et al. 2006*).

Die vorliegende Studie in der Rückenhautkammer der haarlosen Maus zeigte in der planimetrischen Auswertung der Re-Epithelialisierung ebenfalls eine dosisabhängige Beschleunigung der Wundheilung durch EPO-Administration, sichtbar am schnellen und suffizienten Wundverschluss bei einmaliger Hochdosierung (SHD-EPO) und der signifikant verzögerten Defekdeckung durch kontinuierliche Hochdosierung (RHD-EPO) über den gesamten Versuchszeitraum von 12 Tagen. Interessanterweise zeigte die Gabe des Pan-Kaspase-Inhibitors zVAD eine deutliche Verlangsamung der Re-Epithelialisierung, was analog zu den Ergebnissen der RHD-EPO Gruppe einerseits das anti-apoptotische Wirkprofil von EPO hervorhebt und

gleichzeitig die Wichtigkeit apoptotischer Vorgänge während der Defektdeckung betont.

BROWN et al. konnten 1997 zeigen, dass die apoptotischen Vorgänge während der Re-Epithelialisierung hauptsächlich im Bereich des Wundrandes stattfinden und hier durch programmierten Zelltod von Leukozyten die Entzündungsphase sukzessive beendet wird und damit der Progress in die nächste Wundheilungsphase stattfinden kann (*BROWN et al. 1997*). In dieser Studie zeigte sich auch in Wunden von diabetischen Mäusen eine deutlich verringerte Apoptoseaktivität mit einer verlängerten Entzündungsphase und konsekutiv verzögerter Re-Epithelialisierung. Interessanterweise konnte die topische Applikation einer Kombination von IGF-II und PDGF diese Verzögerung aufheben (*BROWN et al. 1997*). *BROWN* et al. stellten daraufhin die These auf, dass es vermutlich einen epithelialen, anti-inflammatorischen Faktor geben könnte, der die physiologischen Prozesse am Wundrand reguliert. Möglicherweise ist in der vorliegenden Studie SHD-EPO in der Lage, durch einen frühen regenerativen Stimulus die initiale Entzündungsphase zu verkürzen, ohne die später stattfindenden apoptotischen Vorgänge am Wundrand zu beeinflussen. Die dauerhafte Inhibition der Apoptose durch RHD-EPO und zVAD könnte hingegen die Beendigung der Entzündungsphase durch programmierten Zelltod von Leukozyten und damit Freigabe des Migrationspfades für Keratinozyten und Fibroblasten deutlich protraahieren, sichtbar an der signifikanten Verzögerung der Re-Epithelialisierung in diesen Versuchsgruppen (*BROWN et al. 1997; GHEZZI et al. 2004; SORG et al. 2012*).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Re-Epithelialisierung von dermalen Wunden sind die präexistenten Haarfollikel. *JAHODA* et al. stellten 2001 die These auf, dass epidermale Stammzellen, welche den Haarfollikel ummanteln, möglicherweise die Fähigkeit besitzen, sich in Fibroblasten zu differenzieren und damit den Defektverschluss nach Trauma beschleunigen (*JAHODA et al. 2001*). *LEVY* et al. konnten schließlich zeigen, dass nach Traumatisierung der Haut mit konsekutiver Defektbildung und Vorhandensein von Haarfollikeln sowohl epidermale als auch follikuläre Keratinozyten zur Wundheilung rekrutiert werden und beide zusammen zum schnellen Verschluss der Wunde beitragen (*LEVY et al. 2007*). Interessanterweise wiesen *BODÓ* et al. 2007 nach, dass humane Haarfollikel sowohl in der Lage sind, EPO zu produzieren als auch den EPO-R exprimieren und damit einerseits einer Regulation durch EPO unterliegen und andererseits eventuell durch lokale Freigabe von EPO im Wundbett die Wundheilung beschleunigen können (*BODÓ et al. 2007*). Es ist mittler-

weile nachgewiesen, dass Wunden mit intakten Haarfollikeln eine deutlich höhere Re-Epithelialisierungsrate besitzen als bei fehlenden Haarbälgen (*ITO&COTSARELIS 2008*).

Aufgrund der Tatsache, dass die in der vorliegenden Studie verwendeten SKH-1 Mäuse zwar zum Untersuchungszeitpunkt per se haarlos sind, aber sich trotzdem Haarfollikel in der Dermis befinden, könnte sich angesichts der sich dort befindlichen epidermalen Stammzellen eine weitere EPO-regulierte Komponente der Re-Epithelialisierung ergeben. Diese Theorie bedarf jedoch weiterer experimenteller Analysen.

7.2.2. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf mikrovaskuläre Parameter der regenerierenden Hautwunde

Im Prozess der Wundheilung stellt die Revaskularisierung des traumatisierten Gewebes einen wichtigen Schritt dar. Die hierbei einhergehende Angiogenese ist ein komplexer Vorgang, der die genaue Steuerung einer Vielzahl von zellulären als auch molekularen Komponenten zur Wiederherstellung der nutritiven Gewebsperfusion voraussetzt. Endothelzellen aus präexistierenden Blutgefäßen als auch mesenchymale Stammzellen stellen bei der Neubildung von Gefäßen die entscheidenden Hauptakteure dar (*URAO et al. 2006*). *ZWEZDARYK et al.* konnten 2007 *in vitro* zeigen, dass hMSC einerseits den EPO-R exprimieren und auf Stimulation durch EPO mit einer schnelleren Sekretion pro-angiogener Faktoren als auch einer erhöhten Proliferation reagieren (*ZWEZDARYK et al. 2007*). Interessanterweise führte die Gabe von EPO zu einer vermehrten Aktivierung von MMP-2, welche für die infiltrative Proliferation und Migration von Endothelzellen in das Wundgebiet entscheidend ist. Bereits Anfang der 1990er Jahre konnten *ANAGNOSTOU et al.* sowohl die Expression von EPO-R als auch einen pro-mitogenen und pro-proliferativen Einfluss von EPO auf humane Endothelzellen (hEC) nachweisen (*ANAGNOSTOU et al. 1990&1994*). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass EPO einen anti-apoptotischen Effekt auf hEC besitzt und die Produktion von NO über Aktivierung von eNOS fördert (*CARLINI et al. 1999; BELESLIN-COKIC et al. 2004; URAO et al. 2006; BUEMI et al. 2004; REZAEIAN et al. 2010; LEFER et al. 1999*). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass EPO *in vivo* die Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen (EPC) erhöht (*HEESCHEN et al. 2003*), einen pro-angiogenen EC-Phänotyp induziert (*RIBATTI et al. 1999*) und damit z. B. die Revaskularisierung von Wunden diabetischer Mäuse stimuliert (*GALEANO*

et al. 2004). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass auch die Gabe von VEGF die Anzahl von zirkulierenden EPC im Organismus stark erhöht (*KALKA et al.* 2000), wobei EPO mittlerweile als Induktor für VEGF bekannt ist (*GALEANO et al.* 2006). In der vorliegenden Studie zeigte sich in der histologischen Untersuchung von CD-31 unter RHD-EPO eine signifikant erhöhte Mikrogefäßdichte, was auf eine kontinuierliche Stimulation der Revaskularisierung der Wunde durch EPO schließen lässt. Dies zeigte sich ebenfalls dosisabhängig in den mikrovaskulären Parametern der regenerierenden Wunde. Erstmals konnte mit dem in dieser Studie eingeführten Modell die mikrovaskuläre Architektur der heilenden dermalen Wunde unter physiologischen Bedingungen als auch unter verschiedenen EPO-Dosierungen beschrieben werden (*SORG et al.* 2009). Während die Kontrolltiere, wie auch die RLD-EPO als auch SHD-EPO-Gruppe mit einem kontinuierlichen Rückgang der initial hohen FCD als auch der hohen Gefäßkaliber zirkulärer Gefäße reagierten, resultierte regelmäßige hochdosierte Gabe von EPO in einer persistierend hohen FCD mit signifikant erhöhten Gefäßdurchmessern. Dies belegt neben dem ausgeprägten pro-angiogenen und pro-proliferativen Effekt (*IMAMURA et al.* 2008; *FURLANI et al.* 2008; *ARCASOY* 2008) auch die mögliche Inhibition der nötigen Gefäßmaturierung und -regression im Prozess der kutanen Wundheilung durch EPO. Interessanterweise zeigten die mit zVAD behandelten Tiere ebenfalls eine bleibend hohe zirkuläre FCD über den gesamten Versuchszeitraum, was analog zu RHD-EPO auf einen anti-apoptischen Einfluss und Inhibition der Gefäßmaturierung hindeutet (*SORG et al.* 2009). Es konnte diesbezüglich in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass die Gefäßregression eng mit der Apoptose von Endothelzellen verbunden ist (*IM et al.* 2006; *SAUNDERS et al.* 2005). Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass Wundmakrophagen für die Endothelzellapoptose essentiell sind (*LANG et al.* 1993&1994; *LOBOV et al.* 2005). *CONTALDO et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine niedrig dosierte Applikation von EPO vor Setzung eines Traumas in einer ausgeprägten Reduktion infiltrierender F4/80 positiver Makrophagen resultiert (*CONTALDO et al.* 2011). Somit kann postuliert werden, dass eine dauerhafte hochdosierte EPO-Applikation, wie es in der RHD-EPO Gruppe der Fall war, zu einer Verringerung der Anzahl von Wundmakrophagen führt und damit die anti-apoptische Wirkung von EPO auf die Gefäßregression vermittelt. Es konnten in der vorliegenden Studie zwar keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl von F4/80 positiven Wundmakrophagen an Tag 12 festgestellt werden, jedoch ist dies vermut-

lich auf den späten Untersuchungszeitpunkt zurückzuführen. Möglicherweise wären in einer früheren Phase der Wundheilungskaskade (z. B. Tag 3) klarere Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu beobachten.

Die gleichbleibend erhöhten Durchmesser zirkulärer Gefäße in mit RHD-EPO behandelten Tieren könnten auf einen Effekt von EPO auf das Endothel zurückzuführen sein. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass EPO die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) erhöht und damit sowohl die Oxygenierung der Wunde durch Gefäßdilataion verbessert als auch durch Beeinflussung der Leukozyten/Endothelzell-Interaktion die Entzündungsreaktion moduliert (BUEMI *et al.* 2004; REZAEIAN *et al.* 2010; LEFER *et al.* 1999; URAO *et al.* 2006; LINDENBLATT *et al.* 2007). So wiesen REZAEIAN *et al.* 2010 *in vivo* nach, dass die durch EPO-Gabe hervorgerufene eNOS-Expression zu einer signifikanten Gefäßdilataion und dauerhaft erhöhten FCD im Wundbereich führt. Erwartungsgemäß konnte die gleichzeitige Administration von L-NAME, einem unspezifischen NOS-Antagonist, die Effekte von EPO aufheben, sichtbar an einer deutlich verminderten FCD und damit reduzierten nutritiven Perfusion. Interessanterweise konnte in dieser Studie die prätraumatische Gabe von EPO eine frühe Hochregulation von eNOS bewirken und damit die Gewebserfusion posttraumatisch verbessern (REZAEIAN *et al.* 2010).

Aufgrund der hematopoetischen Wirkung von EPO ist die mit einer Erythrozytose einhergehende Erhöhung des Scherstress am Endothel ebenfalls ein starker Stimulus der eNOS und könnte ohne direkten Effekt von EPO auf das Endothel die beobachtete Gefäßdilataion hervorrufen. D'USCIO *et al.* konnten jedoch zeigen, dass die EPO-vermittelte Aktivierung von eNOS bereits in sehr frühen Phasen der Heilung und damit unabhängig vom Scherstress der Gefäße bei hohen Hämatokritwerten stattfindet (D'USCIO *et al.* 2007). Dieser frühe Effekt von EPO auf das Gefäßendothel konnte auch von URAO *et al.* nachgewiesen werden. Nach nur 3 Tagen Behandlung mit EPO konnten sie bereits eine EPO-R-vermittelte Aktivierung der eNOS und gleichzeitig einen anti-apoptotischen Effekt auf MSC nachweisen (URAO *et al.* 2006). Neben der klassischen Angiogenese, ausgehend von präexistenten Wundrandgefäßen, mit Endothelzellproliferation, Budding, Sprouting, und Loop-Formation konnten KILARSKI *et al.* 2009 einen weiteren potentiellen Mechanismus der Gewebservaskularisierung beschreiben. So konnten sie unter anderem zeigen, dass die durch aktivierte Myofibroblasten hervorgerufene Gewebsspannung im Rahmen der Wundkontraktion eine nicht-angiogene Expansion präexistenter Gefäßschleifen in das Granulati-

ongewebe hervorruft. Dies wird charakterisiert mit einer Vergrößerung und Elongation der betreffenden Gefäße sowie mit einer späteren sukzessiven Ausbildung eines physiologischen mikrovaskulären Netzwerks mittels Splitting, Sprouting und Regression einzelner Kapillaren (KILARSKI *et al.* 2009). Die mit dieser Beobachtung einhergehende Theorie, warum frühzeitig große funktionelle Gefäße im Granulationsgewebe der heilenden Wunde erscheinen, könnte auch eine Erklärung für die in der vorliegenden Studie gezeigten erhöhten zirkulären Gefäßdurchmesser in den ersten Tagen nach Wundsetzung sein. Gleichwohl könnten die hier beobachteten radiären Gefäße präexistente Gefäße darstellen, die angesichts lokaler Wundkontraktionen elongiert werden und sternförmig auf das Spannungszentrum zulaufen. Diese Theorie stellt sicherlich einen interessanten Ansatz für weitere experimentelle Studien dar, um das genaue Zusammenspiel von Angiogenese und vaskulärer Translokation im Rahmen der Revaskularisierung näher zu charakterisieren.

7.2.3. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf das Granulationsgewebe und die Wundzusammensetzung der regenerierenden Hautwunde

In der frühen Phase der Wundheilung kommt es - getriggert durch neutrophile Granulozyten - zur Emmigration von Monozyten in das Wundgebiet, welche sich rasch zu Wundmakrophagen differenzieren und eine Vielzahl essentieller Chemokine produzieren und sezernieren. Diese Chemokine regulieren neben der initialen Entzündungsreaktion einerseits die Fibroblastenproliferation und -migration als auch die Induktion der Angiogenese. HAROON *et al.* konnten in diesem Zusammenhang erstmals zeigen, dass diese Wundmakrophagen den EPO-R exprimieren und damit vermutlich einer Regulation durch EPO unterliegen (HAROON *et al.* 2003). MIRZA *et al.* wiesen in einem *in vivo* Wundheilungsmodell nach, dass der pro-inflammatorische Phänotyp der Wundmakrophagen in diabetischen Mäusen persistiert und daraus eine prolongierte Entzündungsreaktion mit reduzierter Expression essentieller Zytokine wie z. B. IGF-1, TGF- β 1 und VEGF mit deutlich verzögerter Wundheilung resultiert (MIRZA *et al.* 2011). Da bereits in verschiedenen *in vivo* Studien die Verbesserung der Wundheilung durch EPO bei diabetischer Stoffwechsellage des Versuchstiers nachgewiesen werden konnte (GALEANO *et al.* 2004; HAMED *et al.* 2010&2011) und Wundmakrophagen aufgrund ihrer EPO-R-Expression vermutlich einer Regulation durch EPO unterliegen (HAROON *et al.* 2003) kann postuliert werden, dass EPO in die frühe Entzündungsphase immunmodulatorisch eingreift und das Voranschreiten der

Wundheilungsphasen durch anti-inflammatorische Effekte beschleunigt. In der vorliegenden Studie konnte in Wunden der SHD-EPO-Gruppe an Tag 12 nach Wundsetzung eine deutlich verringerte Anzahl an Leukozyten gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dies lässt eine durch die initiale hochdosierte EPO-Gabe (SHD-EPO) verminderte Entzündungsreaktion erkennen, was in Zusammenschau mit der signifikant erhöhten Re-Epithelialisierung auf eine günstige Beeinflussung vor allem der initialen Wundheilungsprozesse durch EPO hindeutet. Die schnelle Apoptose von neutrophilen Granulozyten im Wundgebiet nach erfolgter Bekämpfung etwaiger Krankheitserreger ist für die Chemotaxis von Wundmakrophagen und damit das Fortschreiten der Wundheilung essentiell (MARTIN&LEIBOVICH 2005). Die in der vorliegenden Studie mit RHD-EPO behandelten Versuchstiere zeigten an Tag 12 nach Wundsetzung eine deutlich erhöhte Anzahl an Leukozyten im Wundgebiet bei signifikanter Verzögerung der Re-Epithelialisierung gegenüber den Kontrollen. Da die Inhibition der Apoptose durch zVAD ähnliche Ergebnisse mit einer prolongierten Entzündungsreaktion ergab, könnte dies ein weiterer Hinweis auf das in einigen Studien bereits vermutete anti-apoptotische Wirkprofil von EPO sein (GHEZZI et al. 2004; YATSIV et al. 2005; MOON et al. 2006).

Eine weitere mögliche Erklärung für den erhöhten Leukozytengehalt unter RHD-EPO könnte die bereits erwähnte Hochregulation von eNOS sein. Durch eNOS getriggerte Vasodilatation und damit Verlangsamung des Blutflusses im Wundgebiet wäre ein leukozytäres Rollen und die anschließende Diapedese erleichtert. LEFER et al. konnten jedoch anhand von eNOS Knockout-Mäusen demonstrieren, dass sowohl das leukozytäre Rollen, die endotheliale Adhäsion als auch die transendotheliale Migration aus dem Blutstrom unter physiologischen Bedingungen signifikant zunahm. Interessanterweise zeigte die Defizienz an induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) keine Veränderung der Endothelzellinteraktion von Leukozyten (LEFER et al. 1999). MOST et al. wiesen ebenfalls nach, dass die Wundheilung in iNOS-Knockout-Mäusen gegenüber den Kontrollen unverändert blieb (MOST et al. 2002). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Theorie, dass RHD-EPO durch eNOS vermittelte Vasodilatation die Leukozytenzahl im Wundbereich erhöht. CONTALDO et al. konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass eine niedrig dosierte EPO-Gabe vor Traumasetzung die durch TNF- α assoziierte Leukozytenaktivierung und Apoptose deutlich attenuiert, sichtbar auch an einer ausgeprägten Reduktion infiltrierender F4/80 positiver Makrophagen. Diese anti-inflammatorischen Effekte von EPO konn-

ten in eNOS- aber nicht in iNOS-Knockout-Mäusen aufgehoben werden, wobei die anti-apoptotische Wirkung von EPO unverändert blieb (CONTALDO *et al.* 2011). Gleichsam konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die durch TNF-alpha erhöhte Expression von ICAM-1 und PECAM-1 auf Endothelzellen unter Einfluss von EPO signifikant reduziert wird (SZCZEPAŃSKI *et al.* 2007; DI VILLA BIANCA *et al.* 2009; CONTALDO *et al.* 2011). Damit kann angesichts der vorliegenden Studie vermutet werden, dass RHD-EPO eine ausgeprägte anti-apoptotische Wirkung gerade auf die Wundleukozyten hat, jedoch das Gleichgewicht zur in vielen Studien nachgewiesenen anti-inflammatorischen Wirkung in diesem Dosisbereich aufgehoben ist und daraus eine verzögerte Heilungstendenz resultiert (LUSTER *et al.* 1998; RICO *et al.* 2002).

Durch histologische Analyse der mit HE gefärbten Wunden an Tag 12 nach Wundsetzung konnte die Zellularität im Granulationsgewebe bestimmt werden. Hier zeigte sich analog zu den Leukozytenzahlen in RHD-EPO behandelten Tieren eine signifikant erhöhte Zellzahl gegenüber allen anderen Versuchsgruppen, was wiederum die anti-apoptotischen Eigenschaften von EPO unterstreicht. Eine hohe Zellularität als Zeichen einer persistierenden provisorischen Gewebematrix konnte in Studien als Ursache einer verminderten biomechanischen Belastbarkeit der Wunde nachgewiesen werden (EMING *et al.* 2007). Schlüsselemente der Umbauprozesse in der heilenden Wunde sind die Verdichtung von Kollagenfasern, der Rückgang der Gefäßdichte und der Verlust von Zellen via Emigration, Apoptose und Nekrose (GREENHALGH 1998; AU *et al.* 2007). Daher deutet die signifikant reduzierte Zellularität sowie die deutlich verringerte leukozytäre Infiltration des Granulationsgewebes in der SHD-EPO Gruppe einmal mehr auf eine frühe, dosisabhängige, pluripotente Wirkung von EPO mit anti-inflammatorischen und anti-apoptotischen Charakter hin (SORG *et al.* 2009).

Mittels Analyse der CD-31 Expression (GALEANO *et al.* 2004), der Gewebstransglutaminase (BUEMI *et al.* 2004) und des VEGF-Gehalts (GALEANO *et al.* 2006) von Wunden konnten andere Studien bereits umfangreich die pro-angiogenen Effekte von EPO beschreiben. In gleicher Weise zeigte sich in der vorliegenden Studie eine signifikant höhere mikrovaskuläre Dichte in der RHD-EPO Gruppe gegenüber den Kontrollen, was für das pro-angiogene Potential von EPO spricht. Die Förderung der Angiogenese wird hierbei sowohl auf eine direkte stimulatorische Aktivität von EPO auf VEGF und auf die Endothelzellmitose, als auch auf die Stimulation der Tubusformation zurückgeführt (GALEANO *et al.* 2006; ASHLEY *et al.* 2002). HEESCHEN *et al.*

konnte ebenfalls zeigen, dass EPO die entzündungs- und ischämiebedingte Neovaskularisierung fördert und dies wahrscheinlich auf einen signifikanten Anstieg der Anzahl von EPC im Knochenmark, Milz und peripheren Blutkreislauf zurückzuführen ist (HEESCHEN *et al.* 2003). Damit einhergehend ist EPO in der Lage, die Proliferation und Migration von reifen (RIBATTI *et al.* 2003) wie auch adulten EC zu erhöhen und deren Apoptoserate zu reduzieren (MÜLLER-EHMSEN *et al.* 2006).

Zur direkten histologischen Untersuchung der apoptischen Vorgänge im Granulationsgewebe wurde im Rahmen dieser Studie sowohl die beginnende Apoptose mittels aktivierter-Kaspase-3 als auch die terminale Apoptose mittels TUNEL-Analyse an 12 Tage alten Wunden durchgeführt. Hier zeigten sich erstaunlicherweise in allen EPO Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei die indirekte Kontrolle mittels zVAD eine deutliche Reduktion der Apoptoseaktivität erbrachte. Es konnten lediglich eine leicht reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen sowohl in der RHD-EPO als auch SHD-EPO Gruppe nachgewiesen werden. Dies könnte höchstwahrscheinlich durch den spät gewählten Untersuchungszeitpunkt erklärt werden. BROWN *et al.* beobachteten in ihrer Studie, dass Leukozyten im Granulationsgewebe bereits nach 12h in den programmierten Zelltod gingen und diese Aktivität am fünften Tag nach Wundsetzung am höchsten war um dann wieder langsam abzunehmen (BROWN *et al.* 1997). Ebenso konnten DESMOULIÈRE bereits nach einigen Tagen einen starken Anstieg an leukozytären Apoptosen verzeichnen. Vereinzelt apoptotische Zellen bestehend aus Myofibroblasten und Endothelzellen konnten lediglich noch ab dem achten Tag nach Trauma evaluiert werden (DESMOULIÈRE *et al.* 1995). Es ist somit davon auszugehen, dass in der vorliegenden Studie an Tag 12 nach Wundsetzung der überwiegende Teil der physiologischen Apoptose bereits abgelaufen war bzw. seinen Höhepunkt weit überschritten hatte. Dies betrifft vornehmlich die Tiere der Kontrollgruppe. Bezogen auf die mit EPO behandelten Tiere ist dementsprechend 12 Tage nach Traumasetzung histologisch keine eindeutige Aussage über die Beeinflussung der Apoptose im Granulationsgewebe möglich. Hierfür bedarf es weiterer experimenteller Studien mit frühzeitiger histologischer Asservierung von Wunden zur differenzierten und auf die Wundheilungsphasen genau abgestimmten Analyse der apoptotischen Vorgänge. Eine signifikante Hemmung der initialen Apoptose vor allem der Leukozyten durch EPO wäre in diesen Experimenten angesichts der bereits erhobenen Ergebnisse durchaus zu erwarten.

Die Proliferationsaktivität im Granulationsgewebe wurde in der vorliegenden Studie mittels histologischem Nachweis von PCNA analysiert. Hier zeigte sich entsprechend der bereits nachgewiesenen pro-mitogenen Wirkung von EPO vor allem in der RHD-EPO Gruppe eine deutliche erhöhte Anzahl proliferierender Zellen im Granulationsgewebe von 12 Tage alten Wunden gegenüber den Kontrollen. Dies zeigt analog zur erhöhten Zellularität auch eine persistierende Aktivität der vorhandenen Zellen, welche auf eine anhaltende Angiogenese als auch Fibroblastenproliferation hindeuten könnte.

7.2.4. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Gefäßreifung

Die Reifung und damit Stabilisierung der neugebildeten Kapillargefäße im Wundgebiet umfasst neben der Ausbildung einer Basalmembran auch die Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC), welche sich im Verlauf zu Myofibroblasten (SMC) bzw. Perizyten differenzieren und an die Basalmembran anlagern (*GERHARDT et al. 2003; BORDEL et al. 2005; WU et al. 2007; Ribatti et al. 2011*). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen für die Rekrutierung und auch Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen verantwortlich sind (*WU et al. 2007; ZWEZDARYK et al. 2007; CHEN et al. 2008; HOCKING et al. 2010; YU et al. 2011*). PDGF-BB und VEGF werden im Rahmen dieser Chemotaxis eine entscheidende Rolle zugesprochen (*HIRSCHI et al. 1999; RAJKUMAR et al. 2006*). So konnten *SUNDBERG et al. 1993* zeigen, dass Perizyten als auch SMC den PDGF-beta-Rezeptor (PDGF-BR) in heilenden Wunden exprimieren (*SUNDBERG et al. 1993*). Gleichwohl konnten *LINDAHL et al. 1997* an PDGF-BB defizienten Mäusen einen Verlust an perivaskulären Perizyten als auch eine konsekutive Mikroaneurysmabildung nachweisen (*LINDAHL et al. 1997*). In einer weiteren Studie zeigten *RAJKUMAR et al. 2006*, dass die medikamentöse Blockade von PDGF-BR durch Imatinib (Glivec®, Novartis) in einer signifikanten Reduktion der PDGF-BB vermittelten Proliferation, Differenzierung und Migration von Fibroblasten und Perizyten resultiert. Zudem zeigte sich ein deutlich verzögerter Wundverschluss vor allem in der frühen Phase der Wundheilung mit ebenfalls verzögerter Angiogenese und Mikroaneurysmabildung (*RAJKUMAR et al. 2006*). *JANMAAT et al.* konnten schließlich 2010 nachweisen, dass EPO zusammen mit TNF- α die Expression von PDGF-BB in Endothelzellen stimuliert und vermittelt über PDGF-BR konsekutiv die Proliferation von Perizyten und SMC

steigern kann (JANMAAT *et al.* 2010). Interessanterweise konnten XUE *et al.* kürzlich *in vivo* zeigen, dass umgekehrt auch PDGF-BB in der Lage ist, die Expression von EPO in perivaskulären Zellen zu stimulieren und damit z. B. in Tumorgewebe eine deutlich erhöhte Angiogenese bedingt (XUE *et al.* 2011). In der vorliegenden Studie zeigte sich in den mit RHD-EPO behandelten Tieren persistierend hohe Gefäßdurchmesser, was analog zur Studie von HELLSTRÖM *et al.* durch eine mangelnde Assoziation von Perizyten an präformierte Gefäße verursacht ist und eine endotheliale Hyperplasie hervorgerufen werden könnte (HELLSTRÖM *et al.* 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten elektronenmikroskopischen Analysen der Mikrogefäße im Granulationsgewebe von mit RHD-EPO behandelten Tieren ließen tatsächlich entsprechende morphologische Besonderheiten erkennen. So zeigte sich entweder ein komplettes Fehlen der Perizyten bzw. ein Kontaktverlust zwischen Perizyten und Endothelzellen als auch eine verringerte Dichte der Basalmembran, wohingegen Gefäße aller anderen Versuchsgruppen reguläre Maturierungszeichen, bestehend aus Perizyten und einer kräftigen Basallamina, zeigten. Angesichts der in vielen Studien nachgewiesenen pro-mitogenen Wirkung von EPO lässt sich hier einmal mehr ein dosisabhängiges Wirkprofil auch auf die Gefäßreifung erkennen. Dies zeigte sich auch in den fluoreszenzmikroskopischen Analysen. Wo die Kontrolltiere sowie die SHD-EPO- und RLD-EPO-Gruppe mit einer sukzessiven Maturierung der mikrovaskulären Netzwerke reagierten, sichtbar am stetigen Rückgang der initial erhöhten vor allem zirkulären Gefäßdurchmesser und FCD, imponierte die RHD-EPO-Gruppe mit persistierend hohen Kapillardurchmessern und einer selbst bei Versuchsende hohen zirkulären FCD (SORG *et al.* 2009). Der in der RHD-EPO Gruppe beobachtete signifikante Anstieg des Hämtokrits mit konsekutivem Anstieg der Blutviskosität und damit Verschlechterung der Rheologie könnte ebenfalls für die Aufrechterhaltung der Gefäßdurchmesser mit Ausbleiben der charakteristischen Maturierungszeichen verantwortlich sein (BOR-KUCUKATAY *et al.* 2000; ROGER *et al.* 1993; TOBU *et al.* 2004; SPIESS *et al.* 1998; YAMASAKI *et al.* 1998). Somit muss in Zusammenschau der ultrastrukturellen, fluoreszenzmikroskopischen als auch histologischen Befunde eine dosisabhängige Verzögerung der Gefäßmaturierung durch EPO postuliert werden.

7.2.5. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf die Zellmigration und Zellproliferation

Die Migration von Keratinozyten und Fibroblasten spielen bei der Re-Epithelialisierung und der Ausbildung von Granulationsgewebe kutaner Defekte eine entscheidende Rolle. Aktiviert durch eine Vielzahl von Zytokinen und den Verlust interzellulärer Kontakte am Wundrand beginnen initial vor allem die Keratinozyten zu proliferieren und zu migrieren, um die Wunde rasch und suffizient zu verschließen (*MARTIN et al. 1997; PAPETTI & HERMAN 2002*). In der vorliegenden Studie konnte das Migrationsverhalten von Keratinozyten und Fibroblasten unter EPO-Einfluss mithilfe des Wound scratch assays *in vitro* untersucht werden. Hier zeigte sich in der SHD-EPO Gruppe analog zu den Ergebnissen der planimetrischen Messungen eine signifikant erhöhte Migrationsaktivität beider untersuchter Zelllinien. Im Gegensatz hierzu demonstrierte die dauerhafte Stimulation in der RHD-EPO Gruppe eine signifikante Verzögerung der Migration gegenüber den Kontrollen. Angesichts der *in vitro* Bedingungen dieser Versuchsreihe mit Ausschluss von Interaktion anderer Zelllinien kann anhand der vorliegenden Ergebnisse eine dosisabhängige Wirkung von EPO auf das Migrationsverhalten von Keratinozyten als auch Fibroblasten angenommen werden. *SIEBERT et al.* konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass EPO-R sowohl auf Keratinozyten als auch auf Fibroblasten exprimiert wird und somit einer Regulation durch EPO unterstehen könnten. Gleichzeitig demonstrierte diese Studie, dass EPO die Expression von TGF-1 β in diesen Zelllinien erhöht, die Aktivierung von SMAD-2 und SMAD-3 im Wundgebiet fördert und damit die Wundheilung entscheidend beschleunigt (*SIEBERT et al. 2011*). *PARK et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass EPO die durch TGF-1 β vermittelte Abnahme der interzellulären Kontakte (zona occludens, Cadherin) bei Nierenfibrose inhibieren konnte (*PARK et al. 2007*). In diesem Prozess spielen SMAD-Proteine eine zentrale Rolle. Durch die Identifizierung von SMADs als intrazelluläre Effektoren konnten die zellulären Funktionen von TGF-1 β , welche unter Anderem eine entscheidende Rolle bei Zellproliferations- und Migrationsprozessen spielen, näher charakterisiert werden (*HELDIN et al. 1997; ASHCROFT et al. 2000*). Es konnten bislang drei verschiedene Klassen von SMAD-Proteinen beschrieben werden: die rezeptorregulierten R-SMADs (SMAD1, -2, -3, -5, -9), co-SMAD (SMAD4) und die inhibitorischen I-SMADs (SMAD6, -7), die die Aktivierung der R-SMADs und co-SMADS blockieren.

In der bereits benannten Studie von *SIEBERT et al.* konnte gezeigt werden, dass EPO die Phosphorylierung von SMAD-2 als auch SMAD-3 in Fibroblasten signifikant erhöhen kann und damit vermutlich die Defektdeckung beschleunigt (*SIEBERT et al. 2011; ASHCROFT et al. 2000; PARK et al. 2007*). Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Regulierung der Zellmigration stellen die zytoskeletalen Veränderungen dar. Viele Studien konnten zeigen, dass Rho-GTPasen (Rho, Rac, Cdc42) hier entscheidende intrazelluläre Vermittler zur Formation von Lammelopodien und Filopodien sowie zur Ausbildung von fokalen Adhäsionen darstellen (*JACINTO et al. 2001*). *ARAI et al.* konnten z. B. in hematopoetischen Zellen nachweisen, dass EPO *in vitro* Rac aktivieren kann (*ARAI et al. 2002*). Eine Stimulation der Fibroblastenmigration durch eine von PDGF-BB vermittelte Aktivierung der Rho-Kinasen (ROCK) konnten *WATTS et al. 2010* nachweisen (*WATTS et al. 2010*). Interessanterweise ist EPO damit indirekt ein Aktivator der ROCK, da es die Expression von PDGF-BB im Wundbereich fördert (*JANMAAT et al. 2010*). Ebenso konnten *JACKSON et al.* zeigen, dass ROCK-1 einen entscheidenden Regulator der Keratinozytenmigration darstellt (*JACKSON et al. 2011*). Im Gegensatz hierzu stellten *BREYER et al.* anhand ihrer Versuche die These auf, dass ROCK-2 die zytoskelettale Restrukturierung und damit Zytokinese von Endothelzellen hemmt (*BREYER et al. 2012*). Interessanterweise wiesen *YU et al.* nach, dass EPO in der Lage ist, in MSCs einerseits die Expression von MMP-2 und andererseits die Zellmigration zu fördern (*YU et al. 2011*). Schließlich konnten *HAMED et al.* auch zeigen, dass die topische Applikation von Fibronectin, einem Adhäsionsmolekül der EZM, in Kombination mit EPO auf diabetische Wunden *in vivo* eine deutlich bessere Defektdeckung als die singuläre Applikation von EPO bewirkt (*HAMED et al. 2011*).

In Zusammenschau dieser Studien und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergibt sich für EPO ein allgemein pro-migratorisches Wirkprofil auf die Wundheilung, welches aktuell um einen dosisabhängigen Aspekt erweitert werden muss. Diese Ergebnisse lassen außerdem die Vermutung zu, dass die körpereigene Regulation gerade der Zellmigration als "Motor" der Wundheilung, bedingt durch eine zeitliche Latenz, nicht unmittelbar nach Traumasetzung einsetzt, jedoch durch die initiale Unterstützung durch pro-migratorischen Effekte von EPO entscheidend unterstützt wird. Eine dauerhafte Überstimulation dieser Vorgänge durch RHD-EPO verzögert vermutlich die komplexe körpereigene Wundheilungskaskade, was in der vorliegenden Studie indirekt nachgewiesen werden konnte.

Neben der Zellmigration ist die Zellproliferation essentiell für die dermale Regeneration. Hierbei sind Keratinozyten als auch Fibroblasten zur Defektdeckung und Bildung des Granulationsgewebes besonders wichtig.

Zur genauen Darstellung des Proliferationsverhaltens von Keratinozyten und Fibroblasten unter dem Einfluss verschiedener EPO-Dosierungen bediente sich die vorliegende Studie dem WST-1 Assay. Interessanterweise ergaben die Versuche unterschiedliche Reaktionen von Fibroblasten und Keratinozyten bei gleichen EPO-Dosierungen. So zeigten die Fibroblasten unter RLD-EPO jedoch nicht unter RHD-EPO Gabe eine deutlich erhöhte Zellteilungsrate, wohingegen die Keratinozyten sowohl unter RLD-EPO als auch RHD-EPO deutlich mehr proliferierten. Erstaunlicherweise übertrafen beide Zelllinien mit diesen Ergebnissen die Werte der Positivkontrollen mit bFGF bzw. KGF. *CHEN et al.* konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass EPO im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen, welche von BM-MSCs sezerniert werden, die Proliferation von Keratinozyten fördert (*CHEN et al. 2008*). Weiterhin konnten *RIBATTI et al.* eine Erhöhung der Zellteilungsrate von Endothelzellen unter Einfluss von EPO nachweisen (*RIBATTI et al. 1999*). *SIEBERT et al.* zeigten schließlich, dass EPO vermutlich über eine SMAD-abhängige TGF- β - Signalkaskade sowohl einen pro-migratorischen als auch pro-proliferativen auf Keratinozyten und Fibroblasten vermittelt (*SIEBERT et al. 2011*). Somit ist EPO neben der nachgewiesenen pro-migratorischen Wirkung ebenfalls ein förderlicher Effekt auf die Proliferation essentieller Zelltypen und im Besonderen von Fibroblasten als auch Keratinozyten während der Wundheilung zu unterstellen.

7.2.6. Effekte von Erythropoietin und zVAD auf das systemische Blutbild

Die Untersuchung der Blutbilder aller Versuchstiere an Tag 12 diente neben der Erhebung von quantitativen Unterschieden auch der Kontrolle der EPO-Applikation. So konnten analog zu den Ergebnissen der Hauptversuche auch im Blut von mit EPO behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren dosisabhängige Unterschiede festgestellt werden. Entsprechend der hämatopoetischen Wirkung von EPO zeigte die RHD-EPO Gruppe eine exzessive Erythrozytose mit einer annähernden Verdoppelung des physiologischen Hämatokrits. Die mit SHD-EPO behandelten Tiere wiesen hingegen entsprechend der kurzzeitigen Applikation von EPO bei Versuchsende physiologische Parameter auf. Diese Werte weisen einerseits die Effektivität der intraperitonealen Applikationsform als auch die physiologische Wirkung des

in dieser Studie gewählten rhEPO Epoetin- α nach. Interessanterweise ergaben sich, neben den erwarteten dosisabhängigen Anstiegen der Erythrozytenzahlen in den mit RLD- und RHD-EPO behandelten Tieren, weitere signifikante Veränderungen des Blutbildes in diesen Gruppen. So zeigte vor allem die RHD-EPO Gruppe an Tag 12 eine gegenüber den Kontrollen signifikante Leukozytose, welche angesichts der implantierten Rückenhautkammer vermutlich eine Fremdkörperreaktion darstellen könnte, aber wahrscheinlicher auf eine direkte Stimulation der Granulo-, Monozyto- bzw. Lymphopoese durch EPO hindeutet. *BRINES et al.* konnten zeigen, dass rhEPO zwar zytoprotektive Eigenschaften besitzt, diese jedoch erst bei höheren, unphysiologischen Plasmakonzentrationen von EPO eintreten. Dies hat angesichts der hämatopoetischen Wirkung von EPO jedoch eine ausgeprägte Verschiebung des Blutbildes zur Folge, welche vor allem durch die hohe Erythrozytose, EPO-assoziierte Vasokonstriktion als auch eine gesteigerte Mikrothromboserate erhebliche Nebenwirkungen hat (*BRINES et al. 2008&2010; QUASCHNING et al. 2003; BUEMI et al. 2009*). Die Entwicklung von carbamylisiertem EPO (CEPO) sowie von Peptiden, welche die dreidimensionale Struktur von EPO imitieren (z. B. ARA 290), welche keine erythropoetische Wirkung haben, ergab erstaunlicherweise trotzdem zytoprotektive Effekte, so dass von einem heterodimeren Rezeptor von EPO auf nicht-erythroiden Zellen ausgegangen werden muss (*IMAMURA et al. 2008; BRINES et al. 2008; LEIST et al. 2004; ERBAYRAKTAR et al. 2009*). *BRINES et al.* konnten 2004 schließlich nachweisen, dass CEPO, ohne Beeinflussung der Erythropoese, über einen EPO-R und Common- β -Untereinheit Heterorezeptor seine zytoprotektiven Effekte vermittelt (*BRINES et al. 2004*). Diese Common- β -Untereinheit ist ebenfalls die signaltransduzierende Komponente des GM-CSF-Rezeptors, welcher als Typ-I-Zytokinrezeptor viele Ähnlichkeiten mit EPO-R besitzt (*BRINES et al. 2004; LEIST et al. 2004*). Somit kann angesichts der strukturellen Ähnlichkeiten der Rezeptoren von EPO und GM-CSF vermutet werden, dass rhEPO durchaus eine Leukozytose bedingen könnte. Dies lässt sich ebenfalls indirekt mit der Tatsache belegen, dass die Thrombozytenzahlen in der RLD- als auch RHD-EPO-Gruppe deutlich erniedrigt waren, wohl als Zeichen einer Verdrängung der Megakaryopoese aus dem durch EPO-Applikation hyperproliferativen Knochenmark. Im Gegensatz hierzu konnten *BENNETT et al.* zeigen, dass die Therapie von tumorassoziierten Anämien mit EPO ein deutlich erhöhtes Risiko einer venösen Thromboembolie bedingt (*BENNETT et al. 2008*). Aufgrund der hohen Eryth-

rozytose in der RHD-EPO Gruppe könnte die dort beobachtete Verzögerung der Wundheilung ebenfalls auf den Anstieg des Hämatokrits zurückzuführen sein. Vorangegangene Studien zeigten, dass die durch EPO hervorgerufene Erythrozytose akute ischämische Schäden verschlimmern und zu hepatischer, renaler, neuronaler und muskulärer Degeneration führen kann (HEINICKE *et al.* 2006; QUASCHNING *et al.* 2003; WIESSNER *et al.* 2001). Ferner wurden bei hohen Hämatokritwerten neben Schäden am Gefäßendothel (BLANN *et al.* 2001), nachteilige Beeinflussungen der rheologischen Eigenschaften des Blutes in Bezug auf die nutritive Perfusion und metabolische Funktion von verletztem Gewebe beschrieben (BOR-KUCUKATAY *et al.* 2000; KWAAN *et al.* 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Hämatokrits mit einem konsekutiven Anstieg der Thromboserate und des Blutdrucks assoziiert ist und die Regeneration und Remodellierung der Wunde negativ beeinträchtigen kann (ROGER *et al.* 1993; TOBU *et al.* 2004; SPIESS *et al.* 1998; YAMASAKI *et al.* 1998; BENNETT *et al.* 2008).

Im Gegensatz hierzu zeigten einige Studien, dass eine präventive Behandlung mit niedrig dosiertem EPO, welche keine Erythrozytose bedingt, einen Schutz vor postischämischen Schäden bewirkt (LIPSIC *et al.* 2004; VESEY *et al.* 2004; CONTALDO *et al.* 2007; SIRÉN *et al.* 2001). Es kann demnach vermutet werden, dass die förderlichen Effekte von SHD- und RLD-EPO auf die Wundheilung wahrscheinlich auch durch die Abwesenheit einer exzessiven Erythrozytose zurückzuführen sind.

Viele vorangegangene Studien konnten das pluripotente Wirkprofil von EPO auf entscheidende Prozesse der kutanen Wundheilung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachweisen und zum Teil auf molekularer Ebene nachvollziehen (BRINES *et al.* 2004; SAVINO *et al.* 2004; JELKMANN&WAGNER 2004; SORG *et al.* 2009&2012). Die vorliegende Studie zeigt hierbei eindrucksvoll, dass diese Effekte abhängig vom Zeitpunkt der Applikation als auch entscheidend von der jeweiligen Dosierung von EPO die Wundheilung beschleunigen. So kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit bewiesen werden, dass die Wundheilungskaskade vor allem in ihrer ersten Phase signifikant von einer einmaligen hochdosierten EPO-Gabe profitiert. Gleichzeitig zeigen die Versuche, dass eine regelmäßige Applikation von EPO über alle Wundheilungsphasen der einmaligen Gabe nicht überlegen ist. Angesichts der hochkomplexen Abläufe während der Defektdeckung und der beschriebenen pleiotropen Wirkung von EPO ist eine zeitliche und quantitative Anpassung der EPO-Applikation eminent notwendig, um physiologisch notwendige Prozesse während der Wundheilung z. B.

durch anti-inflammatorische oder anti-apoptotische Effekte nicht negativ zu beeinflussen. Gleichzeitig zeigt diese Studie auf, dass die pluripotenten Effekte von EPO bei einer chronisch hochdosierten Applikation durch die hämatopoetische Wirkung negativ beeinflusst werden und sogar in einer signifikanten Verzögerung der Defektdeckung resultieren können.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass EPO vor allem durch seine nachgewiesene anti-inflammatorische, anti-apoptotische, pro-migratorische und pro-angiogene Wirkung ein ideales Werkzeug zur Verbesserung der Regeneration traumatisierten Gewebes darstellt. Jedoch sollte im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Studie einerseits der Zeitpunkt der Applikation sorgfältig anhand der Wundheilungsphasen gewählt und gleichsam die applizierte Menge von EPO kritisch festgelegt werden, um eine nachteilige Beeinflussung des jeweilig aktuellen Teilprozesses der Gewebsregeneration zu verhindern.

7.3. Klinische Perspektiven

Die klinische Anwendung des Glykoproteinohormons Erythropoietin in der Evidenz basierten Medizin beschränkt sich nach wie vor auf die Therapie von renalen, tumorassoziierten und chemotherapieinduzierten Anämien (*HEDLEY et al. 2011; DICATO et al. 2010; JELKMANN 2004*). Aufgrund der seit Jahrzehnten bekannten hämatopoetischen Wirkung und mittlerweile großtechnischen Herstellung profitieren seit vielen Jahren Patienten von der regelmäßigen Anwendung von rhEPO. Zudem wird die regelmäßige Applikation von rhEPO aktuell angewendet, um die Oxygenierung und damit Ansprechrate hypoxischer Tumoren auf Radio- oder Chemotherapien zu steigern (*LO NIGRO et al. 2009*). Das experimentell nachgewiesene, pluripotente Wirkprofil von EPO mit zyto- und histoprotektiven Eigenschaften findet aktuell in vielen klinischen Studien Anwendung (*IMAMURA et al. 2008; LIPSIC 2004; SIREN 2001*). Die chronische Wunde stellt im klinischen Alltag heute nach wie vor große Anforderungen an das Therapiemanagement. Die Überleitung der experimentellen Ergebnisse auf die klinische Anwendung von EPO zur Förderung der Heilung chronischer Wunden ist bislang auf wenige Einzelberichte beschränkt. So konnten *KEAST&FRASER* in einer klinischen Studie zeigen, dass in anämischen Patienten mit viertgradigen Druckulzera an den Füßen durch eine regelmäßige, niedrigdosierte

rhEPO Applikation der Hämoglobingehalt und die Heilung der Druckulzera verbessert wurde (*KEAST&FRASER 2004*). Klinische Bedenken bezüglich der Sicherheit der Anwendung von rhEPO zur Gewebsregeneration richten sich vor allem auf die Gefahr einer hohen Erythrozytose, EPO-assoziierten Vasokonstriktion sowie einer gesteigerten Mikrothromboserate (*BRINES et al. 2008&2010; QUASCHNING et al. 2003; BUEMI et al. 2009*). Durch die Entwicklung des EPO-Analogons CEPO, welches die gewünschten zytoprotektiven Effekte vermittelt, jedoch nicht hämatopoetisch wirksam ist, konnten experimentelle Studien zeigen, dass eine Förderung der Gewebsregeneration ohne eine negative, EPO-assoziierte Beeinflussung der Rheologie möglich ist (*SATAKE et al. 1990; LEIST et al. 2004; IMAMURA et al. 2008; VILLA et al. 2007; ERBAYRAKTAR et al. 2009; BRINES et al. 2010*). Gerade im Hinblick auf onkologische Patienten, die während einer Behandlung mit vor allem hochdosiertem rhEPO der Gefahr einer Tumorprogression ausgesetzt wären, würden von CEPO deutlich profitieren, wenn es um die Verbesserung der Gewebsregeneration geht (*RIBATTI et al. 2010; BUEMI et al. 2009; DRÜEKE et al. 2006; WISH et al. 2007*). Die aktuelle Entwicklung nicht hämatopoetischer EPO-Analoga, wie z. B. CEPO oder ARA 290, und anschließende rasche Einbindung in experimentelle Studien, spiegelt die Wichtigkeit und das zugesprochene Potential von EPO wider, in Zukunft einen großen Stellenwert in der Prävention und klinischen Therapie von Gewebeschäden zu spielen (*ERBAYRAKTAR et al. 2009; PATEL et al. 2012; BRINES et al. 2004; KONSTANTINOPOULOS et al. 2007*).

8. QUELLEN UND LITERATURANGABEN

- Abdelrahman M, Sharples EJ, McDonald MC, Collin M, Patel NS, Yaqoob MM, Thiemermann C. Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia. *Shock* 2004;22:63-69
- Adamson JW, Eschbach JW. The use of recombinant human erythropoietin (rHuEpo) in humans. *Cancer Surv* 1990;9:157-167
- Adamson JW. Regulation of red blood cell production. *Am J Med* 1996;101:4-6
- Akisu M, Kullahcioglu Girgin F, Baka M, Husseyinov A, Kultursay N. The role of recombinant human erythropoietin in lipid peroxidation and platelet-activating factor generation in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg* 2001;11:167-172
- Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1991;114:1059-1068
- Alcaraz A, Kelly J. Treatment of an infected venous leg ulcer with honey dressings. *Br J Nurs* 2002;11:859-860
- Alef M, von Praun F, Oechtering G. Is routine pre-anaesthetic haematological and biochemical screening justified in dogs? *Vet Anaesth Analg* 2008;35:132-140
- Algire GH. An adaptation of the transparent-chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 1943;4:1-11
- Allgöwer M, Schoenenberger GA, Sparkes BG. Burning the largest immune organ. *Burns* 1995;21:7-47
- Ammarguella F, Gogusev J, Drüeke TB. Direct effect of erythropoietin on rat vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:687-692
- Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5978-5982
- Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3974-3978
- Anderson I. Honey dressings in wound care. *Nurs Times* 2006;102:40-42
- Andreadis ST, Geer DJ. Biomimetic approaches to protein and gene delivery for tissue regeneration. *Trends Biotechnol* 2006;24:331-337
- Arai A, Kanda E, Miura O. Rac is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in activation of the Erk signaling pathway. *Oncogene* 2002;21:2641-2651
- Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol* 2008;141:14-31
- Arfors KE, Jonsson JA, McKenzie FN. A titanium rabbit ear chamber: assembly, insertion and results. *Microvasc Res* 1970;2:516-519
- Armstrong DG, Lavery LA; Diabetic Foot Study Consortium. Negative pressure wound therapy after partial diabetic foot amputation: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:1704-1710
- Ashcroft GS, Roberts AB. Loss of Smad3 modulates wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:125-131
- Ashley RA, Dubuque SH, Dvorak B, Woodward SS, Williams SK, Kling PJ. Erythropoietin stimulates vasculogenesis in neonatal rat mesenteric microvascular endothelial cells. *Pediatr Res* 2002;51:472-478
- Au K, Ehrlich HP. Does rat granulation tissue maturation involve gap junction communications? *Plast Reconstr Surg* 2007;120:91-99
- Ayello EA, Dowsett C, Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Harding K, Romanelli M, Stacey M, TEO L, Vanscheidt W. TIME heals all wounds. *Nursing* 2004;34:36-41
- Badillo AT, Chung S, Zhang L, Zoltick P, Liechty KW. Lentiviral gene transfer of SDF-1alpha to wounds improves diabetic wound healing. *J Surg Res* 2007;143:35-42
- Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004;103:921-926
- Bany-Mohammed FM, Slivka S, Hallman M. Recombinant human erythropoietin: possible role as an antioxidant in premature rabbits. *Pediatr Res* 1996;40:381-387

- Beck LS, Chen TL, Hirabayashi SE, Deguzman L, Lee WP, McFatridge LL, Xu Y, Bates RL, Ammann AJ. Accelerated healing of ulcer wounds in the rabbit ear by recombinant human transforming growth factor-beta 1. *Growth Factors* 1990;2:273-282
- Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 2004;104:2073-2080
- Bennett CL, Silver SM, Djulbegovic B, Samaras AT, Blau CA, Gleason KJ, Barnato SE, Elverman KM, Courtney DM, McKoy JM, Edwards BJ, Tigue CC, Raisch DW, Yarnold PR, Dorr DA, Kuzel TM, Tallman MS, Trifilio SM, West DP, Lai SY, Henke M. Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. *JAMA* 2008;299:914-24
- Benson GJ, Thurmon JC. Intravenous anesthesia. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1990;6:513-528
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996;4:15-19
- Birk DE, Zycband EI, Winkelmann DA, Trelstad RL. Collagen fibrillogenesis in situ. Discontinuous segmental assembly in extracellular compartments. *Ann N Y Acad Sci* 1990;580:176-94
- Blann AD, Lip GY. Virchow's triad revisited: the importance of soluble coagulation factors, the endothelium, and platelets. *Thromb Res* 2001;101:321-327
- Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci* 2008;97:2892-2923
- Bodó E, Kromminga A, Funk W, Laugsch M, Duske U, Jelkmann W, Paus R. Human hair follicles are an extrarenal source and a nonhematopoietic target of erythropoietin. *FASEB J* 2007;21:3346-3354
- Böhmer RM. Flow cytometry and cell proliferation kinetics. *Prog Histochem Cytochem* 1982;14:1-62
- Bonsdorff E, Jalavisto E. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand* 1948;16:150-170
- Bor-Kucukatay M, Yalcin O, Meiselman HJ, Baskurt OK. Erythropoietin-induced rheological changes of rat erythrocytes. *Br J Haematol* 2000;110:82-88
- Bordel R, Laschke MW, Menger MD, Vollmar B. Inhibition of p53 during physiological angiogenesis in the hamster ovary does not affect extent of new vessel formation but delays vessel maturation. *Cell Tissue Res* 2005;320:427-435
- Borner C, Monney L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 1999;6:497-507
- Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1962;115:453-466
- Brendel W. Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1988;69:643-651
- Breuing K, Eriksson E, Liu P, Miller DR. Healing of partial thickness porcine skin wounds in a liquid environment. *J Surg Res* 1992;52:50-58
- Breyer J, Samarin J, Rehm M, Lautscham L, Fabry B, Goppelt-Struebe M. Inhibition of Rho kinases increases directional motility of microvascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 2012;83:616-626
- Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:484-494
- Brines M, Cerami A. Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *J Intern Med* 2008;264:405-432
- Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14907-14912
- Brines M. The therapeutic potential of erythropoiesis-stimulating agents for tissue protection: a tale of two receptors. *Blood Purif* 2010;29:86-92
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10526-10531
- Brooke H. Hairless Mice. *J Hered* 1926;17:173-174

- Brown DL, Kao WW, Greenhalgh DG. Apoptosis down-regulates inflammation under the advancing epithelial wound edge: delayed patterns in diabetes and improvement with topical growth factors. *Surgery* 1997;121:372-380
- Buemi M, Galeano M, Sturiale A, Ientile R, Crisafulli C, Parisi A, Catania M, Calapai G, Impalà P, Aloisi C, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A, Tuccari G, Frisina N. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock* 2004;22:169-173
- Buemi M, Lacquaniti A, Bolignano D, Cernaro V, Campo S, Grasso G, Buemi A, Donato V, Sturiale A. Down with the erythropoietin. Long live the erythropoietin! *Curr Drug Targets* 2009;10:1028-1032
- Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 2005;100:397-403
- Burstone MS. The cytochemical localization of esterase. *J Natl Cancer Inst* 1957;18:167-172
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003;108:79-85
- Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4802-4806
- Carlini RG, Alonzo EJ, Dominguez J, Blanca I, Weisinger JR, Rothstein M, Bellorin-Font E. Effect of recombinant human erythropoietin on endothelial cell apoptosis. *Kidney Int* 1999;55:546-553
- Carnot P., Deflandre C. Sur l'activité hémostatique du sérum au cours de la régénération du sang. *C R Acad Sci* 1906;143:384-386
- Carroll GL, Hartsfield SM. General anesthetic techniques in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996;12:627-61 Erratum in: *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997;13:XI
- Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH, Callaghan MJ, Edelstein D, Brownlee M, Gurtner GC. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem* 2008;283:10930-10938
- Chang EI, Loh SA, Ceradini DJ, Chang EI, Lin SE, Bastidas N, Aarabi S, Chan DA, Freedman ML, Giaccia AJ, Gurtner GC. Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization during ischemia. *Circulation* 2007;116:2818-2829
- Chang SY, Huang JJ, Tsao CK, Nguyen A, Mittakanti K, Lin CY, Cheng MH. Does ischemia time affect the outcome of free fibula flaps for head and neck reconstruction? A review of 116 cases. *Plast Reconstr Surg* 2010;126:1988-1995
- Chávez-Cartaya RE, Ramirez P, Jamieson NV. Haemoglobin saturation in the rat liver after ischaemia and reperfusion: study using a laser photometry technique and correlation with changes in liver tissue blood flow. *Eur Surg Res* 1995;27:82-92
- Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008;3:e1886
- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Angiogenesis and plasticity: role of erythropoietin in vascular systems. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:863-871
- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin: cytoprotection in vascular and neuronal cells. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003;3:141-154
- Cianfarani F, Tommasi R, Failla CM, Viviano MT, Annessi G, Papi M, Zambruno G, Odorisio T. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor treatment of human chronic ulcers promotes angiogenesis associated with de novo vascular endothelial growth factor transcription in the ulcer bed. *Br J Dermatol* 2006;154:34-41
- Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 1982;79:264-269
- Contaldo C, Lindenblatt N, Elsherbiny A, Högger DC, Borozadi MK, Vetter ST, Lang KS, Handschin AE, Giovanoli P. Erythropoietin requires endothelial nitric oxide synthase to counteract TNF-alpha-induced microcirculatory dysfunction in murine striated muscle. *Shock* 2011;35:315-321
- Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, Harder Y, Trentz O, Menger MD, Wanner GA. Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from posts ischemic injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:274-283
- Conzen P, Hobbhahn J, Goetz AE, Habazettl H, Granetzny T, Peter K, Brendel W. Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1988;69:643-651

- D'Uscio LV, Smith LA, Santhanam AV, Richardson D, Nath KA, Katusic ZS. Essential role of endothelial nitric oxide synthase in vascular effects of erythropoietin. *Hypertension* 2007;49:1142-1148
- Danilenko DM, Ring BD, Tarpley JE, Morris B, Van GY, Morawiecki A, Callahan W, Goldenberg M, Hershenson S, Pierce GF. Growth factors in porcine full and partial thickness burn repair. Differing targets and effects of keratinocyte growth factor, platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, and neu differentiation factor. *Am J Pathol* 1995;147:1261-1277
- Datta R, Kojima H, Yoshida K, Kufe D. Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:20317-20320
- David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent JC, Bogdanowicz P, Boumediene K, Pujol JP. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:274-87
- Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res* 1998;290:1-11
- Dealey C. Role of hydrocolloids in wound management. *Br J Nurs* 1993;2:358,360,336
- Desmoulière A, Badid C, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:19-30
- Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995;146:56-66
- Di Villa Bianca R, Sorrentino R, Mitidieri E, Marzocco S, Autore G, Thiemermann C, Pinto A, Sorrentino R. Recombinant human erythropoietin prevents lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in the rat. *Shock* 2009;31:529-34
- Dicato M, Plawny L. Erythropoietin in cancer patients: pros and cons. *Curr Opin Oncol* 2010;22:307-311
- DiPietro LA. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* 1995;4:233-240
- Drüeke TB, Locatelli F, Clyne N, Eckardt KU, Macdougall IC, Tsakiris D, Burger HU, Scherhag A. Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N Engl J Med* 2006;355:2071-2084
- Elias H, Petty D. Terminal distribution of the hepatic artery. *Anat Rec* 1953;116:9-17
- Elias PM. The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol* 2007;29:3-14
- Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem* 2007;42:115-170
- Eming SA, Kaufmann J, Löhner R, Krieg T. Chronic wounds: Novel approaches in research and therapy. *Hautarzt* 2007;58:939-944
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007;127:514-525
- Eming SA, Lee J, Snow RG, Tompkins RG, Yarmush ML, Morgan JR. Genetically modified human epidermis overexpressing PDGF-A directs the development of a cellular and vascular connective tissue stroma when transplanted to athymic mice--implications for the use of genetically modified keratinocytes to modulate dermal regeneration. *J Invest Dermatol* 1995;105:756-763
- Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K. Technical report – a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 1980;177:125-134
- Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Yilmaz O, Cerami A, Coleman T, Brines M. Nonerythropoietic tissue protective compounds are highly effective facilitators of wound healing. *Mol Med* 2009;15:235-241
- Erslav A. Humoral regulation of red cell production. *Blood* 1953;8:349-357
- Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, Shrayder D, Carson P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng* 2007;13:1299-1312
- Fandrey J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:977-988
- Fatouros M, Dalekos GN, Mylonakis E, Vekinis G, Kappas AM. Alterations in body weight, breaking strength, and wound healing in Wistar rats treated pre- and postoperatively with erythropoietin or granulocyte macrophage-colony stimulating factor: evidence of a previously unknown anabolic effect of erythropoietin? *J Lab Clin Med* 1999;133:253-259
- Fatouros MS, Vekinis G, Bourantas KL, Mylonakis EP, Scopelidou AS, Malamou-Mitsis VD, Kappas AM. Influence of growth factors erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on mechanical strength and healing of colonic anastomoses in rats. *Eur J Surg* 1999;165:986-992

- Fenjves ES, Ochoa MS, Cabrera O, Mendez AJ, Kenyon NS, Inverardi L, Ricordi C. Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors. *Transplantation* 2003;75:1356-1360
- Fishbane S, Ragolia L, Palaia T, Johnson B, Elzein H, Maesaka JK. Cytoprotection by darbepoetin/epoetin alfa in pig tubular and mouse mesangial cells. *Kidney Int* 2004;65:452-458
- Foley RN. Erythropoietin: physiology and molecular mechanisms. *Heart Fail Rev* 2008;13:405-414
- Fu XB, Sun TZ, Wang YP. Comparative study of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on wound healing. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 1999;13:278-282
- Furlani D, Klopsch C, Gäbel R, Ugurlucan M, Pittermann E, Klee D, Wagner K, Li W, Wang W, Ong LL, Nizze H, Titze U, Lützow K, Lendlein A, Steinhoff G, Ma N. Intracardiac erythropoietin injection reveals antiinflammatory potential and improved cardiac functions detected by Forced Swim Test. *Transplant Proc* 2008;40:962-966
- Galeano M, Altavilla D, Bitto A, Minutoli L, Calo M, Lo Cascio P, Polito F, Giugliano G, Squadrito G, Mioni C, Giuliani D, Venuti FS, Squadrito F. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med* 2006;34:1139-1146
- Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 2004;53:2509-2517
- Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol* 2004;164:1935-1947
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 1998;273:32608-32613
- Garlick JA, Taichman LB. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Invest* 1994;70:916-924
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501
- Geer DJ, Swartz DD, Andreadis ST. In vivo model of wound healing based on transplanted tissue-engineered skin. *Tissue Eng* 2004;10:1006-1017
- Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314:15-23
- Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ* 2004;11:37-44
- Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1019-1030
- Grinnell F, Ho CH, Wysocki A. Degradation of fibronectin and vitronectin in chronic wound fluid: analysis by cell blotting, immunoblotting, and cell adhesion assays. *J Invest Dermatol* 1992;98:410-416
- Groves RW, Schmidt-Lucke JA. Recombinant human GM-CSF in the treatment of poorly healing wounds. *Adv Skin Wound Care* 2000;13:107-112
- Guerret S, Govignon E, Hartmann DJ, Ronfard V. Long-term remodeling of a bilayered living human skin equivalent (Apligraf) grafted onto nude mice: immunolocalization of human cells and characterization of extracellular matrix. *Wound Repair Regen* 2003;11:35-45
- Günter CI, Machens HG. New strategies in clinical care of skin wound healing. *Eur Surg Res* 2012;49:16-23
- Gupta A. A review of the use of maggots in wound therapy. *Ann Plast Surg* 2008;60:224-227
- Hafner C, Meyer S, Vogt T. Mechanismen der epithelialen Regeneration. *Hautarzt* 2002;53:561-575
- Hamed S, Ullmann Y, Egozi D, Daod E, Hellou E, Ashkar M, Gilhar A, Teot L. Fibronectin potentiates topical erythropoietin-induced wound repair in diabetic mice. *J Invest Dermatol* 2011;131:1365-1374
- Hamed S, Ullmann Y, Masoud M, Hellou E, Khamaysi Z, Teot L. Topical erythropoietin promotes wound repair in diabetic rats. *J Invest Dermatol* 2010;130:287-294
- Hanft JR, Pollak RA, Barbul A, van Gils C, Kwon PS, Gray SM, Lynch CJ, Semba CP, Breen TJ. Phase I trial on the safety of topical rhVEGF on chronic neuropathic diabetic foot ulcers. *J Wound Care* 2008;17:30-32, 34-37

- Hardwicke J, Schmaljohann D, Boyce D, Thomas D. Epidermal growth factor therapy and wound healing--past, present and future perspectives. *Surgeon* 2008;6:172-177
- Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am J Pathol* 2003;163:993-1000
- Hedley BD, Allan AL, Xenocostas A. The role of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents in tumor progression. *Clin Cancer Res* 2011;17:6373-6380
- Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;102:1340-1346 Erratum in: *Blood* 2004;103:4388
- Heidenreich S, Rahn KH, Zidek W. Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessels. *Kidney Int* 1991;39:259-265
- Heinicke K, Baum O, Ogunshola OO, Vogel J, Stallmach T, Wolfer DP, Keller S, Weber K, Wagner PD, Gassmann M, Djonov V. Excessive erythrocytosis in adult mice overexpressing erythropoietin leads to hepatic, renal, neuronal, and muscular degeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:947-956
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465-471
- Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001;153:543-553
- Hendel PM, Lilien DL, Buncke HJ. A study of the pharmacologic control of blood flow to acute skin flaps using xenon washout. Part I. *Plast Reconstr Surg* 1983;71:387-398
- Heyneman A, Beele H, Vanderwee K, Defloor T. A systematic review of the use of hydrocolloids in the treatment of pressure ulcers. *Evid Based Nurs* 2008;11:115
- Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007;127:526-537
- Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA. Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res* 1999;84:298-305
- Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 2010;316:2213-2219
- Hodde J, Hiles M. Constructive soft tissue remodelling with a biologic extracellular matrix graft: overview and review of the clinical literature. *Acta Chir Belg* 2007;107:641-647
- Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med* 2005;9:592-608
- Huang NF, Zac-Varghese S, Luke S. Apoptosis in skin wound healing. *Wounds* 2003;15:182-194
- Hubbell J. Matrix-bound growth factors in tissue repair. *Swiss Med Wkly* 2006;136:387-391
- Im E, Kazlauskas A. New insights regarding vessel regression. *Cell Cycle* 2006;5:2057-2059
- Imamura R, Okumi M, Isaka Y, Ichimaru N, Moriyama T, Imai E, Nonomura N, Takahara S, Okuyama A. Carbamylated erythropoietin improves angiogenesis and protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury. *Cell Transplant* 2008;17:135-41
- Ito M, Cotsarelis G. Is the hair follicle necessary for normal wound healing? *J Invest Dermatol* 2008;128:1059-1061
- Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin P. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol* 2001;3:117-123.
- Jackson B, Peyrollier K, Pedersen E, Basse A, Karlsson R, Wang Z, Lefever T, Ochsenbein AM, Schmidt G, Aktories K, Stanley A, Quondamatteo F, Ladwein M, Rottner K, van Hengel J, Brakebusch C. RhoA is dispensable for skin development, but crucial for contraction and directed migration of keratinocytes. *Mol Biol Cell* 2011;22:593-605
- Jacobi J, Jang JJ, Sundram U, Dayoub H, Fajardo LF, Cooke JP. Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. *Am J Pathol* 2002;161:97-104
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985;313:806-810
- Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plizak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 1957;179:633-634
- Jahoda CA, Reynolds AJ. Hair follicle dermal sheath cells: unsung participants in wound healing. *Lancet* 2001;358:1445-1448

- Jahoda CA. Induction of follicle formation and hair growth by vibrissa dermal papillae implanted into rat ear wounds: vibrissa-type fibres are specified. *Development* 1992;115:1103-1109
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-693
- Janmaat ML, Heerkens JL, de Bruin AM, Klous A, de Waard V, de Vries CJ. Erythropoietin accelerates smooth muscle cell-rich vascular lesion formation in mice through endothelial cell activation involving enhanced PDGF-BB release. *Blood* 2010;115:1453-1460
- Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 2002;64:326-333
- Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol* 2004;83:673-686
- Jelkmann W. Effects of erythropoietin on brain function. *Curr Pharm Biotechnol* 2005;6:65-79
- Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992;72:449-489
- Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004 Aug;43:649-59
- Jelkmann W. Use of recombinant human erythropoietin as an antianemic and performance enhancing drug. *Curr Pharm Biotechnol* 2000;1:11-31
- Jensen TG. Cutaneous gene therapy. *Ann Med* 2007;39:108-15
- Jeschke MG, Schubert T, Klein D. Exogenous liposomal IGF-I cDNA gene transfer leads to endogenous cellular and physiological responses in an acute wound. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:958-66
- Joyeux-Faure M. Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications? *J Pharmacol Exp Ther* 2007;323:759-762
- Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y, DeMarco V. Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine. *Gut* 2001;49:182-189
- Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg* 2000;70:829-34
- Keast DH, Fraser C. Treatment of chronic skin ulcers in individuals with anemia of chronic disease using recombinant human erythropoietin (EPO): a review of four cases. *Ostomy Wound Manage* 2004;50:64-70
- Kessler JA, Fenstermacher JD, Owens ES. Spinal subarachnoid perfusion of rhesus monkeys. *Am J Physiol* 1976;230:614-618
- Kilarski WW, Samolov B, Petersson L, Kvant A, Gerwins P. Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. *Nat Med* 2009;15:657-664
- Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H. Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech* 1997;42:168-175
- Kobayashi T, Yanase H, Iwanaga T, Sasaki R, Nagao M. Epididymis is a novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:145-151
- Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Selective modulation of the erythropoietic and tissue-protective effects of erythropoietin: time to reach the full therapeutic potential of erythropoietin. *Biochim Biophys Acta* 2007;1776:1-9
- Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 1991;77:2497-2503
- Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 1988;71:524-527
- Kwaan HC, Wang J. Hyperviscosity in polycythemia vera and other red cell abnormalities. *Semin Thromb Hemost* 2003;29:451-458
- Lang R, Lustig M, Francois F, Sellinger M, Plesken H. Apoptosis during macrophage-dependent ocular tissue remodelling. *Development* 1994;120:3395-3403
- Lang RA, Bishop JM. Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell* 1993;74:453-462
- Laschke MW, Vollmar B, Menger MD. The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater* 2011;22:147-164
- Lauer G, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Stürzebecher J, Mann K, Krieg T, Eming SA. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 2000;115:12-18
- Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Attenuation of Inflammation and Apoptosis by Pre- and Posttreatment of Darbeпоetin-alpha in Acute Liver Failure of Mice. *Am J Pathol* 2007;170:1954-1963

- Lee CH, Han SK, Choi WI, Kim WK. Effect of human bone marrow stromal cells and dermal fibroblasts on collagen synthesis and epithelization. *Ann Plast Surg* 2007;59:713-719
- Lee-Huang S. Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:2708-2712
- Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 1999;276:1943-1950
- Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 1993;143:1055-1062
- Leibovich SJ, Ross R. A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. *Am J Pathol* 1976;84:501-514
- Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975;78:71-100
- Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004;305:239-242
- Levy V, Lindon C, Zheng Y, Harfe BD, Morgan BA. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J* 2007;21:1358-1366
- Li H, Fu X, Zhang L, Huang Q, Wu Z, Sun T. Research of PDGF-BB gel on the wound healing of diabetic rats and its pharmacodynamics. *J Surg Res* 2008;145:41-48
- Li WW, Tsakanayannis D, Li VW. Angiogenesis: A Control Point for Normal and Delayed Wound Healing. in Li WW, Li VW. *Angiogenesis in Wound Healing. Contemp surgery* Suppl. Nov. 2003:5-11
- Li X, Gonias SL, Campana WM. Schwann cells express erythropoietin receptor and represent a major target for Epo in peripheral nerve injury. *Glia* 2005;51:254-265.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007;2:329-333
- Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7580-7584
- Lin MP, Marti GP, Dieb R, Wang J, Ferguson M, Qaiser R, Bonde P, Duncan MD, Harmon JW. Delivery of plasmid DNA expression vector for keratinocyte growth factor-1 using electroporation to improve cutaneous wound healing in a septic rat model. *Wound Repair Regen* 2006;14:618-624
- Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997;277:242-245
- Lindenblatt N, Menger MD, Klar E, Vollmar B. Darbepoetin-alpha does not promote microvascular thrombus formation in mice: role of eNOS-dependent protection through platelet and endothelial cell deactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1191-1198
- Lippert H. Geschichte der Wundheilung. in Lippert H. *Wundatlas. Kompendium der komplexen Wundbehandlung*. 3. Auflage, Stuttgart, Thieme Verlag 2006:3-6
- Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:473-479
- Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia Z, Li W, Xu J. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci* 2006;78:2255-2264
- Lo Nigro C, Maffi M, Fischel JL, Monteverde M, Catarsi P, Tonissi F, Lattanzio L, Riba M, Etienne-Grimaldi MC, Formento P, Milano G, Merlano M. Impact of erythropoietin on the effects of irradiation under hypoxia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1615-1623
- Lobov IB, Rao S, Carroll TJ, Vallance JE, Ito M, Ondr JK, Kurup S, Glass DA, Patel MS, Shu W, Morrissey EE, McMahan AP, Karsenty G, Lang RA. WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature* 2005;437:417-421
- Luster AD, Cardiff RD, MacLean JA, Crowe K, Granstein RD. Delayed wound healing and disorganized neovascularization in transgenic mice expressing the IP-10 chemokine. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:183-196
- Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2005;23:47-55

- Madden JW, Peacock EE Jr. Studies on the biology of collagen during wound healing. 3. Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal wounds. *Ann Surg* 1971;174:511-520
- Maeda M, Kadota K, Kajihara M, Sano A, Fujioka K. Sustained release of human growth hormone (hGH) from collagen film and evaluation of effect on wound healing in db/db mice. *J Control Release* 2001;77:261-272
- Magnanti M, Gandini O, Giuliani L, Gazzaniga P, Marti HH, Gradilone A, Frati L, Aglianò AM, Gassmann M. Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood* 2008;98:2872-2874
- Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA* 2005;293:90-95
- Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 1996;8:666-676
- Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 2005;15:599-607
- Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75-81
- Masuda S, Kobayashi T, Chikuma M, Nagao M, Sasaki R. The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:1038-1044
- Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F Jr, Tabira T, Sasaki R. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 1993;268:11208-11216
- Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production: oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994;269:19488-19493
- Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Iredale JP, Pugh CW, Johnson MH, Ratcliffe PJ. Sites of erythropoietin production. *Kidney Int* 1997;51:393-401
- McPherson RJ, Juul SE. High-dose erythropoietin inhibits apoptosis and stimulates proliferation in neonatal rat intestine. *Growth Horm IGF Res* 2007;17:424-430
- Menger MD, Laschke MW, Vollmar B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 2002;34:83-91
- Michaels J 5th, Churgin SS, Blechman KM, Greives MR, Aarabi S, Galiano RD, Gurtner GC. db/db mice exhibit severe wound-healing impairments compared with other murine diabetic strains in a silicone-splinted excisional wound model. *Wound Repair Regen* 2007;15:665-670
- Miller SJ, Burke EM, Rader MD, Coulombe PA, Lavker RM. Re-epithelialization of porcine skin by the sweat apparatus. *J Invest Dermatol* 1998;110:13-19
- Mirza R, Koh TJ. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine* 2011;56:256-264
- Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 1996;84:371-379
- Miyagawa S, Okada N, Takasaki Y, Iida T, Kitano Y, Yoshikawa K, Sakamoto K, Steinberg ML. Expression of proliferating cell nuclear antigen/cyclin in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1989;93:678-681
- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977;252:5558-5564
- Molan PC. The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *Int J Low Extrem Wounds* 2006;5:40-54
- Moll I. Funktionen der Haut. in Jung EG, Moll I (eds.) *Dermatologie*. 5. Auflage, Stuttgart, Thieme Verlag 2003:13-14
- Moon C, Krawczyk M, Lakatta EG, Talan MI. Therapeutic effectiveness of a single vs multiple doses of erythropoietin after experimental myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006;20:245-251
- Morakkabati N, Gollnick F, Meyer R, Fandrey J, Jelkmann W. Erythropoietin induces Ca²⁺ mobilization and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. *Exp Hematol* 1996;24:392-397
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997;76:105-116
- Most D, Efron DT, Shi HP, Tantry US, Barbul A. Characterization of incisional wound healing in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery* 2002;132:866-876
- Muir WW, Skarda RT, Sheehan W. Hemodynamic and respiratory effects of a xylazine-acetylpromazine drug combination in horses. *Am J Vet Res* 1979;40:1518-1522

- Müller-Ehmsen J, Schmidt A, Krausgrill B, Schwinger RH, Bloch W. Role of erythropoietin for angiogenesis and vasculogenesis: from embryonic development through adulthood. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:331-340
- Nakazono-Kusaba A, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Morimoto S, Furue M, Sasaguri T. PKC412 induces apoptosis through a caspase-dependent mechanism in human keloid-derived fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 2004;497:155-160
- Newman PJ, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:953-964
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376:37-43
- Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 1999;144:1235-1244
- Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 1995;15:244-249
- Oztürk M, Ustek D, Akbas F, Kösem M, Abaci N, Alagöl F, Oztürk G, Kotan C. The presence of erythropoietin receptor in parathyroid cells. *J Endocrinol Invest* 2007;30:35-37
- Panteleyev AA, Paus R, Ahmad W, Sundberg JP, Christiano AM. Molecular and functional aspects of the hairless (hr) gene in laboratory rodents and humans. *Exp Dermatol* 1998;7:249-267
- Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 1979;18:311-318
- Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:947-970
- Park SH, Choi MJ, Song IK, Choi SY, Nam JO, Kim CD, Lee BH, Park RW, Park KM, Kim YJ, Kim IS, Kwon TH, Kim YL. Erythropoietin decreases renal fibrosis in mice with ureteral obstruction: role of inhibiting TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1497-1507
- Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003;112:999-1007
- Patel NS, Kerr-Peterson HL, Brines M, Collino M, Rogazzo M, Fantozzi R, Wood EG, Johnson FL, Yaqoob MM, Cerami A, Thiernemann C. The delayed administration of pHBSP, a novel non-erythropoietic analogue of erythropoietin, attenuates acute kidney injury. *Mol Med* 2012;18:719-727
- Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, Thiernemann C. Pre-treatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int* 2004;66:983-989
- Pham C, Greenwood J, Cleland H, Woodruff P, Maddern G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. *Burns* 2007;33:946-957
- Phibbs RH, Wyler F, Neutze J. Rheology of microspheres injected into circulation of rabbits. *Nature* 1967;216:1339-1340
- Piatek S, Tautenhahn J. Physiologie der Wundheilung. in Lippert H. Wundatlas. Kompendium der komplexen Wundbehandlung. 3. Auflage, Stuttgart, Thieme Verlag 2006:31
- Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* 1992;140:1375-1388
- Puolakkainen PA, Reed MJ, Gombotz WR, Twardzik DR, Abrass IB, Sage HE. Acceleration of wound healing in aged rats by topical application of transforming growth factor-beta(1). *Wound Repair Regen* 1995;3:330-339
- Quaschnig T, Ruschitzka F, Stallmach T, Shaw S, Morawietz H, Goettsch W, Hermann M, Slowinski T, Theuring F, Hoher B, Lüscher TF, Gassmann M. Erythropoietin-induced excessive erythrocytosis activates the tissue endothelin system in mice. *FASEB J* 2003;17:259-261
- Rajkumar VS, Shiwen X, Bostrom M, Leoni P, Muddle J, Ivarsson M, Gerdin B, Denton CP, Bou-Gharios G, Black CM, Abraham DJ. Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. *Am J Pathol* 2006;169:2254-2265
- Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 1988;241:708-712

- Reid RR, Sull AC, Mogford JE, Roy N, Mustoe TA. A novel murine model of cyclical cutaneous ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2004;116:172-180
- Rezaeian F, Wettstein R, Egger JF, Sandmann F, Rücker M, Tobalem M, Vollmar B, Menger MD, Harder Y. Erythropoietin-induced upregulation of endothelial nitric oxide synthase but not vascular endothelial growth factor prevents musculocutaneous tissue from ischemic damage. *Lab Invest* 2010;90:40-51
- Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol* 2011;55:261-268
- Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999;93:2627-2636
- Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M. Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* 2003;33:891-896
- Ribatti D. Erythropoietin and tumor angiogenesis. *Stem Cells Dev* 2010;19:1-4
- Rico RM, Ripamonti R, Burns AL, Gamelli RL, DiPietro LA. The effect of sepsis on wound healing. *J Surg Res* 2002;102:193-197
- Rjiba-Touati K, Boussema IA, Belarbia A, Achour A, Bacha H. Protective effect of recombinant human erythropoietin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rat kidney. *Int J Toxicol* 2011;30:510-517
- Robson V, Dodd S, Thomas S. Standardized antibacterial honey (Medihoney) with standard therapy in wound care: randomized clinical trial. *J Adv Nurs* 2009;65:565-575
- Rodriguez Cruz Y, Mengana Tamos Y, Munoz Cernuda A, Subiros Martines N, Gonzalez-Quevedo A, Sosa Teste I, Garcia Rodriguez JC. Treatment with nasal neuro-EPO improves the neurological, cognitive, and histological state in a gerbil model of focal ischemia. *Sci World J* 2010;10:2288-2300
- Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* 2005;294:23-29
- Roger SD, Baker LR, Raine AE. Autonomic dysfunction and the development of hypertension in patients treated with recombinant human erythropoietin (r-HuEPO). *Clin Nephrol* 1993;39:103-110
- Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med* 1996;2:287-292
- Röthel H. Die Geschichte der Wundheilung: Das Zeitalter der Asepsis. in *Hartmann Wundforum Heidenheim CMC Medical Information* 2/1997:29-33
- Röthel H. Die Geschichte der Wundheilung: Mittelalter und jüngere Neuzeit. in *Hartmann Wundforum Heidenheim CMC Medical Information* 1/1997:29-32
- Röthel H. Die Geschichte der Wundheilung: Vorgeschichtliche Zeit und Antike. in *Hartmann Wundforum Heidenheim CMC Medical Information* 4/1996:30-33
- Saaristo A, Tammela T, Farkkilä A, Kärkkäinen M, Suominen E, Yla-Herttuala S, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *Am J Pathol* 2006;169:1080-1087
- Saba AA, Freedman BM, Gaffield JW, Mackay DR, Ehrlich HP. Topical platelet-derived growth factor enhances wound closure in the absence of wound contraction: an experimental and clinical study. *Ann Plast Surg* 2002;49:62-66
- Saito Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Horikawa M, Takenaka M, Ogawa F, Sugama J, Steeber DA, Sato S, Takehara K. The loss of MCP-1 attenuates cutaneous ischemia-reperfusion injury in a mouse model of pressure ulcer. *J Invest Dermatol* 2008;128:1838-1851
- Sandison JC. The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behaviour of living cells and tissues seen with the microscope. *Am J Anat* 1928;41:447-472
- Sandor G. Über die blutbildende Wirkung des Serums von Tieren, die in verdünnter Luft gehalten wurden. *Z. Gesamte Exp. Med* 1932;82:633-646
- Satake R, Kozutsumi H, Takeuchi M, Asano K. Chemical modification of erythropoietin: an increase in in vitro activity by guanidination. *Biochim Biophys Acta* 1990;1038:125-129
- Saunders WB, Bayless KJ, Davis GE. MMP-1 activation by serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse and regression in 3D collagen matrices. *J Cell Sci* 2005;118:2325-2340
- Savino R, Ciliberto G. A paradigm shift for erythropoietin: no longer a specialized growth factor, but rather an all-purpose tissue-protective agent. *Cell Death Differ* 2004;11:2-4
- Sayan H, Ozacmak VH, Guven A, Aktas RG, Ozacmak ID. Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *J Invest Surg* 2006;19:163-173

- Scheithauer M, Riechelmann H. Review Part I: Basic Mechanisms of Cutaneous Woundhealing. *Laryngo-Rhino-Otol* 2003;82:31-35
- Scheithauer M, Riechelmann H. Review Part II: Disorders in Cutaneous Woundhealing. *Laryngo-Rhino-Otol* 2003;82:36-39
- Schröder U, Arfors KE, Tangen O. Stability of fluorescein labeled dextrans in vivo and in vitro. *Microvasc Res* 1976;11:57-66
- Schwandt HJ, Heyduck B, Gunga HC, Röcker L. Influence of prolonged physical exercise on the erythropoietin concentration in blood. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1991;63:463-466
- Sereno M, García-Cabezas MA, De Castro J, Cejas P, Saenz EC, Belda-Iñiesta C, Feijoo JB, Larrauri J, Nistal M, Baron MG. Immunohistochemical expression of p53, Bcl-2, COX-2, C-erbB2, EPO-R, beta-catenin, and E-cadherin in non tumoral gastric mucous membrane. *Eur J Histochem* 2006;50:285-292
- Shalom A, Hadad E, Friedman T, Kremer E, Westreich M. Effect of hyaluronic acid on random-pattern flaps in rats. *Dermatol Surg* 2008;34:1212-1215
- Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philippe H, Sheaff M, Kieswich J, Allen D, Harwood S, Raftery M, Thiernemann C, Yaqoob MM. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2115-2124
- Sharples EJ, Thiernemann C, Yaqoob MM. Mechanisms of disease: Cell death in acute renal failure and emerging evidence for a protective role of erythropoietin. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005;1:87-97
- Shimoda M, Sawada T, Iwasaki Y, Mori S, Kijima H, Okada T, Kubota K. Erythropoietin strongly protects the liver from ischemia-reperfusion injury in a pig model. *Hepatogastroenterology* 2009;56:470-475
- Siebert N, Xu W, Grambow E, Zechner D, Vollmar B. Erythropoietin improves skin wound healing and activates the TGF- β signaling pathway. *Lab Invest* 2011;91:1753-1765
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-746
- Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4044-4049
- Smith PD, Polo M, Soler PM, McClintock JS, Maggi SP, Kim YJ, Ko F, Robson CM. Efficacy of growth factors in the accelerated closure of interstices in explanted meshed human skin grafts. *J Burn Care Rehabil* 2000;21:5-9
- Solaroglu A, Dede FS, Okutan E, Bayrak A, Haberal A, Kilinc K. A single dose of erythropoietin attenuates lipid peroxidation in experimental liver ischemia-reperfusion injury in the rat fetus. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004;16:231-234
- Soler PM, Wright TE, Smith PD, Maggi SP, Hill DP, Ko F, Jimenez PA, Robson MC. In vivo characterization of keratinocyte growth factor-2 as a potential wound healing agent. *Wound Repair Regen* 1999;7:172-178
- Sorg H, Harder Y, Krueger C, Reimers K, Vogt PM. The Nonhematopoietic Effects of Erythropoietin in Skin Regeneration and Repair: From Basic Research to Clinical Use. *Med Res Rev* 2012 in press
- Sorg H, Krueger C, Schulz T, Menger MD, Schmitz F, Vollmar B. Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related. *FASEB J* 2009;23:3049-3058
- Sorg H, Krueger C, Vollmar B (2007). Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat* 2007;211:810-818
- Spiess BD, Ley C, Body SC, Siegel LC, Stover EP, Maddi R, D'Ambra M, Jain U, Liu F, Herskowitz A, Mangano DT, Levin J. Hematocrit value on intensive care unit entry influences the frequency of Q-wave myocardial infarction after coronary artery bypass grafting. The Institutions of the Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:460-467
- Staiano-Coico L, Higgins PJ, Schwartz SB, Zimm AJ, Goncalves J. Wound fluids: A reflection of the state of healing. *Ostomy Wound Manag* 2000;46:85-93
- Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol* 2004;85:233-248
- Steed DL, Donohoe D, Webster MW, Lindsley L. Effect of extensive debridement and treatment on the healing of diabetic foot ulcers. Diabetic Ulcer Study Group. *J Am Coll Surg* 1996;183:614
- Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:143-149

- Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol* 2007;127:1009-1017
- Streit M, Beleznyay Z, Braathen LR. Topical application of the tumour necrosis factor-alpha antibody infliximab improves healing of chronic wounds. *Int Wound J* 2006;3:171-179
- Sun L, Xu L, Chang H, Henry FA, Miller RM, Harmon JM, Nielsen TB. Transfection with aFGF cDNA improves wound healing. *J Invest Dermatol* 1997;108:313-318
- Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 2005;36:1672-1678
- Sundberg C, Ljungström M, Lindmark G, Gerdin B, Rubin K. Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:1377-1388
- Svensjö T, Pomahac B, Yao F, Slama J, Eriksson E. Accelerated healing of full-thickness skin wounds in a wet environment. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:602-612;613-614
- Szczepański M, Kamianowska M, Wnuczko K, Pietruczuk M, Wolczyński S. The influence of erythropoietin (Epo) on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) and platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) expression on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha). *Wiad Lek* 2007;60:22-27
- Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 1981;154:1899-1909
- Tautenhahn J, Jannasch O, Lippert H. Wunde, Wundheilung, Wundbehandlung; *Allgemeine und Viszeralchirurgie up2date* 2007;3:201-216
- Teng R, Calvert JW, Sibmooh N, Piknova B, Suzuki N, Sun J, Martinez K, Yamamoto M, Schechter AN, Lefer DJ, Noguchi CT. Acute erythropoietin cardioprotection is mediated by endothelial response. *Basic Res Cardiol* 2011;106:343-354
- Thomas S. Alginate dressings in surgery and wound management--Part 1. *J Wound Care* 2000;9:56-60
- Thomas S. Hydrocolloid dressings in the management of acute wounds: a review of the literature. *Int Wound J* 2008;5:602-613
- Tilgen W, Eming S. Modern wound management. *Hautarzt* 2007;58:937-938
- Tobu M, Iqbal O, Fareed D, Chatha M, Hoppensteadt D, Bansal V, Fareed J. Erythropoietin-induced thrombosis as a result of increased inflammation and thrombin activatable fibrinolytic inhibitor. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:225-232
- Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV, El-Sherif N. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:990-994
- Urao N, Okigaki M, Yamada H, Aadachi Y, Matsuno K, Matsui A, Matsunaga S, Tateishi K, Nomura T, Takahashi T, Tatsumi T, Matsubara H. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2006;98:1405-1413
- Van Noorden CJ. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem* 2001;103:241-251
- Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:348-355.
- Vijayasekaran S, Fitton JH, Hicks CR, Chirila TV, Crawford GJ, Constable IJ. Cell viability and inflammatory response in hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea. *Biomaterials* 1998;19:2255-2267
- Vilarinho KA, de Oliveira PP, Saad MJ, Eghtesady P, Filho LM, Vieira RW, Petrucci O. Erythropoietin protects the systolic function of neonatal hearts against ischaemia/reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012 article in press
- Villa P, van Beek J, Larsen AK, Gerwien J, Christensen S, Cerami A, Brines M, Leist M, Ghezzi P, Torup L. Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:552-563
- Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K. Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg* 1992;75:421-430
- Vollmar B, El-Gibaly AM, Scheuer C, Strik MW, Bruch HP, Menger MD. Acceleration of cutaneous wound healing by transient p53 inhibition. *Lab Invest* 2002;82:1063-1071

- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994;145:1421-1431
- Vollmar B, Laschke MW, Rohan R, Koenig J, Menger MD. In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol* 2001;159:1661-1670
- Watts EJ, Rose MT. Platelet-derived growth factor acts via both the Rho-kinase and p38 signaling enzymes to stimulate contraction in an in vitro model of equine wound healing. *Domest Anim Endocrinol* 2010;38:253-259
- Webster MH, Patterson J. The photo-electric plethysmograph as a monitor of microvascular anastomoses. *Br J Plast Surg* 1976;29:182-185
- Weiss MJ. New insights into erythropoietin and epoetin alfa: mechanisms of action, target tissues, and clinical applications. *Oncologist* 2003;8:18-29
- Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-870
- Whitaker MJ, Quirk RA, Howdle SM, Shakesheff KM. Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:1427-1437
- Wicke C, Schilling D, Feyerabend S, Königsrainer A, Stenzl A. Pathophysiology of wound healing and current treatment strategies in a urological context. *Urologe A* 2007;46:1721-1734
- Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care* 1998;21:822-827
- Wiessner C, Allegrini PR, EkatoDRAMIS D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:857-864
- Wish JB, Coyne DW. Use of erythropoiesis-stimulating agents in patients with anemia of chronic kidney disease: overcoming the pharmacological and pharmacoeconomic limitations of existing therapies. *Mayo Clin Proc* 2007;82:1371-1380
- Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:969618
- Wright M. Pharmacologic effects of ketamine and its use in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc* 1982;180:1462-1471
- Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007;25:2648-2659
- Xing BR, Li TZ, Bian HN, Qi SH, Xie JL, Xu YB, Hu XG. Comparison of the effects of rhEGF with rhbFGF on the acceleration of wound healing. *ZhonghuaShaoShang Za Zhi* 2003;19:340-343
- Xue Y, Lim S, Yang Y, Wang Z, Jensen LD, Hedlund EM, Andersson P, Sasahara M, Larsson O, Galter D, Cao R, Hosaka K, Cao Y. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nat Med* 2011;18:100-110
- Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovsesdi I, Steed DL, Billiar TR. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 1998;101:967-971
- Yamazaki T, Kanzaki M, Kamidono S, Fujisawa M. Effect of erythropoietin on Leydig cell is associated with the activation of Stat5 pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2004;213:193-198
- Yasuda Y, Fujita Y, Musha T, Tanaka H, Shiokawa S, Nakamatsu K, Mori S, Matsuo T, Nakamura Y. Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. *Ital J Anat Embryol* 2001;106:215-222
- Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998;273:25381-25387
- Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, Stahel PF, Schmidt OI, Alexandrovitch AG, Tsenter J, Shohami E. Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J* 2005;19:1701-1703
- Yu Q, Chen L, You Y, Zou C, Zhang Y, Liu Q, Cheng F. Erythropoietin combined with granulocyte colony-stimulating factor enhances MMP-2 expression in mesenchymal stem cells and promotes cell migration. *Mol Med Report* 2011;4:31-36
- Zawacki BE. Reversal of capillary stasis and prevention of necrosis in burns. *Ann Surg* 1974;180:98-102

-
- Zhang Q, Zhang J, Moe OW, Hsia CC. Synergistic upregulation of erythropoietin receptor (EPO-R) expression by sense and antisense EPO-R transcripts in the canine lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:7612-7617
 - Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, Figueroa YG, Liu J, Phinney DG, LaMarca HL, Florez L, Morris CB, Hoyle GW, Scandurro AB. Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a pro-angiogenic program in human mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2007;35:640-652 Erratum in: *Exp Hematol* 2007;35:1153-61

9. LEBENS LAUF

PERSON

Name: Christian Krüger
Geburtsdatum: 01.10.1982
Geburtsort: Güstrow
Nationalität: deutsch
Eltern: Klaus Krüger, Dipl. Ingenieur Maschinenbau
Dr. Helga Krüger, Fachärztin für Kieferorthopädie

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1989 – 1993 Grundschule Güstrow
1993 – 1999 John-Brinckman-Gymnasium, Güstrow
1999 – 2002 Gymnasium am Distelberg, Güstrow
2002 Abitur
2002 – 2003 Wehrdienst bei der 5. Inspektion der Marineversorgungsschule List/Sylt und dem Standortsanitätszentrum der Marinetechnikschule Parow/Stralsund

HOCHSCHULAUSBILDUNG

2003 – 2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Rostock
2006 Famulatur an der Klinik für Innere Medizin des KMG Klinikums Güstrow
2006 Famulatur an der Klinik für Anästhesie des KMG Klinikums Güstrow
2007 Famulatur in der Praxis für Gastroenterologie Rostock
2008 Famulatur an der Klinik für Orthopädische Chirurgie des Kantonsspitals Winterthur
2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Rostock

PRAKTISCHES JAHR

2008/2009 1. Klinik für Innere Medizin des KMG Klinikums Güstrow
2. Klinik für Chirurgie des KMG Klinikums Güstrow
3. Klinik für Orthopädische Chirurgie des Kantonsspitals Winterthur

WEITERBILDUNG

seit 02/2010 Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt für Unfallchirurgie und Orthopädie (Klinik für Unfallchirurgie/Orthopädie, Regio Klinikum Pinneberg, Chefarzt: Dr. J. Sühwold)

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN

seit 01/2007 Promotion am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. B. Vollmar)

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS*Originalarbeiten (peer-review)*

Sorg H, **Krueger C**, Vollmar B. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat.* 2007;211:810-818

Sorg H, **Krueger C**, Schulz T, Menger MD, Schmitz F, Vollmar B. Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related. *FASEB J* 2009;23:3049-3058

Sorg H, Schulz T, **Krueger C**, Vollmar B. Consequences of surgical stress on the kinetics of skin wound healing: major abdominal trauma delays and functionally alters dermal regeneration. *Wound Repair Regen* 2009;17:367-377

Sorg H, Harder Y, **Krueger C**, Reimers K, Vogt PM. The non-hematopoietic effects of erythropoietin in skin regeneration and repair: from basic research to clinical use. *Med Res Rev* 2012 (article in press)

Kongressbeiträge und publizierte Abstracts:

Krüger C, Sorg H, Schulz T, Vollmar B. Erythropoietin verzögert die dermale Re-Epithelialisierung und inhibiert die Gefäßreifung in einem neuen *in vivo* Modell der Hautwundheilung. 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum Berlin 2008. *Chir Forum* 2008;37:271-272

Schulz T, Sorg H, **Krüger C**, Vollmar B. Chirurgischer Stress bremst die Reepithelialisierung und beeinträchtigt die funktionelle Wiederherstellung der Haut. 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum Berlin 2008. *Chir Forum* 2008;37:285-286

Krüger C, Sorg H, Schulz T, Vollmar B. Erythropoietin verzögert die dermale Re-Epithelialisierung und inhibiert die Gefäßreifung in einem neuen *in vivo* Modell der Hautwundheilung. 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin 2008

Sorg H, **Krueger C**, Vollmar B. Extending the scope out of the chamber: Intravital insights in skin wound healing. 45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie (DGPW), Hannover 2007

Sorg H, **Krueger C**, Schulz T, Vollmar B. Erythropoietin in skin wound healing: is less more? Annual Meeting of the Society of Academic and Research Surgeons (SARS), Bristol, GB 2009

Sorg H, **Krueger C**, Schulz T, Vollmar B. Erythropoietin in skin wound healing: is less more?
4th Annual Congress of the Society of University Surgeons (SUS), Fort Myers, FL, USA 2009

PREISE

05/2008 The Walter Brendel Award 2008 der European Society For Surgical Research.
H. Sorg, **C. Krueger**, T. Schulz, B. Vollmar. Erythropoietin in skin wound healing: is less more?

10. Danksagung

An dieser Stelle ist es mir ein großes Bedürfnis all denjenigen sehr herzlich zu danken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock arbeiten zu dürfen. Durch ihre verlässliche Unterstützung und lehrreiche Kritik trug sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei. Mit der Entscheidung zu einer wissenschaftlichen Arbeit in Ihrer Abteilung konnte ich in die Welt der Forschung eintauchen und viele wichtige Erfahrungen und Eindrücke sammeln, die weit über die Doktorarbeit hinausgingen.

Gleichzeitig möchte ich Herrn Dr. med. Heiko Sorg für die schnelle und gründliche Einarbeitung in das Thema und Tiermodell sowie die kontinuierliche kritische Begleitung der Arbeit vom ersten Tag bis zur letzten Korrektur ganz herzlich bedanken. Er weckte in mir das Interesse als auch die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten und war stets ein verlässlicher Betreuer, der mich mit seiner Begeisterung für die experimentelle Forschung ansteckte und damit entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit war.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, ohne deren Einsatz und Unterstützung eine solche Arbeit überhaupt nicht möglich gewesen wäre. Ein großes Dankeschön geht an Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Frenz, Anja Gellert, Maren Nerowski für die unermüdliche, unkomplizierte und stets freundliche Hilfe. Kathrin Sievert, Karin Gerber und Reinhard Schwärmer danke ich sehr für die Aufzucht und Betreuung der für diese Arbeit notwendigen Tiere. Die professionelle und freundschaftliche Atmosphäre ließen mich stets mit Freude auch bis spät in die Nacht im Labor arbeiten. Ein ganz besonderer Dank dafür.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinem Kommilitonen Dr. med. Thorsten Schulz, welcher mit mir oft die Freuden und den Frust des Laboralltags teilte. Seine freundschaftliche Hilfe während der Einarbeitung, die späteren hilfreichen Tipps und unsere gegenseitige moralische Unterstützung waren für mich sehr wichtig.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger, Direktor des Instituts für Klinische und Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes für die hilfreiche Begleitung meiner Doktorarbeit aus der Ferne. Danken möchte ich auch Frau Christina Marx aus dem Institut für Klinisch und Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes für ihre Assistenz bei der Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie sowie Frau Gerlinde Kühnreich aus dem Institut für Anatomie der Universität des Saarlandes für die Anfertigung der entsprechenden Ultradünnschnitte.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium erst ermöglichten und damit am wesentlichsten zu dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Ihr stetes Interesse am Fortschreiten dieser Arbeit sowie die kontinuierliche Motivation während des Studiums als auch während meiner Tätigkeit als Unfallchirurg ließen mich nie das große Ziel aus den Augen verlieren. Gleichzeitig möchte ich meiner Schwester Sabine für ihre Hilfe bei der Korrektur und die moralische Unterstützung ganz herzlich danken. Euch sei diese Arbeit gewidmet. Ich danke euch für die große Unterstützung, die stets aufbauenden Worte, die vielen Telefonate und so vieles mehr.

Einfach Dankeschön für alles!

Christian Krüger

ANHANG

I. Mikrovaskuläre Parameter distaler Gefäße

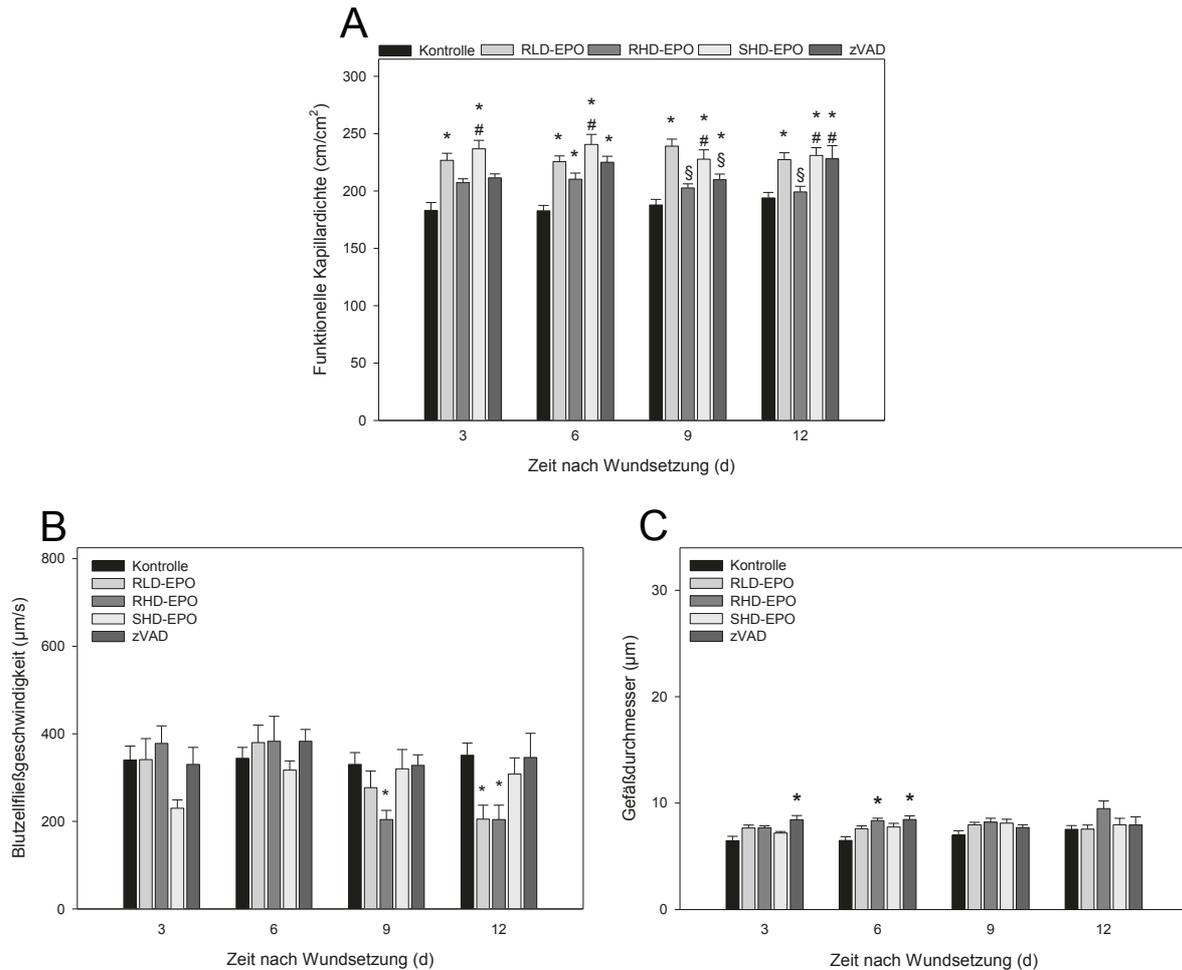


Abbildung 21: Quantitative Analyse der mikrovaskulären Parameter distaler Gefäße (Funktionelle Kapillardichte in cm/cm^2 (A); Blutzellfließgeschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{s}$ (B); Durchmesser in μm (C)). Die Tiere wurden täglich entweder mit NaCl (Kontrolle; 0,9% NaCl; 12,5ml/kg KG; $n=12$), RLD-EPO (400 IE/kg KG; $n=8$); RHD-EPO (5000IE/kg KG; $n=12$), oder SHD-EPO, welches einmalig am Tag der Wundsetzung gegeben wurde (5000IE/kg KG; $n=7$) behandelt. Ergänzend erhielten $n=8$ Mäuse täglich den Pan-Kaspase-Inhibitor zVAD-fmk (zVAD; 3,3 mg/kg KG). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SE angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; # $p < 0.05$ vs. RHD-EPO; § $p < 0.05$ vs. RLD-EPO.

II. WST-1-Assay

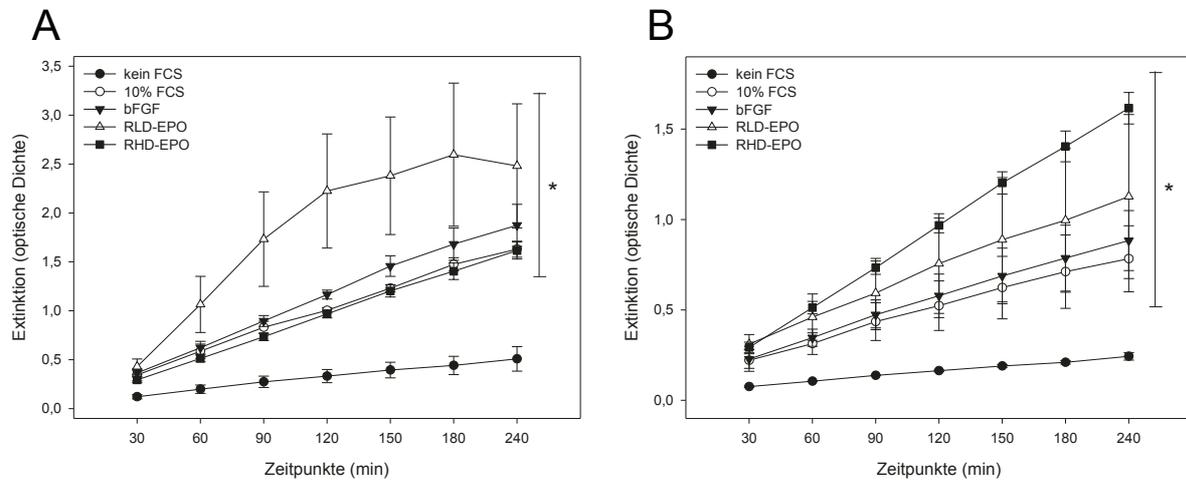


Abbildung 22: Quantitative Analyse der Proliferationsaktivität (optische Dichte) von Fibroblasten (A) und Keratinozyten (B). Die Zellen wurden entweder ohne FCS, mit 10% FCS, 20ng/ml bFGF, 5IE/ml EPO (RLD-EPO) oder 50IE/ml EPO (RHD-EPO) inkubiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; 1-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. * $p < 0.05$ vs. kein FCS.

THESEN ZUR DISSERTATION

Analyse der Rolle des Glykoprotein hormons Erythropoietin auf den Prozess der dermalen Wundheilung

1. Die posttraumatische Wiederherstellung der kutanen Integrität stellt evolutionsbiologisch eine entscheidende Fähigkeit von Organismen dar, um sich vor allem gegen exogene Noxen zu schützen.
2. Die kutane Wundheilung ist hierbei ein hochkomplexer Prozess, welcher neben der schnellen provisorischen Deckung eines Defekts auch die morphologische und funktionelle Regeneration der Haut beinhaltet.
3. Das komplizierte und dennoch geordnete Zusammenspiel einer Vielzahl spezialisierter Zellen wird untereinander durch systemische wie auch lokale molekularbiologische Interaktionen genau reguliert.
4. Angesichts der Komplexität dieser Vorgänge stellt die kutane Wundheilung nach wie vor einen hohen Anspruch an die klinische Forschung und Therapie.
5. In den westlichen Industrieländern liegt angesichts der demografischen Entwicklung die Inzidenz für chronische Wunden bei 4-5%, wobei alleine in Deutschland ca. 4 Mio. Mensch an chronischen Wunden leiden und daher ein erheblicher Bedarf an der Entwicklung neuer Therapiestrategien im Rahmen des Wundheilungsmangements besteht.
6. Als Basis für die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Verbesserung der Wundheilung konnte in den letzten Jahrzehnten durch eine Vielzahl experimenteller und klinischer Studien der Ablauf der physiologischen und pathologischen Wundheilung bis auf molekulare Ebene näher charakterisiert werden.

7. Aus der differenzierten Analyse der Wundheilungskaskade ergaben sich in den letzten Jahren viele pharmakologische Angriffspunkte zur gezielten Therapie pathologischer Stadien als auch zur Beschleunigung der physiologischen Wundheilung.
8. Die pharmakologische Beeinflussung der präexistenten als auch neugebildeten Gefäße im Wundbereich spielt angesichts der Bedeutung einer suffizienten nutritiven Perfusion für das regenerierende Gewebe hierbei eine herausragende Rolle.
9. In den bisher durchgeführten experimentellen Studien zur kutanen Regeneration sind die Veränderungen der mikrovaskulären Morphologie und Architektur der neugebildeten Gefäßnetzwerke im Wundbereich nicht ausreichend untersucht worden. Die vorliegende Studie konnte anhand eines neuen Modells der Hautwundheilung in der Rückenhautkammer der haarlosen SKH-1 Maus erstmals diesen wichtigen Aspekt neben dem makroskopisch erfassbaren Wundverschluss direkt und repetitiv analysieren.
10. Unter Kontrollbedingungen (NaCl) konnte in allen Versuchstieren ein kontinuierlicher Prozess der kutanen Defektdeckung beobachtet und quantitativ erfasst werden.
11. Die in den Kontrolltieren mittels Intravitalmikroskopie dargestellte Revaskularisierung zeigte über alle Wundheilungsphasen deutliche Veränderungen der neugebildeten Gefäßnetzwerke, wobei in dieser Studie erstmals die Unterscheidung und Beschreibung zirkulärer und radiärer Gefäße im Wundbereich gelang.
12. Anhand dieses neuentdeckten Maturierungsprozesses der mikrovaskulären Architektur im Rahmen der physiologischen Wundheilung kann der Einfluss von lokal als auch systemisch applizierten Medikamenten auf die Veränderungen der Mikrogefäße im Wundbereich verglichen und interpretiert werden.

13. Das Glykoproteinormon Erythropoietin (EPO) konnte in vielen experimentellen als auch klinischen Studien zeigen, dass es neben seiner hämatopoetischen Wirkung auch pleiotrope Effekte zur Unterstützung der Geweberegeneration vermittelt und damit möglicherweise ein multipotentes Therapeutikum für die Verbesserung der Wundheilung darstellt.
14. Durch den Einsatz verschiedener Dosierungen von EPO konnte in der vorliegenden Arbeit *in vivo* als auch *in vitro* anhand der makroskopischen und intravitalmikroskopischen Analysen eine dosisabhängige Verbesserung der Wundheilung beobachtet werden. Hier zeigte die einmalige hochdosierte Gabe von EPO (5000IE/kg EPO initial) zu Beginn der Wundheilungskaskade eine signifikante Akzeleration der Defektdeckung, wobei die repetitive hochdosierte Applikation von EPO (5000IE/kg/d) über den gesamten Versuchszeitraum (5000IE/kg/d EPO) den Wundverschluss signifikant verzögerte.
15. Die anti-apoptotischen Effekte von EPO konnten durch den Vergleich mit der Applikation des Pankaspaseinhibitors z-VAD im hier vorgestellten Wundheilungsmodell nachgewiesen werden. So zeigte gerade die wiederholte hochdosierte Gabe von EPO (RHD-EPO) vergleichbar mit der Applikation von z-VAD eine signifikante Verzögerung der Wundheilung. Die mirovaskulären und histologischen Analysen lassen hier vor allem auf eine spezifische Inhibition der Gewebsmaturierung und –regression schließen.
16. EPO besitzt eine pro-migratorische Wirkung auf Fibroblasten und Keratinozyten, welche mittels Wound-Scratch-Assay *in vitro* belegt werden konnte. Analog zu den Ergebnissen der *in vivo* Versuche konnte auch hier erstmals eine Dosisabhängigkeit für EPO nachgewiesen werden, sichtbar an der signifikanten Akzeleration der Zellmigration in der SHD-EPO-Gruppe (50IE/ml initial) gegenüber den mit RHD-EPO (50IE/ml/d) inkubierten Zellen, welche eine deutliche Hemmung der Migrationsfaktivität zeigten.
17. Durch die repetitive, hochdosierte EPO Gabe konnte in dieser Studie makroskopisch, mikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch eine signifikante Verzögerung der Wundheilungsprozesse gezeigt werden, was angesichts

der maßgeblichen Beschleunigung der Defektdeckung durch die ausschließlich initiale Hochdosisapplikation von EPO neben der nachgewiesenen Dosisabhängigkeit auch erstmals eine Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt impliziert.

18. Einige experimentelle wie auch klinische Studien konnten bereits zeigen, dass niedrig dosiertes EPO bzw. die solitäre Hochdosisgabe gerade zu Beginn von Regenerationsprozessen die spätere Heilung deutlich verbessern können. Leider fehlt bislang die klinische Anwendung dieser Erkenntnisse auf die Wundheilung in randomisierten Studien.
19. Die vorliegende Studie kann erstmals nachweisen, dass EPO in initialer hoher Dosierung gerade am Anfang der Wundheilungskaskade supportiv in die lokale wie auch systemische Regulation der komplexen Abläufe während der Defektdeckung eingreift.
20. Aus diesen Beobachtungen könnte sich für die Zukunft ein neues Therapieschema ergeben, dass angesichts des pleiotropen Wirkprofils von EPO entscheidend zur Verbesserung der Wundheilung beitragen und damit einer stetig größer werdenden Anzahl kranker Menschen helfen könnte.

EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Hamburg, den 24.10.2012

Christian Krüger