Universität Rostock Traditio et Innovatio

Universitätsmedizin Rostock

Aus der Zellbiologie

Leitung: Prof. Dr. Barbara Nebe

Stellvertretung: PD Dr. Kirsten Peters

Untersuchung der Effekte Thrombozyten-stämmiger Wachstumsfaktoren auf Humane Primärzellen *in vitro*

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Marie-Theres Eva Janus | geb. am 28.04.1992 in Ibbenbüren

aus

Rostock | 29.04.2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004288

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0
International Lizenz.

Universität Rostock Traditio et Innovatio

Universitätsmedizin Rostock

ERSTGUTACHTERIN: PD Dr. rer. nat. et. med. habil. Kirsten Peters
EINRICHTUNG: Arbeitsbereich Zellbiologie, Arbeitsgruppe Stammzellbiologie, Universitätsmedizin Rostock

ZWEITGUTACHTER:IN: Prof. Dr. rer. nat. Simone Erika Baltrusch
EINRICHTUNG: Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universitätsmedizin Rostock

DRITTGUTACHTER:IN: Prof. Dr. med. Andreas Greinacher
EINRICHTUNG: Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald

Eingereicht am 28.04.2022

Verteidigung am 07.03.2023

DOKTORARBEIT
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

Universität Rostock Traditio et Innovatio

Universitätsmedizin Rostock

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **VI**

Tabellenverzeichnis ..... **VII**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VIII**

I. Einleitung **1**

1.1 Die Wundheilung 1

1.1.1 Grundlagen der Wundheilung 1

1.1.2 An der Wundheilung beteiligte Zelltypen 3

1.1.3 An der Wundheilung beteiligte lösliche Faktoren 6

1.2 Die Zellproliferation bei der Wundheilung 9

1.3 Der Zelltod während der Wundheilung 10

1.4 Der therapeutische Einsatz von Wachstumsfaktoren und Thrombozyten-reichem Plasma 12

1.5 Motivation der Arbeit 13

II. Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien **14**

2.1 Laborgeräte 14

2.2 Verbrauchsmaterialien 14

2.3 Reagenzien und Chemikalien 15

2.4 Puffer, Lösungen, Medien 16

2.5 Software 17

III. Methoden **18**

3.1 Basalmedien 18

3.2 Zellgewinnung 19

3.2.1 Mesenchymale Stammzellen des Fettgewebes 19

3.2.2 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen 20
3.3 Zellkultivierung 21
3.4 Stimulation mit T-WF sowie TGF-β1 22
3.5 Quantifizierung der Zellkernanzahl mittels Hoechst-Färbung 23
3.6 Quantifizierung der metabolischen Aktivität mittels MTS-Test 23
3.7 Visualisierung und Quantifzierung des Lebend-Tot-Anteils 24
3.8 Zellzyklusanalysen mittels Two-Step-Cell-Cycle Assay 24
3.9 Analyse des Zelltodes mittels Mitochondrial Potential Assay bzw. Annexin-v-Assay 25
3.9.1 Mitochondrial Potential Assay 25
3.9.2 Annexin-V-Assay 26
3.10 Quantifizierung der Zytokine und Chemokine 27
3.11 Statistik 29
IV. Ergebnisse 30
4.1 Einfluss der Wachstumsfaktorexposition auf die Morphologie der Zellen 30
4.1.1 Morphologie der adMSC 30
4.1.2 Morphologie der HDMEC 31
4.2 Morphologie der adMSC Mittels Lebend/Tot-Färbung nach Wachstumsfaktorexposition 32
4.2.1 Lebend/Tot-Färbung der adMSC 32
4.2.2 Lebend/Tot-Färbung der HDMEC 33
4.3 Testung der Viabilität mittels Lebend/Tot-Färbung 34
4.4 Nachweis der Metabolischen Aktivität nach Wachstumsfaktorexposition 36
4.4.1 Normierung der Metabolischen Aktivität auf die Zellzahl 38
4.5 Proliferation nach Wachstumsfaktorexposition 40
4.5.1 Entwicklung der Zellzahlen nach Wachstumsfaktorexposition 40
4.5.2 Zellzyklusanalysen nach Wachstumsfaktorexposition 42
4.6 Spezifische Untersuchungen zur Apoptose 43
4.6.1 Analyse viabler und apoptotischer Zellen 43
4.6.2 Untersuchungen zum Zelltod durch Apoptose 46

4.7 Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen 47

4.7.1 G-CSF und GM-CSF 47

4.7.2 IL-6 und IL-8 49

V. Diskussion 52

5.1 Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Zellmorphologie 52

5.2 Viabilität von adMSC und HDMEC unter dem Einfluss von T-WF und TGF-β1 52

5.3 Proliferation der adMSC und HDMEC unter dem Einfluss von T-WF und TGF-β1 53

5.4 Der Zellzyklus und die Apoptose der adMSC und HDMEC in Abhängigkeit von der Zugabe an T-WF und TGF-β1 55

5.5 Die Effekte der gemeinsamen Gabe von T-WF und TGF-β1 auf adMSC und HDMEC 56

5.6 Die Effekte von T-WF und TGF-β1 auf die Freisetzung löslicher Faktoren 56

5.7 Ausblick 58

VI. Zusammenfassung 60

VII. Literatur 61

VIII. Anhang 72

IX. Thesen 81

Eidesstattliche Versicherung 82

Danksagung 83

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Cutis 1
Abb. 2: Die Phasen der Wundheilung im zeitlichen Verlauf nach Verletzung 2
Abb. 3: Vereinfachte schematische Darstellung des Endothels mit der Basalmembran 4
Abb. 4: Rolle der MSC in den einzelnen Phasen der Wundheilung 5
Abb. 5: Schematische Darstellung der Rolle der T-WF während der einzelnen Phasen der Wundheilung 8
Abb. 6: Schematische Darstellung des Zellzyklus 10
Abb. 7: Vergleichende schematische Darstellung der zellulären Vorgänge bei Apoptose und Nekrose 11
Abb. 8: Prinzip eines Sandwich-ELISA zum Antigennachweis 28
Abb. 9: Phasenkontrastmikroskopie von adMSC 30
Abb. 10: Phasenkontrastmikroskopie von HDMEC 31
Abb. 11: Lebend/Tot-Färbung der adMSC 32
Abb. 12: Lebend/Tot-Färbung der HDMEC 33
Abb. 13: Darstellung des Lebend/Tot- Anteils 35
Abb. 14: Nachweis der metabolischen Aktivität 37
Abb. 15: MTS Umsatz bezogen auf die Zellzahl (Quotient) 39
Abb. 16: Quantifizierung der Zellzahl 41
Abb. 17: Zellzyklusanalyse mittels Two-Step-Cell-Cycle Analysis Assay. 43
Abb. 18: Nachweis der lebenden und toten Zellen 44
Abb. 19: Viable, nekrotische und apoptotische Zellen (frühe und späte Apoptose) 46
Abb. 20: Freisetzung von G-CSF und GM-CSF in dem Zellkulturüberstand 48
Abb. 21: Freisetzung von IL-6 und IL-8 50
Abb. 22: Zellzyklusanalyse mittels Two-Step-Cell-Cycle Analysis Assay 73
Abb. 23: Nachweis von viablen, nekrotischen und apoptotischen Zellen (frühe und späte Apoptose) nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Thrombozyten-stämmigen Wachstumsfaktoren bzw. TGF-β1 74
Abb. 24: Nachweis von Zytokinen und Chemokinen nach 48-stündiger Stimulation im Zellkulturüberstand, die nur bei den adMSC aufgefunden wurden. 79
Abb. 25: Nachweis von Zytokinen und Chemokinen nach 48-stündiger Stimulation im Zellkulturüberstand, die nur bei den HDMEC aufgefunden wurden 80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung ausgewählter Zytokine 7
Tabelle 2: Komplettmedien..... 18
Tabelle 3: Stimulationskombinationen T-WF ohne bzw. mit TGF-β1-Zugabe. 22
Tabelle 4: Stimulationskombinationen T-WF ohne bzw. mit TGF-β1 Zugabe. 25
Tabelle 5: Mediane der Lebend/Tot-Ratio bei den HDMEC mit Zugabe von 5 % an T-WF in Abhängigkeit von der unterschiedlichen TGF-β1- Konzentration 36
Tabelle 6: Metabolische Aktivität der adMSC bei unterschiedlichen Konzentrationen sowohl an T-WF als auch TGF-β1 38
Tabelle 7: Quotienten MTS-Umsatz/Zellzahl der adMSC und HDMEC bei unterschiedlichen Konzentrationen von T-WF und TGF-β1 40
Tabelle 8: Zellzahlen der adMSC bei unterschiedlichen Konzentrationen von T-WF und TGF-β1…… 42
Tabelle 9: Mediane der viablen Zellen bei den adMSC mit Zugabe von 5% an T-WF in Abhängigkeit von der unterschiedlichen TGF-β1- Konzentration 45
Tabelle 10: Mediane der toten Zellen bei den HDMEC mit Zugabe von 5% an T-WF in Abhängigkeit von der unterschiedlichen TGF-β1- Konzentration 45
Tabelle 11: Viable und nekrotische Zellen sowohl bei adMSC als auch HDMEC bei der Untersuchung des Zelltodes mittels des Annexin-V-Assays..... 46
Tabelle 12: Mediane der G-CSF- Menge im Überstand der adMSC nach Zugabe von T-WF und TGF-β1 48
Tabelle 13: Mediane der GM-CSF Menge im Überstand der HDMEC nach Zugabe von T-WF und TGF-β1 49
Tabelle 14: Mediane der Menge an IL-6 im Überstand der adMSC..... 50
Tabelle 15: Mediane der Menge an IL-6 im Überstand der HDMEC 51
Tabelle 16: Mediane der Menge an IL-8..... 51
Tabelle 17: Spenderdetails adMSC 72
Tabelle 19: Lösliche Analyten, die mit dem Multiplex-Assay detektiert wurden 75

Abkürzungsverzeichnis

adMSC……..……..mesenchymale Stammzellen des Fettgewebes (adipose tissue derived mesenchymal cells)

BSA ….……Bovines Serum Albumin

CD ……..……..…Cluster of Differentiation

CDK……..…… Zyklin-abhängige Kinasen (cyclin dependant kinases)

CO_2…….…… Kohlenstoffdioxid

DAPI……4‘,6-Diaminidino-2-phylindol

di H_2O…….…..……deionisiertes Wasser

DMEM komplett……Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium mit 10% Humanserum, 1% Penicillin/ Streptomycin

DMSO……..….Dimethylsulfoxid

dsDNA……. doppelsträngige DNA

ELISA ……..……..…… Enzym-gekoppelter Immuno-Assay (enzyme-linked immuno sorbent assay)

EMT…….. epitheliale-mesenchymale Transition

FGF……..Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)

FI……...Fluoreszenzintensität

FKS…….……fetales Kälberserum

G-CSF…… Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor

GM-CSF ……Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

HDMEC……..Endothelzellen (human dermal microvascular endothelial cells)

IFN-γ……..…….. Interferon- γ

IL-1……Interleukin-1

IL-6……Interleukin-6

IL-8……Interleukin-8

IL-15……...…Interleukin-15

JC-1…….5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodid

MSC ……mesenchymale Stammzellen

MTS……..….3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

MV2…….……Microvascular Vessel’s 2 Medium

OD…….……..……optische Dichte

PBS…….……phosphatgepufferte Salzlösung

PFA……..……Paraformaldehyd

PDGF…….….Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor

PRP…….Thrombozyten-reiches Plasma (platelet rich plasma)
P/S…….……Penicillin/Streptomycin
RT……...……. Raumtemperatur
SAPE……...……..…… Streptavidin-Phycoerythrin
SVF……..…. stromale vaskuläre Fraktion
TNF-α…….…….. Tumornekrosefaktor- α
T-WF …….…….thrombozyten-stämmige Wachstumsfaktoren
TGF-β1……transformierender Wachstumsfaktor- β1 (transforming growth factor β)
VEGF ……....vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
x g……..….....G-Zahl g /Zentrifugenbeschleunigung

I. Einleitung

In Deutschland wird aktuell die Zahl der an chronischen, versorgungsrelevanten Wunden leidenden Patienten zwischen 400.000 und 1,8 Millionen geschätzt (1). Die Datenlage ist heterogen, da es wenig standardisierte und systematische Erhebungen gibt (2). Auslöser dieser chronischen Wunden ist meist eine vaskuläre Grunderkrankung, welche häufig auf einer durch Diabetes mellitus induzierten chronisch-venösen Insuffizienz und arteriellen Verschlusskrankheit basiert (1, 3). Daher ist die Behandlung der zugrunde liegenden Pathologie entscheidend für die Verhinderung der Entstehung chronischer Wunden und der damit einhergehenden Wundheilungsstörung. Um damit neuen Therapien und Entwicklungen begegnen zu können, ist somit nicht nur ein Verständnis der Wunde an sich, sondern auch der Wundheilung von großer Relevanz (1).

1.1 Die Wundheilung

1.1.1 Grundlagen der Wundheilung

Die Haut, auch Cutis genannt, besteht aus drei Schichten (Abb. 1): der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis/Corium) und der Unterhaut (Subcutis) (3, 4).

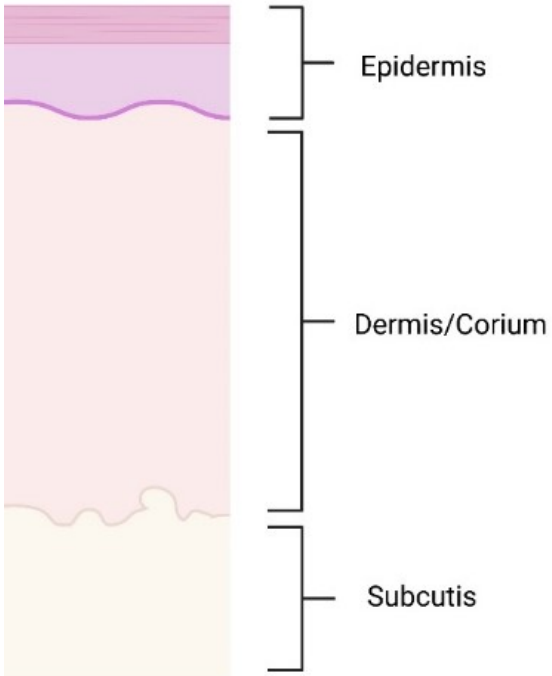

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Cutis (modifiziert nach (5), erstellt mit BioRender.com)

Die Haut ist das größte Organ des Körpers und besitzt vielfältige Funktionen. Sie dient unter anderem als Sinnesorgan, hilft bei der Temperaturregulation, unterstützt die Vitamin-D-Synthese und vorrangig schützt sie den Menschen vor äußeren Einflüssen (1, 3, 4). Wird die Haut geschädigt, spricht man von einer Wunde (3, 6).
Die Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der sich zeitlich in drei Phasen gliedern lässt: die entzündliche Phase, die proliferative Phase und die Phase der Remodellierung (Abb.2). Jede dieser Phasen kann ineinander übergehen und sich ebenso überlappen (1, 7–10).

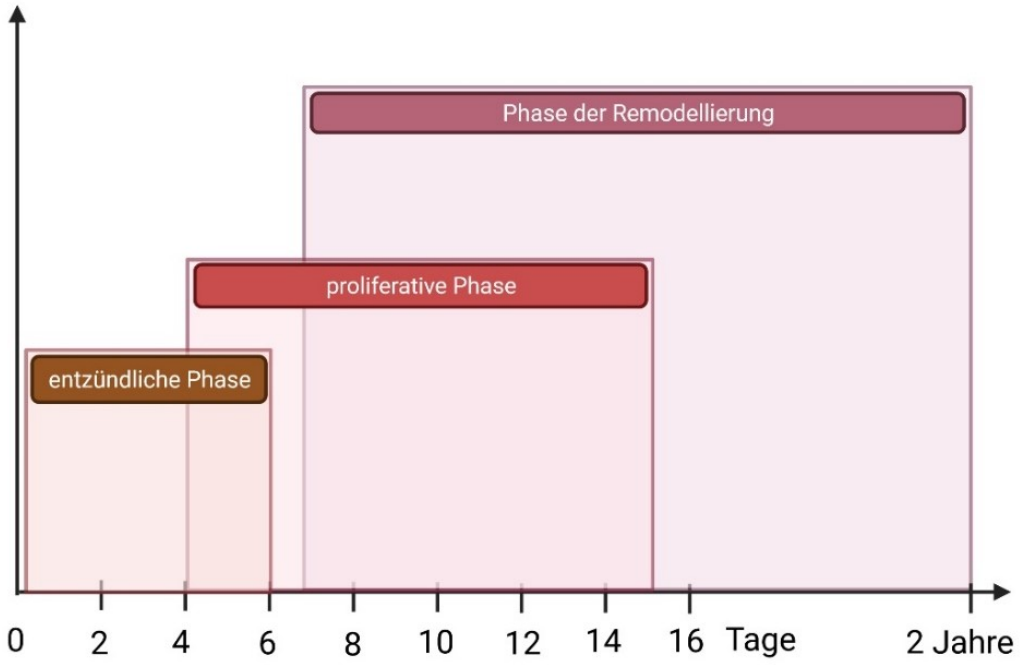

Abb. 2: Die Phasen der Wundheilung im zeitlichen Verlauf nach Verletzung (modifiziert nach (7) ,erstellt mit BioRender.com)

Ein verletztes Blutgefäß stellt den Beginn der inflammatorischen Phase der Wundheilung dar. Um das verletzte Gefäß zu verschließen, kommt es zu einer Aggregation verschiedener Zelltypen, wie Thrombozyten, die in ein Netz von Fibrinfasern eingebettet werden. Dieser gebildete Thrombus stellt das Gerüst für die weiteren Reparationsvorgänge während der Wundheilung dar (10, 11). Der gebildete Thrombus sezerniert verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z.B. den Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor, PDGF), den transformierenden Wachstumsfaktor β (transforming growth factor beta, TGF-β), den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF), Zytokine sowie andere inflammatorische Proteine (7, 10). Diese Wachstumsfaktoren und weitere inflammatorische Zellen, wie Makrophagen, setzen Prozesse in Gang, die ein Verschließen der gesamten Wunde bahnen und den Übergang in die proliferative Phase der Wundheilung markieren (10, 11). In der proliferativen Phase der Wundheilung kommt es zu einem Wundverschluss, zu der

Ausbildung von Granulationsgewebe und zu einer Reepithelialisierung. Am Wundverschluss entscheidend beteiligt sind die Fibroblasten. Fibroblasten können während der Wundheilung weitere Differenzierungsschritte vollziehen und dann kontraktile Eigenschaften von glatten Muskelzellen aufweisen. Sie werden dann als „Myofibroblasten“ bezeichnet. Das während dieser Regenerationsphase entstehende sogenannte Granulationsgewebe besteht u.a. aus Fibroblasten, Kapillaren und inflammatorischen Zellen (10, 12). Parallel dazu wandern Keratinozyten von den Wundrändern zum Wundort, um die Wunde zu verschließen (Reepithelialisierung) (11). Die Phase der Remodellierung ist gekennzeichnet durch die Reorganisation, Degradation von Zell-bzw. Gewebetrümmern u.a. durch Matrix-degradierende Enzyme (Matrix-Metalloproteasen) und Synthese von Extrazellulärmatrix (z.B. Kollagene) durch Fibroblasten (7, 11, 12). Dadurch steigt die Festigkeit der Wunde immer mehr an, der Defekt wird vermehrt mechanisch stabil und es entsteht eine dichte, gefäßarme Narbe im Hautniveau (13).
Diese Vorgänge beschreiben den Wundheilungsprozess bei einer akuten Wunde, der nicht durch eine zugrundeliegende Pathophysiologie erschwert wird (3, 6). Von einer chronischen Wunde spricht man dann, wenn eine Wunde innerhalb von 8 Wochen mit entsprechender Therapie und unter Berücksichtigung der zugrundeliegenden Erkrankung nicht abheilt (1, 14). Gerade die Minderdurchblutung durch eine vorherrschende Grunderkrankung und die damit einhergehende erhöhte Infektionsneigung heraus fördern die Entstehung solcher, nicht heilender Wunden (3, 6).

1.1.2 An der Wundheilung beteiligte Zelltypen

1.1.2.1 Fibroblasten

Am Ende der inflammatorischen Phase befinden sich im Granulationsgewebe unter anderem Fibroblasten (9). Diese sind, neben den Endothelzellen, in der proliferativen Phase der Wundheilung die entscheidenden Zellen. Fibroblasten migrieren zum Wundgeschehen und werden u.a. durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Dort regen sie Keratinozyten zur Proliferation und Migration an und bilden durch die Stimulation mit u.a. PDGF und Tumornekrosefaktor- α (TNF-α) die vorläufige Extrazellulärmatrix. Einige dieser Wachstumsfaktoren befinden sich im Thrombus selbst und können die Fibroblasten autokrin aktivieren, beispielsweise der für Fibroblasten charakteristische PDGF. Während der Wundheilung verändern die Fibroblasten kontinuierlich ihren Phänotyp. Ein Beispiel dafür ist die durch TGF-β1 und PDGF induzierte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (7, 15). Die Myofibroblasten können kontrahieren und damit einen Wundverschluss bewirken, mit Fibroblasten interagieren und gemeinsam eine Narbe bilden. Diese Narbe wird dann im Laufe der Zeit aktiv in ein Typ I-Kollagen umgewandelt , gewinnt an Festigkeit und an Stabilität (13, 15).

1.1.2.2 Endothelzellen

Endothelzellen kleiden alle Blutgefäße des menschlichen Körpers aus und bilden bei einem durchschnittlichen Erwachsenen von 70 kg eine Oberfläche von mehr als 1000 m^2 (16). *In vivo* sind Endothelzellen an einer Basalmembran verankert, die eine zusätzliche Barriere zu dem daran vorbeifließenden Blut und zum Extrazellulärraum darstellt (Abb.3) (16).

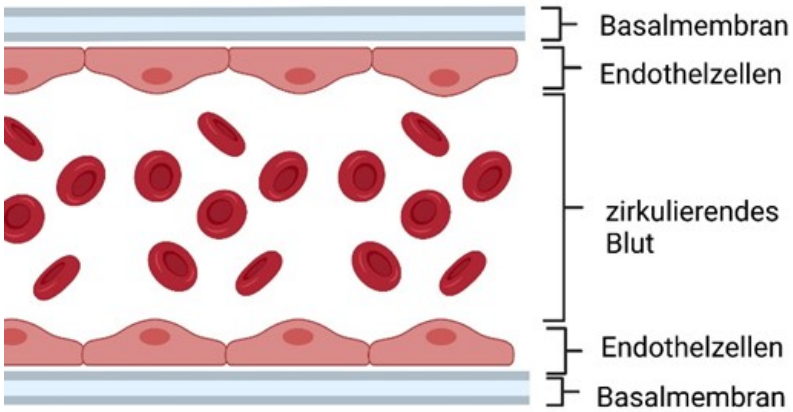

Abb. 3: Vereinfachte schematische Darstellung des Endothels mit der Basalmembran (erstellt mit BioRender.com)

Endothelzellen spielen nicht nur eine Rolle bei der Aufrechterhaltung einer Gewebshomöostase, sondern regulieren unter anderem sowohl den Blutfluss als auch die Blutgerinnung. Im Rahmen von Entzündungen und ganz besonders hinsichtlich der Wundheilung spielen die Endothelzellen eine entscheidende Rolle, insbesondere bei der Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) (17, 18). In die bei der Wundheilung entstehende bzw. veränderte Extrazellulärmatrix wandern Blutgefäße ein. Diese Blutgefäße werden unter anderem durch Endothelzellen und unter Einfluss von angiogenen Zytokinen wie VEGF und TGF-β gebildet (4, 19). Endothelzellen können außerdem auf die von mesenchymalen Stammzellen (MSC) ausgeschütteten parakrinen Signale und Mediatoren reagieren und aus ihnen entstehen. Auch die Differenzierung zu Perizyten, auf der Basalmembran von Endothelzellen aufsitzenden Zellen, wird durch die MSC unterstützt (8, 20).

1.1.2.3 Mesenchymale Stammzellen

Im Rahmen der Wundheilung sind auch mesenchymale Stammzellen (MSC) von Bedeutung. Die MSC gehören zu den adulten Stammzellen (21). Stammzellen werden definiert durch ihre Fähigkeit, über lange Zeit identische Kopien herzustellen und, sich in verschiedene Zelltypen

differenzieren zu können (22). Sie sind jedoch trotz ihrer Plastizität und Differenzierungsfähigkeiten größtenteils auf einen bestimmten Zelltyp festgelegt und zeichnen sich durch ihre eingeschränkte Proliferationsfähigkeit *in vitro* aus (23). Sie finden sich perivaskulär in fast jedem Gewebe des Körpers, unter anderem im Nabelschnurblut, im Knochenmark oder im Fettgewebe (8, 21, 24–28). Es wurde gezeigt, dass MSC zum Wundort migrieren und sich in verschiedene Zelltypen differenzieren können (27) Nach Maxson et al. spielen die MSC in den entsprechenden Phasen der Wundheilung eine wesentliche Rolle (Abb.4) (8). In der entzündlichen Phase der Wundheilung sind MSC in die Regulation der Entzündungsreaktion involviert. In der proliferativen Phase setzen sie PDGF und VEGF frei und rekrutieren weitere Stammzellen zum Wundgeschehen. In der länger anhaltenden Phase der Remodellierung ist die Rolle der MSC v.a. gekennzeichnet durch die Produktion von TGF-β (Abb.4) (8).

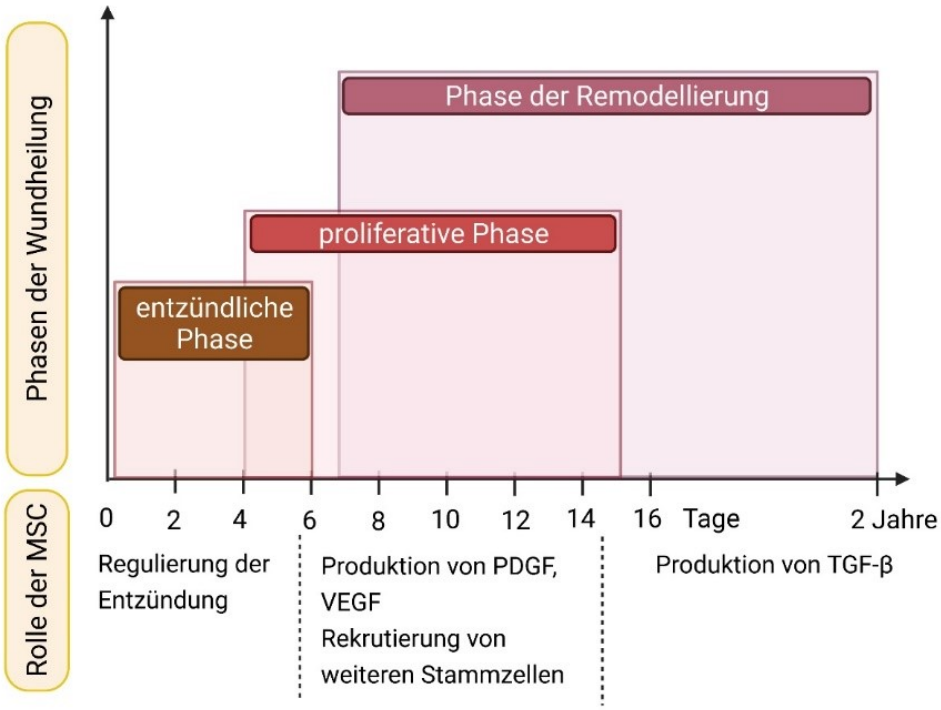

Abb. 4: Rolle der MSC in den einzelnen Phasen der Wundheilung (modifiziert nach (8), erstellt mit BioRender.com)

Es gibt von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapien (International Society for Cellular Therapy, ISCT) Kriterien, die die MSC definieren, wie u.a. die Fähigkeit, sich *in vitro* in Osteoblasten, Adipozyten und Chrondrozyten differenzieren zu können (26, 27). Die in dieser Arbeit verwendeten MSC aus dem Fettgewebe (adipose tissue derived MSC, adMSC) zeigen ebendiese Eigenschaften (29). Darüber hinaus können sich im Rahmen der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) epitheliale Zellen durch biochemische Vorgänge in den Phänotyp

einer mesenchymalen Stammzelle verwandeln und die Geweberegeneration so unterstützen (30).

1.1.2.4 Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose, scheibchenförmige Blutbestandteile mit einem Durchmesser von 2,0 bis 5,0 µm und einer Dicke von 0,5 µm (9, 31, 32). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Adhäsion und Aggregation spielen sie eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung. Die in den Thrombozyten am häufigsten vorhandenen Organellen sind die α-Granula. Diese sind enthalten u.a. Gerinnungsfaktoren, fibrinolytische Faktoren , Proteasen und die für die Wundheilung so bedeutsamen Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine, v.a. PDGF, TGF-β1 und VEGF (7, 9, 31, 33, 34). Während der inflammatorischen Phase der Wundheilung formen die Thrombozyten einen Thrombus , setzen eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen frei und bewirken dahingehend die initiale Hämostase, die primäre Blutstillung (7).

1.1.3 An der Wundheilung beteiligte lösliche Faktoren

Die Wundheilung als komplexer Prozess vereint nicht nur eine Vielzahl an unterschiedlichen Zellen. Es wird ferner auch ein Netzwerk an Signalmolekülen, den Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren benötigt (35).

1.1.3.1 Zytokine

Zytokine sind regulatorisch aktive Peptide oder Glykoproteine, die Immun- oder Reparaturprozesse modulieren, indem sie das Zellwachstum, die Differenzierung, den Stoffwechsel und die Proteinsynthese beeinflussen (7). Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, die Zytokine einzuteilen, generell jedoch wird eine Unterscheidung aufgrund von Struktur und Funktion getroffen (36). Unsere Kategorisierung basiert auf Löffler/Petrides, die die Zytokine in Interleukine (z.B. Interleukin-1, IL-1; Interleukin-6, IL-6; Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, GM-CSF; Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor, G-CSF), Interferone (z.B. Interleukin-10, IL-10; Interferon- γ, IFN-γ), Chemokine (z.B. Interleukin-8, IL-8) und Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) einteilt (37). Diese sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Einteilung ausgewählter Zytokine (modifiziert nach Löffler/Petrides (37))

Interleukine	Interferone	Chemokine	Wachstumsfaktoren
z.B. IL-1, IL-6,GM-CSF,G-CSF	z.B. IL-10, IFN-γ	z.B. IL-8	z.B. TGF-β, PDGF, VEGF

Die Interleukine sind Peptidhormone, welche bei der Immunabwehr, den Entzündungsreaktionen, der Hämatopoese ,der Apoptose und auch bei der Wundheilung einen entscheidenden Anteil haben (7, 37). Sie können von unterschiedlichen Zellen, wie Monozyten, Makrophagen oder auch Keratinozyten, aber hauptsächlich von T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gebildet werden (7, 38). Insbesondere die Interleukine vermitteln wundheilungs-relevante Effekte wie die Proliferationsstimulation von Keratinozyten und Fibroblasten und die Regulation der Immunantwort (7, 39). Sowohl IL-1 als auch IL-6 sind insbesondere an der Inflammation beteiligt, unterstützen die Reepithelialisierung und die Angiogenese (35, 39, 40). IL-1 soll ferner, neben anderen Zytokinen, mit dem Endothel kommunizieren und das endotheliale Wachstum hemmen, während IL-6 auch von MSC sezerniert wird (41, 42). Unter der Gruppe der Interleukine haben die Kolonie-stimulierenden Faktoren wie GM-CSF und G-CSF im Rahmen der Wundheilung stimulatorische Effekte (7). GM-CSF ist vor allem während der inflammatorischen Phase der Wundheilung entscheidend, indem es die Zahl der Neutrophilen erhöht. Es wird diskutiert, dass GM-CSF die Keratinozytenproliferation stimulieren soll und damit die Reepithelialisierung vorantreibt. GM-CSF soll die Migration und Proliferation von Endothelzellen unterstützen (35). Auch G-CSF unterstützt die Heilungsreaktion verschiedener Gewebe (43). Wie GM-CSF, fördert G-CSF die endotheliale Proliferation und soll darüber hinaus auch MSC mobilisieren können (44, 45). Es ist außerdem bekannt, dass G-CSF die Entzündungsreaktion abschwächen kann und die Angiogenese induziert. Diese Eigenschaften tragen zur Förderung der Wundheilung bei (43).

Interferone sind eine Untergruppe der Zytokine, deren Wirkung sich von ihrem Namen ableitet: sie „interferieren“ mit dem viralen Wachstum. Sie haben eine immunmodulierende, antivirale und antiproliferative Wirkung (37, 46). IL-10 kann beispielsweise die Synthese unterschiedlicher Zytokine, wie z.B. IL-1 und IFN-γ inhibieren (46, 47). IFN-γ ist wichtig beim Remodelling von Wunden und kann lokal die Wundkontraktion reduzieren (47).

Chemokine sind proinflammatorische Moleküle die, wie der Name vermuten lasst, überwiegend chemotaktischen Eigenschaften besitzen. Die Bewegung von Zellen entlang eines durch chemische Botenstoffe hervorgerufenen extrazellulären Gradienten wird Chemotaxis genannt. Durch die Initialisierung der Leukozytenadhäsion an das Endothel und der darauf folgenden

Diapedese sind die Chemokine an der Extravasation von Leukozyten in entzündliches Gewebe beteiligt (7, 36, 48, 49). Im Kontext der Wundheilung werden sie von verschiedenen Zellen, wie Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Leukozyten produziert (50) . IL-8 gehört zur Familie der Chemokine, wird von Makrophagen, Mastzellen, Keratinozyten, Lymphozyten und Endothelzellen gebildet und ist entscheidend beteiligt an der Inflammation und Hämostase. IL-8 induziert die Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis und unterstützt die Epithelialisierung durch erhöhte Migration und Proliferation der Keratinozyten (7, 35, 47, 50). Bei Endothelzellen fördert IL-8 die Proliferation und Angiogenese (51).

1.1.3.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Mediatoren, welche die Wundheilung beispielsweise durch die Synthese von Proteinen, der Extrazellulärmatrix, Zelldifferenzierung und den Zelltod beeinflussen (7). Eine entscheidende Rolle im Rahmen der Wundheilung spielen die Thrombozyten-stämmigen Wachstumsfaktoren (T-WF), PDGF, VEGF und TGF-β (7). Insbesondere durch die Freisetzung der α-Granula der Thrombozyten zeigen diese ihre Bedeutung. PDGF und TGF-β aktivieren inflammatorische Zellen wie Neutrophile oder Makrophagen. Diese Wachstumsfaktoren in Kombination mit VEGF bewirken die Ausbildung von Granulationsgewebe und induzieren die Angiogenese und die Kollagensynthese (Abb.5) (52).

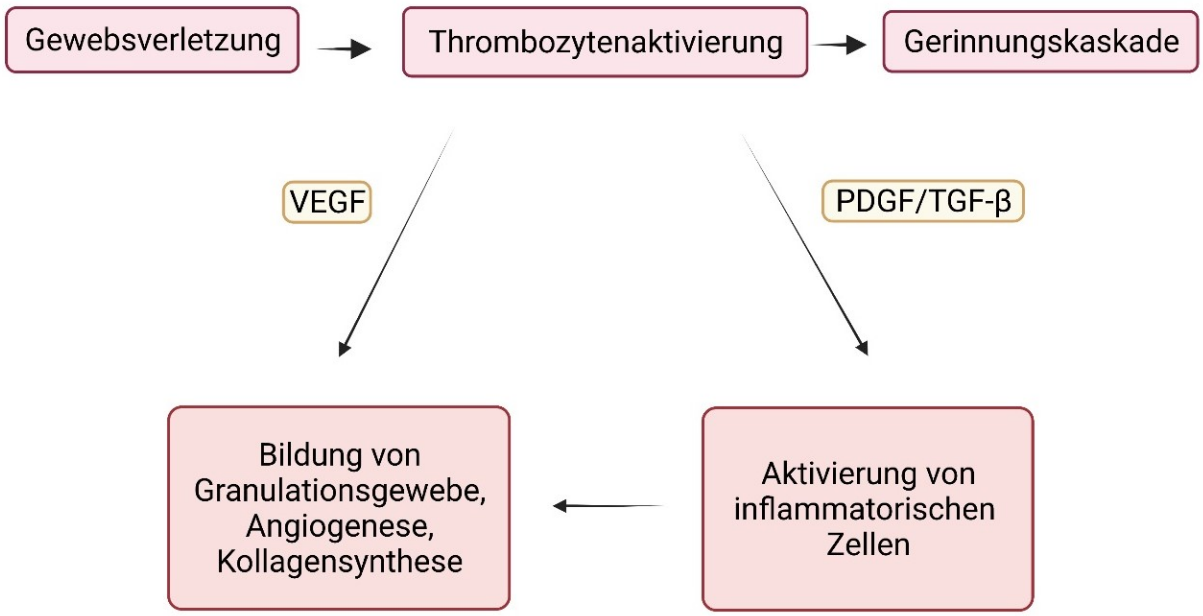

Abb. 5: Schematische Darstellung der Rolle der T-WF während der einzelnen Phasen der Wundheilung (modifiziert nach (52), erstellt mit BioRender.com)

1.1.3.2.1.1 PDGF

PDGF wird nicht nur von Thrombozyten, sondern auch von anderen Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen sezerniert (7, 53). PDGF ist in jeder Phase der Wundheilung vorhanden und wird, direkt nach der Verletzung, von Thrombozyten freigesetzt und befindet sich folglich in der Wundflüssigkeit (35). Dies bewirkt, dass Neutrophile, Makrophagen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und MSC zum Wundgeschehen transportiert werden bzw. dorthin migrieren (35, 52). Ferner stimuliert PDGF die Makrophagen zur Synthese von weiteren Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF-β (35, 52). Bereits 1990 konnten Pierce et. al zeigen, dass die entzündliche Phase der Wundheilung durch die Zugabe von PDGF verkürzt und die Bildung einer provisorischen extrazellulären Matrix mit einer anschließenden Kollagenbildung beschleunigt werden kann (53, 54).

1.1.3.2.1.2 TGF- β

Vom Wachstumsfaktor TGF-β gibt es zahlreiche Subtypen, die *in vivo* unterschiedliche und *in vitro* ähnliche Funktionen aufweisen (55). TGF-β konnte in einer Vielzahl von Zellen, wie z.B. Thrombozyten, Makrophagen, Lymphozyten oder Geweben wie z.B. Knochen und Nieren nachgewiesen werden (7, 46, 56). Ein einzelner Thrombozyt beispielsweise kann bis zu 1.200-1.400 Moleküle TGF-β freisetzen (57). Im Rahmen der Wundheilung stimuliert TGF-β die Synthese der Extrazellularmatrix und die Chemotaxis inflammatorischer Zellen. Als einer der stärksten Stimulatoren der Kollagensynthese ist TGF-β auch beim Narbenumbau und bei der Kontraktion innerhalb der Wunde beteiligt (7, 53, 56, 58).

1.2 Die Zellproliferation bei der Wundheilung

Im Rahmen der Wundheilung spielt die Zellproliferation unter anderem hinsichtlich der Wiederherstellung einer Gewebshomöostase, beispielsweise durch die Reepithelialisierung, eine entscheidende Rolle. Die Zellproliferation wird vom Zellzyklus und den ihn kontrollierenden Faktoren reguliert (59). Beim Zellzyklus handelt es sich um einen komplexen Prozess, bei dem während der Mitose aus einer Zelle zwei Tochterzellen entstehen (37, 60, 61). Es lassen sich 5 Phasen des Zellzyklus unterscheiden: die G_1-, S-, M-, G_2 und G_0-Phase (Abb.6) (37, 60, 62).

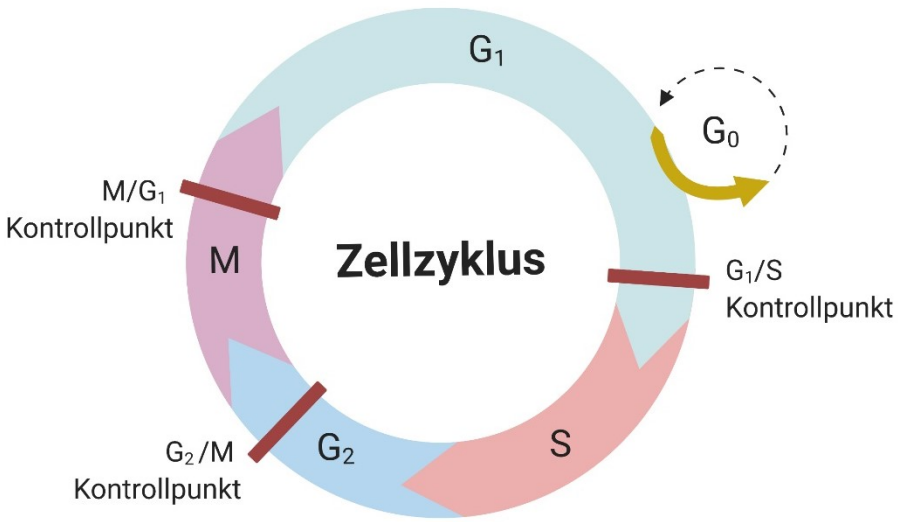

Abb. 6: Schematische Darstellung des Zellzyklus (erstellt mit BioRender.com)

Grundlegend lässt sich der Zellzyklus in die mitotische Phase und die Interphase einteilen. Zur Interphase gehören die G_1-, S- und G_2-Phase (60). In der S-Phase (Replikation) wird die DNA verdoppelt und in der M-Phase (Mitose) werden die Chromosomen auf die Tochterzellen verteilt. Die G_1- und G_2-Phase sind sogenannte „gaps“, Lücken, die die DNA-Synthese und Mitose voneinander trennen (60). In der G_1-Phase wird die DNA und ihre sie umgebenden Signale, wie Wachstumsfaktoren, geprüft, bevor sie in die S-Phase eintreten und repliziert werden können. In der G_2-Phase wird die neu replizierte DNA auf ihre Unversehrtheit überprüft. Proliferierende Zellen befinden sich in der G_1-, S-, M- oder G_2- Phase, nicht-proliferierende Zellen befinden sich in der G_0-Phase. Die in der G_0-Phase befindlichen Zellen nehmen somit nicht aktiv am Zellzyklus teil (60, 61). Jede der Zellzyklusphasen unterliegt verschiedenen Kontrollen (auch als „check points“ oder „restriction points“ bezeichnet) (Abb. 6): dem G_1/S-Kontrollpunkt, dem G_2/M-Kontrollpunkt und der M/G_1-Kontrollpunkt (37, 62, 63). Werden hier Schäden oder andere Fehler, wie eine ungenügende Nährstoffversorgung, detektiert, kann sich die Zelle nicht weiter replizieren (37, 62). Diese Schritte werden durch interne Kontrollmechanismen, die sogenannten Zykline und Zyklin-abhängigen Kinasen (cyclin dependant kinases, CDK) reguliert (60–64).

1.3 Der Zelltod während der Wundheilung

Um die Gewebehomöostase aufrecht erhalten zu können, muss es eine Balance zwischen Zellproliferation und dem Zelltod geben (65). Durch den programmierten Zelltod, die Apoptose, kontrolliert die Zelle nicht nur die Zellzahl und ihre Gewebsgröße, sondern sorgt auch dafür, dass geschädigte, infizierte oder gestresste Zellen den Organismus verlassen können (66,

67). Die Apoptose ist ein aktiver zellulärer Prozess, der in verschiedene Schritte gegliedert ist (Abb. 7 links) (62). Zu Beginn der Apoptose kommt es zu einer Kondensation des Chromatins, was zu einer Schrumpfung der Zelle führt (37, 68–71).

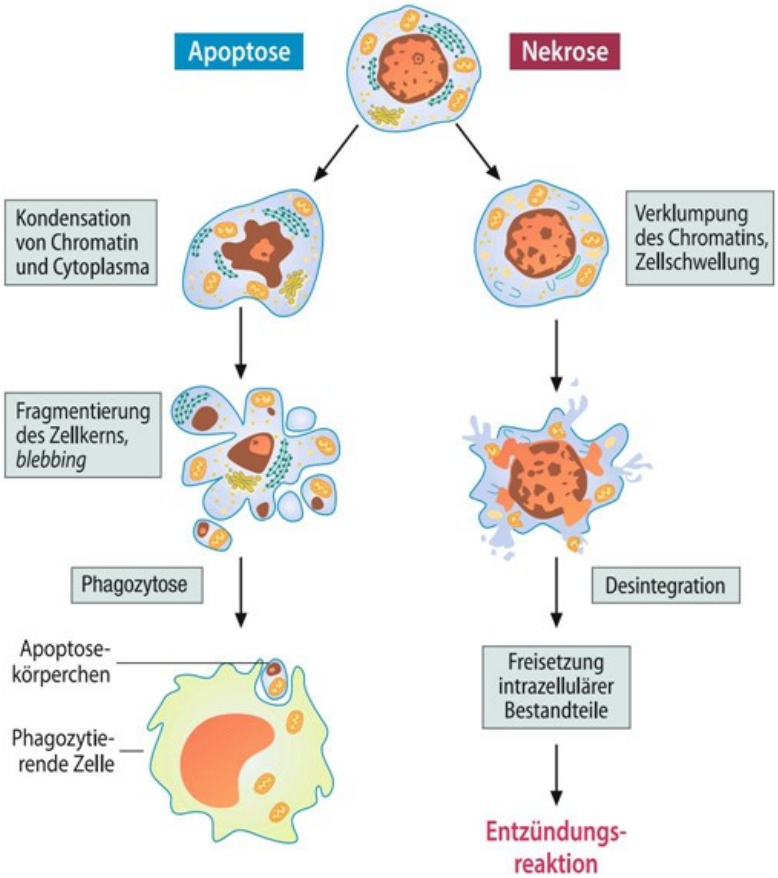

Abb. 7: Vergleichende schematische Darstellung der zellulären Vorgänge bei Apoptose und Nekrose nach Löffler/Petrides (37).

Die Plasmamembran wirft daraufhin Blasen, es kommt zum sogenannten „blebbing“, der Zellkern fragmentiert und die gesamte Zelle zerlegt sich in apoptotische Partikel (37, 70–72). Benachbarte Makrophagen und Granulozyten bauen diese durch Phagozytose ab (37, 70). Dadurch kommt es weder zu einer Entzündungsreaktion noch zu einer Aktivierung des Immunsystems (37). Im Gegensatz zur Apoptose handelt es sich beim nekrotischen Zelltod um einen passiven Prozess, der das Schrumpfen der Zelle an sich , die Kondensierung des Chromatins und die Fragmentierung der DNA enthält (Abb.7 rechts) (62, 70). Die Nekrose geht mit einer Zellschwellung und einem Verlust der Membranintegrität einher, sodass sowohl entzündliche als auch immunologische Reaktionen ausgelöst werden (67, 70, 71). Innerhalb der Wundheilung ist die Apoptose vor allem entscheidend für die Entfernung entzündlicher Zellen

und die Verwandlung von Granulationsgewebe in eine Narbe. Der Zeitpunkt, an dem die Myofibroblasten und vaskulären Zellen in die Apoptose gehen, markiert die Umwandlung von einem Granulationsgewebe in eine Narbe (10, 73).

1.4 Der therapeutische Einsatz von Wachstumsfaktoren und Thrombozyten-reichem Plasma

Heutzutage wird im klinischen Alltag in der Oralchirurgie, Orthopädie, bei der Heilung von Muskel- oder Sehnenverletzungen bzw. bei der Behandlung von Ulzera Thrombozyten-reiches Plasma (platelet rich plasma, PRP) angewendet. Durch die Anwendung von PRPs konnten deutlich verbesserte Heilungsmöglichkeiten und Vorteile erzielt werden (33, 74).
Das PRP ist definiert als ein bestimmter Teil des Blutplasmas, dessen Thrombozytenkonzentration sich über 150.000/µL bis 350.000/µL befindet (75–79). Durch die hohe Anzahl an Thrombozyten enthält das PRP eine hohe Konzentration an Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF und TGF-β (75, 78, 80). Im Rahmen der Wundheilung kann die Zytokinausschüttung und Entzündungsreaktion durch die Anwendung von PRPs reduziert werden. Ebenso wird die Gewebsheilung, Regeneration und die Ausbildung neuer Kapillaren unterstützt und die Epithelialisierung chronischer Wunden gefördert (76). Damit spielen neben unterschiedlichen Wundauflagen wie Hydrokolloiden oder Schaumstoffen bei der Wundbehandlung auch Wundauflagen mit PRP eine zunehmend wichtigere Rolle (10, 14).

1.5 Motivation der Arbeit

Sowohl adMSC als auch Endothelzellen haben Einfluss auf die Wundheilung, indem sie regulierend auf die Inflammation wirken, zur spezifischen Zelldifferenzierung im betroffenen Gewebe beitragen bzw. die Ausbildung neuer Kapillaren und damit auch die adäquate Versorgung der Wunde mit Nährstoffen unterstützen (8, 81). Da chronische Wunden nicht nur durch eine andauernde Entzündung, sondern auch durch eine vaskuläre Minderversorgung gekennzeichnet sind, könnte die Behandlung mit T-WF neue Behandlungsansätze bieten (1, 8).
Daher bestand die Motivation dieser Arbeit darin, das Verhalten sowohl der adMSC als auch der Endothelzellen (human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC) hinsichtlich ihrer *in vitro*-Reaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen an T-WF und TGF-β1 zu analysieren und diese Effekte vergleichend darzustellen.
Wir sind der Frage nachgegangen, welchen Einfluss die T-WF und TGF-β1 auf die Morphologie der adMSC bzw. HDMEC besitzen. Auch wollten wir untersuchen, ob die Gabe von T-WF bzw. TGF-β1 toxisch auf die adMSC bzw. HDMEC wirkt und ob es quantitative Hinweise auf die Viabilität der adMSC bzw. HDMEC gibt. Weiterhin wurde untersucht, ob durch die metabolische Aktivität unsere Ergebnisse der Viabilität gestützt werden können und sie Hinweise auf eine mögliche Proliferationsaktivität geben können. Ferner mussten wir uns fragen, ob die Zugabe von T-WF alleine unterschiedliche Auswirkungen auf die Proliferation bei adMSC bzw. HDMEC zeigt oder die Gabe von TGF-β1 daran etwas verändert. Dann schließt sich an, ob man die Veränderungen der Proliferation durch die Erkenntnisse hinsichtlich des Zellzyklus bestätigen kann und ob TGF-β1 eine entscheidende Bedeutung bei diesen Veränderungen spielt. Auch musste eruiert werden, welche Rolle die Apoptose bzw. Nekrose bei diesen Vorgängen spielt. Darüber hinaus musste beantwortet werden, ob eine Kombination von T-WF und TGF-β1 sinnvoll ist und ob die beiden untersuchten Zelltypen darauf unterschiedlich reagieren. Hinsichtlich der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen wurde untersucht, ob die Zugabe von T-WF und TGF-β1 die Freisetzung beeinflusst und ob Zytokine und Chemokine gibt, die nur von einem der beiden untersuchten Zelltypen freigesetzt werden. Diese Fragen sollen als Leitfaden für unsere Ergebnisse dienen und den Leser durch die Arbeit führen.

II. Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

2.1 Laborgeräte

Anthos Plattenreader rosys 2010	Anthos Mikrosysteme, Deutschland
Bio-Plex® 200 Systems	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Brutschränke	Binder, Deutschland
Heizblock Eppendorf ThermoMixer® C	Eppendorf, Deutschland
Mikroskop Carl Zeiss Axiovert 25	Zeiss, Deutschland
Nucleocounter® NC-3000™	Chemometec, Dänemark
Platten-Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Deutschland
Rollenschüttler Roller Mixer	Ratek, Australien
Sterilbänke	Nunc, Deutschland
Stickstofftank	Cryotherm, Deutschland
Vortex- Schüttler Heidolph REAX 2000	Heidolph, Deutschland
Wasserbad	GFL, Deutschland
WiScan® Hermes	IDEA Bio-Medical Ltd, Israel
Zentrifuge 5417 R Eppendorf	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge 5810 R Eppendorf	Eppendorf, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

Cryovials Cryo.s™	Greiner Bio-One, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf, Deutschland
Falcon-Röhrchen CELLSTAR® 50 mL	Greiner Bio-One, Deutschland
Injektionsfilter 0,2 µm Sterifix® Luer Lock	Braun, Deutschland

Kanülen BD Microlance™3 20 G 1 ½ - Nr.1 0,9x 40 mm	Becton Dickinson, USA
Laborglasflaschen Duran® 500 mL, 250 mL, 100 mL	Duran, Deutschland
Auftaubehälter Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container (Mr.Frosty™)	ThermoFisher Scientific, USA
NC-Slide A2, A8	Chemometec, Dänemark
Pasteurpipetten Vacusafe	ThermoFisher Scientific, USA
Pipetten, serologisch 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	Greiner Bio-One, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µL, 1000 µL, 10 µL	Sarstedt, Deutschland
Platten 6 Well Cell Culture Plate 96 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One, Deutschland
Spritzen 10 mL BD Discardit™II	Becton Dickinson, USA
Via 1-Cassette	Chemometec, Dänemark
Zellkulturflaschen 75 cm^2	Werner Hassa GmbH, Deutschland

2.3 Reagenzien und Chemikalien

Annexin V-CF 488 A	Chemometec, Dänemark
Bovine Serum Albumin, BSA	Cell Signaling Technology®, USA
Calcein AM	BD Biosciences, USA
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay MTS	Promega, USA
Collagenase NB4 Standard Grade	Nordmark Biochemicals, Deutschland
Dynabeads® CD31 Endothelial Cell	Invitrogen™ by life technologies™, USA
Dynabeads® CD34 Positive Isolation Kit	Invitrogen™by life technologies™, USA

Ethanol 70 %, vergällt	Apomix PKH Pharmazeutisches Labor GmbH, Deutschland
Fetales Kälberserum	PAN Biotech GmbH, Deutschland
Hoechst 33342 bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	Sigma Aldrich, Deutschland
Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 29-plex	Merck Millipore, Deutschland
Humanserum	PAN Biotech GmbH, Deutschland
Isopropanol, 35 %	Walter-CMP GmbH, Deutschland
Paraformaldehyd, 4 %	Sigma-Aldrich, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	ThermoFisher Scientific, USA
Propidium Iodide, PI	BD Becton Dickinson, USA
Solution 7, 200 µg/mL JC-1	Chemometec, Dänemark
Solution 8, 1 µg/mL DAPI in PBS	Chemometec, Dänemark
Solution 12, 500 µg/mL DAPI	Chemometec, Dänemark
Solution 15, Höchst 33342 500 µg/mL	Chemometec, Dänemark
Solution 16, Propidium Iodide 500 µg/mL, NC-3000	Chemometec, Dänemark
rh TGF-β1, Recombinant Human Transforming Growth Factor-beta1	ImmunoTools GmbH, Deutschland
Trypsin (0,25 %) mit EDTA	ThermoFisher Scientific

2.4 Puffer, Lösungen, Medien

Annexin V binding buffer	Chemometec, Dänemark
Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Assay Buffer, Bioplex	BioRad, USA
Dimethylsufloxid, DMSO	Sigma-Aldrich, Deutschland

DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate	Gibco, ThermoFisher Scientific, USA
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium	PAN Biotech GmbH, Deutschland
Endothelial Cell Basal Medium MV2 Kit	PromoCell, Deutschland
Millipore- Wasser	Wasser gefiltert übers TKA-Filtersystem LabTower UP/UPW
Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Sheath Fluid, Bioplex	BioRad, USA
Solution 10, Lysis buffer	Chemometec, Dänemark
Solution 11, Stabilization buffer	Chemometec, Dänemark
Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Wash Buffer, Bioplex	BioRad, USA

2.5 Software

Athena software	WiScan® Hermes, IDEA Bio-Medical Ltd, Israel
AxioVision Rel.4.8.	Zeiss, Deutschland
Bio-Plex Manager, Version 6	BioRad, USA
GraphPad Prism 9.2.0	GraphPad Software, USA
Microsoft Excel, Version 2109	Microsoft, USA
Microsoft Word, Version 2109	Microsoft, USA
Microsoft Power Point, Version 18	Microsoft, USA
Nucleoview software	Chemometec, Dänemark

III. Methoden

3.1 Basalmedien

In der folgenden Arbeit wurde mit zwei Primärzelltypen gearbeitet, den adMSC und den Endothelzellen (human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC). Für ein optimales Zellwachstum sind für beide Zelltypen bestimmte Medien-Zusammensetzungen notwendig. Der nun im folgenden verwendete Begriff des Komplettmediums setzt sich im Einzelnen wie in Tabelle 2 gelistet zusammen. Als Basalmedium für die adMSC wurde das Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) verwendet, während das Microvascular Vessel's 2 Medium (MV2) den HDMEC als Basalmedium diente.

Tabelle 2: Komplettmedien

	Zusätze	**Volumina**	**Endkonzentration**
DMEM komplett für die adMSC	DMEM-GlutaMax-supplement, pyruvate	500 mL	
	Fetales Kälberserum (FKS) bzw. Humanserum (HS)	50 mL	10 %
	Penicillin/Streptomycin (P/S)	5 mL	1 %
MV2 Medium komplett für die Endothelzellen	Endothelial Cell Growth Medium MV2	500 mL	
	Supplement	27,20 mL	6,44 %
	Penicillin/Streptomycin (P/S)	5 mL	1 %

3.2 Zellgewinnung

Die in dieser Arbeit verwendeten adMSC stammen von sechs Patienten, die ihre Einwilligung zur Weiterverwendung ihres Fettgewebes im Rahmen einer Liposuktion gegeben haben (detaillierte Auflistung der Patientendaten befindet sich im Anhang in Tabelle 18). Das Votum der Rostocker Ethikkommission zur Verwendung des Fettgewebes ist unter folgender Registrierungsnummer A2019-0107 hinterlegt.
Die HDMEC wurden kommerziell von der Firma PromoCell® erworben.
Da im Rahmen dieser experimentellen Arbeit mit kryokonservierten Zellen gearbeitet wurde, wird im Weiteren kurz die Aufarbeitung der adMSC (3.2.1) bis zur Kryokonservierung dargestellt.

3.2.1 Mesenchymale Stammzellen des Fettgewebes

Das bei einer Liposuktion anfallende Fettgewebe wurde bis zur Aufarbeitung in der Tumeszenzlösung gelagert. Nach der enzymatischen Verdauung mit Kollagenase wurde aus dem Fettgewebe die stromale vaskuläre Fraktion (SVF) isoliert. Diese enthält eine heterogene Zellpopulation, bestehend aus den MSC, adipogenen stromalen Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (82). Im Zellkulturlabor wurden 30 mL Fettgewebe abgenommen und in ein 50 mL Falcon überführt. Anschließend wurde 10 mL Kollagenase (0,15 U/mL) in einer gepufferten Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS), die der Aufrechterhaltung des pH-Wertes, der Osmolarität und der Bereitstellung von essenziellen anorganischen Ionen dient, mit Magnesium und Kalzium gelöst, zugefügt (DPBS, (10x) with Ca^{2+} and Mg^{2+}) (83). Für 30 min wurde das Fettgewebe bei 37°C mit 100 rpm schüttelnd verdaut und über ein 100 µm Sieb filtriert. Anschließend folgte ein Waschschritt mit 10 mL PBS mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) sowie ein Sedimentationsschritt von 10 min. Der Unterstand wurde daraufhin über ein 40 µm Sieb filtriert und in ein weiteres 50 mL Falcon überführt. Beide Falcons wurden bei RT für 10 min bei 400 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach dem Vorlegen von 10 mL PBS mit 10 % FKS wurden beide Pellets resuspendiert und erneut zentrifugiert, diesmal für 5 min bei RT und 400 x g. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgesaugt, das Pellet in 12 mL DMEM mit 10 % FKS und 1 % P/S (DMEM komplett) resuspendiert und anschließend in eine 75 cm^2 Kulturflasche überführt. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2.

3.2.1.1 CD34-Trennung

Um die adMSC von den restlichen in der Zellsuspension befindlichen Zellen der SVF zu trennen, erfolgte eine CD34-Trennung. CD34, ein trans-membranäres Glykoprotein, konnte bei den adMSC nachgewiesen werden (84, 85). Die CD34-Trennung der MSC fand 20 – 24 h nach der Aufarbeitung statt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS folgte ein Überschichten der adMSC mit Komplettmedium und anschließender mikroskopischer Beurteilung der einzusetzenden Menge an magnetischen Beads (86). Hierfür wurden ca. 10 – 25 µL CD34-Beads in 7 mL PBS mit 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA) aufgenommen und gewaschen, mit dem Ziel, zwei bis drei Beads pro Zelle zu binden. Die CD34-Beads in 7 mL PBS und 0,1 % BSA wurden anschließend für eine Minute an den Magneten gestellt, der Überstand abgesaugt, direkt aus dem Magneten genommen und die CD34-Beads in entsprechender Menge Komplettmedium (ca. 5 µL CD34-Beads/mL DMEM komplett) aufgenommen. 3 - 3,5 mL der gewaschenen Beads im Komplettmedium wurden auf eine 75 cm^2 Zellkulturflasche gegeben, sofort geschwenkt, gefolgt von einem Inkubationsschritt von 5 - 10 min bei 37 °C, 5 % CO_2. Die Beurteilung der Bindung der CD34-Beads an die adMSC erfolgte mikroskopisch. Anschließend wurde zwei Mal mit PBS gewaschen, 1 mL Trypsin auf die Zellkulturflasche gegeben, durch sofortiges Schwenken auf dem Flaschenboden verteilt und für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde erneut mikroskopisch beurteilt. Die Zellen wurden mit 7 mL PBS mit 10 % FKS von der Flasche abgespült, in ein 15 mL Röhrchen überführt und für 8 min auf einem Rollenschüttler bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein 40 µm Sieb filtriert, in ein 15 mL Röhrchen überführt, für eine Minute an den Magneten gestellt und danach der Überstand abgesaugt. Die adMSC wurden mit den gebundenen Beads in 7 mL PBS mit 1 % BSA aufgenommen und erneut für 8 min bei 4 °C geschüttelt, für eine Minute an den Magneten gestellt, der Überstand abgesaugt und mit den gebundenen CD34-Beads in 12 mL Komplettmedium aufgenommen und auf eine 75 cm^2 Zellkulturflasche ausgesät. 24 h nach Aussaat erfolgte jeweils ein Medienwechsel. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen in Passage 1.

3.2.2 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Beide Zelltypen wurden nach den gleichen Arbeitsschritten kryokonserviert. Die Kryokonservierung erfolgte stets bei 80 - 90 % Konfluenz, die mikroskopisch beurteilt wurde. Folgende Arbeitsschritte beziehen sich auf das Vorgehen bei einer 75 cm^2 Zellkulturflasche.

Auf ein zweimaliges Waschen mit PBS folgte das Ablösen der Zellen mit 1 mL Trypsin für 5 min bei 37°C und 5 % CO_2, anschließend das Aufnehmen in Komplettmedium und der Zentrifugation für 5 min bei RT und 400 x g. Für eine 75 cm^2 Zellkulturflasche wurde 3 mL Komplettmedium bei drei Kryovials benötigt. Folglich wurde 1 mL der Zellsuspension in ein Kryovial überführt, je 350 µL (≙ 23 %) FKS und 150 µL (≙ 10 %) DMSO hinzugegeben und über Kopf geschwenkt. Die Kryovials wurden im Auftaubehälter unmittelbar bei - 80 °C über Nacht gelagert und anschließend in den flüssigen Stickstoff überführt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen in Passage 2. Für das Auftauen der Zellen wurden die gewünschten Kryovials aus dem Stickstofftank in den Auftaubehälter überführt. Zu Beginn wurden die Kryovials für 60 s im Wasserband geschwenkt und anschließend in 10 mL vorgewärmten Komplettmedium stufenweise aufgetaut. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei RT und 400 x g, das Absaugen des Überstandes und das Resuspendieren des entstandenen Zellpellets in 10 mL Komplettmedium. Anschließend wurde erneut für 5 min bei RT und 400 x g zentrifugiert, danach der Überstand abgesaugt, die Zellen in 12 mL Komplettmedium aufgenommen und auf eine 75 cm^2 Zellkulturflasche ausgesät. Am nachfolgenden Tag fand stets ein Medienwechsel statt.

3.3 Zellkultivierung

Bei einer Konfluenz von 80 – 90 %, dessen Beurteilung mikroskopisch erfolgte, wurden die Zellen für die Versuche ausgesät. Die Arbeitsschritte, sowohl für die adMSC als auch die HDMEC unterscheiden sich nicht im Wesentlichen, bei Unterschieden wird jedoch im Einzelnen nochmal darauf verwiesen. Die folgenden Arbeitsschritte beziehen sich auf eine 75 cm^2 Zellkulturflasche. Das Medium wurde abgesaugt und zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 mL Trypsin auf dem Zellrasen verteilt und sofort geschwenkt. Bei den adMSC wurde der gesamte Milliliter Trypsin auf dem Zellrasen belassen und die Zellen wurden für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Bei den HDMEC wurde das Trypsin sofort abgesaugt und die Zellen für 2 – 3 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Durch optische Kontrolle unter dem Mikroskop wurde das Ablösen der Zellen beurteilt. Sofern sich die Zellen regelrecht abgelöst hatten, wurde mit entsprechendem Komplettmedium der Zellrasen abgespült und in ein Falcon überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 400 x g. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 5 mL Komplettmedium resuspendiert. Eine Probe von 200 µL wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, um die Zellzahl mit dem Nucleocounter® NC-3000™ im „Viability and Cell Count Assay“ zu bestimmen. Das Falcon mit dem resuspendierten Zellpellet und die Probe für den Nucleocounter® NC-3000™ wurden bis zur

Weiterverwendung auf Eis gelagert. Beim Viability and Cell Count Assay erfolgt eine fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der Zellen mittels Acridin Orange, welches die lebenden Zellen anfärbt, und DAPI, dass die toten Zellen anfärbt (87).
Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Nucleocounter® NC-3000™ wurden die adMSC mit einer Zelldichte von 20 000 Zellen/cm^2 und die Endothelzellen mit 32 000 Zellen/cm^2 in Passage 4 (P4) ausgesät.

3.4 Stimulation mit T-WF sowie TGF-β1

Am 4. Tag nach der Aussaat (definiert als Tag 0 = Beginn der Stimulation) wurden die Zellen mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen an T-WF und TGF-β1 stimuliert, auf die im Folgenden eingegangen wird.
Zu Beginn einer jeden Stimulation wurden die Zellen mit dem entsprechenden Basalmedium ohne Zusätze, d.h. für die adMSC mit DMEM und für die Endothelzellen MV2 Medium, zwei Mal gespült. Für die Stimulation selbst wurden zunächst alle Überstände entfernt und die Zellkulturen mit den entsprechenden Stimulationskombinationen aus T-WF ohne TGF-β1 bzw. mit TGF-β1 Zugabe (Tabelle 3) versetzt. Wichtig zu erwähnen ist hierbei, dass das bis zur Stimulation verwendete FKS durch 10% Humanserum (HS) ersetzt wurde.

Tabelle 3: Stimulationskombinationen T-WF ohne bzw. mit TGF-β1-Zugabe. Das entsprechende Basalmedium (DMEM bzw. MV Endothelial Cell Medium) enthält stets 10% HS und 1% P/S.

	T-WF				
	US	**0,05**	**0,1**	**1**	**5**
TGF-β1 [ng/mL]	-	-	-	-	-
	1,5 und 10	1,5 und 10	1,5 und 10	1,5 und 10	1,5 und 10

Bei den T-WF handelt es sich um ein γ-bestrahltes Lyophilisat (DOT GmbH medical implant solution, Rostock, Deutschland). Das Aufarbeitungsprotokoll der Lyophilisate wurde 2017 von Kieb et al. veröffentlicht (88) und wird nachfolgend kurz dargestellt.
Von 12 unterschiedlichen Patienten wurden durch Apherese Thrombozytenkonzentrate gewonnen. Jedes gewonnene Thromboyztenkonzentrat enthielt minimal 2 x 10^{11} Thrombozyten und weniger als 1 x 10^6 Leukozyten. Es folgten Waschschritte, bis der Anteil an Plasmaprotein bei ca. 30 mg/mL lag. Alle 12 Thrombozytenkonzentrate wurden gepoolt, in 1 mL Portionen abgefüllt und gefriergetrocknet. Um Pathogene abzutöten, erfolgte eine γ-Bestrahlung mit 30 Gy. Als Ergebnis wurden 1000 identische Proben produziert, von denen jede 30 mg an

PRP- Pulver enthielt. In den PRP Präparationen wurden unter anderem folgende Wachstumsfaktoren mit unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen: anteilsmäßig am meisten TGF-β1 und PDGF, gefolgt von VEGF und FGF (88). Für unsere Untersuchungen wurde das Lyophilisat in 1 mL des entsprechenden Mediums gelöst und mittels des Vortex- Schüttlers resuspendiert, im Anschluss über einen 0,2 µm Membranfilter in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß filtriert und entsprechend der Tabelle 3 mit allen Stimulationskombinationen angesetzt.
Alle Analysen erfolgten 48 h nach Stimulationsbeginn. Vor jeder Analyse wurden zunächst die Überstände abgenommen, 5 min bei 400 x g zentrifugiert und bei - 20 °C bis zur Analyse der Zytokine und Chemokine gelagert.

3.5 Quantifizierung der Zellkernanzahl mittels Hoechst-Färbung

Für die Quantifizierung der Anzahl der Zellkerne wurde die Hoechst-Färbung verwendet. Dabei handelt es sich um das Agens bisBenzimide H 33342 trihydrochloride, das an die Adenin-Thymidin-reiche Region doppelsträngige DNA (dsDNA) und damit an Zellkerne bindet (89). Alle Versuchsschritte erfolgten im Dunkeln und nach Messung der MTS Konversion *(3.6).* Die Hoechst-Färbelösung wurde zunächst in einem Verhältnis von 1:2000 mit dem entsprechendem Basalmedium verdünnt. Es folgte ein zweimaliger Waschschritt mit PBS und eine Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 min bei 37 °C und 5 % CO_2. Im Anschluss wurde 100 µL der verdünnten Hoechst-Färbelösung auf die Zellen gegeben, gefolgt von einer Inkubation von 6 min bei 37 °C und 5 % CO_2. Nach der Inkubationszeit wurde die Färbelösung abgenommen und die Zellen mit 100 µL PBS überschichtet. Die fluoreszenzmikroskopische Messung sowie Quantifizierung der Zellkerne fand am WiScan® Hermes mit dem Protokoll „Cell Count“ statt.

3.6 Quantifizierung der metabolischen Aktivität mittels MTS-Test

Der MTS-Test erlaubt den Rückschluss auf die metabolische Aktivität eines bestimmten Zelltyps durch die Konversion eines farblosen Tetrazoliumsalzes in ein farbiges Formazansalz. Die Quantifizierung der Konversionsrate erfolgte bei 490 nm in einem Absorptionsreader (90). Die MTS-Lösung wurde in einem Verhältnis von 1:6 mit dem entsprechenden Basalmedium verdünnt. Bei den folgenden Beschreibungen wird von einer 96-well-Platte ausgegangen. Alle Schritte erfolgten im Dunkeln. Pro Well wurden 95 µL des Mediums abgenommen und der Überstand wie in 3.2.2 beschrieben bis zur Analyse bei - 20 °C gelagert. Dann wurden 120 µL der verdünnten MTS-Lösung auf die Zellen gegeben, wobei ein Blank als Triplett mitgeführt wurde. Die Zellkulturplatte wurde für 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Nach

Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 µL des Überstandes in eine ELISA-Reader-Platte überführt und bei 490 nm im Anthos Plattenreader gemessen.

3.7 Visualisierung und Quantifzierung des Lebend-Tot-Anteils

Zur Visualisierung des Phänotyps der Zelltypen sowie deren Quantifizierung wurde die Vitalfärbung durchgeführt. Die Färbelösung setzt sich dabei aus dem Basalmedium, Hoechst 33342, Calcein AM (91) und Propidiumiodid (92) zusammen. Hoechst 33342 (Verdünnung; 1:2000) färbt die Zellkerne, Calcein AM (Verdünnung; 1:3000) färbt lebende Zellen und Propidiumiodid (Verdünnung; 1:50) färbt tote Zellen an. Jeder Arbeitsschritt erfolgte im Dunkeln. Die Färbelösung wurde mit 100 µL pro Well auf die Zellen gegeben. Je nach Zelltyp wurden die Zellen für 15 min (adMSC) oder 6 min (HDMEC) bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die Färbelösung wurde im Anschluss abgenommen und für die Analyse das entsprechende Basalmedium hinzugefügt.
Die Visualisierung und Quantifizierung der Zellen erfolgte mit dem WiScan® Hermes und dem Protokoll „Intranuclear Foci“.

3.8 Zellzyklusanalysen mittels Two-Step-Cell-Cycle Assay

Zur Analyse des Zellzyklusses nach Stimulation wurde der Nucleocounter® NC-3000™ verwendet. Mittels des Two-Step-Cell Cycle Analysis Assays sind Rückschlüsse auf die Zellzyklusphasen der verwendeten Zellen möglich. Dieser Assay erlaubt eine Unterscheidung sowohl der G_0/G_1-, S- als auch G_2- Phase. Ferner wird bei diesem Assay eine sub-G_1-Phase dargestellt, die die apoptotischen Zellen repräsentiert (93). Zur Vorbereitung der Analysen wurden beide Zelltypen auf einer 6-Well-Platte ausgesät, für 48 h kultiviert und stimuliert. Dabei wurden die adMSC mit einer Zelldichte von 20 000 Zellen/cm^2 und die HDMEC mit 32 000 Zellen/cm^2 ausgesät. Hierbei wurden die Stimulationskombinationen auf lediglich 1 und 10 ng/mL (Tabelle 4) reduziert.

Tabelle 4: Stimulationskombinationen T-WF ohne bzw. mit TGF-β1 Zugabe. Das entsprechende Basalmedium (DMEM bzw. MV Endothelial Cell Medium) enthielt stets 10 % HS und 1 % P/S.

	T-WF		
	US	**0,1**	**5**
TGF-β1 [ng/mL]	-	-	-
	1 und 10	1 und 10	1 und 10

Zunächst wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und danach mit Trypsin von der Zellkulturplatte abgelöst. Die Inkubationszeit betrug bei den adMSC 5 min und bei den HDMEC 3 min bei 37 °C, 5 % CO_2. Das Ablösen der Zellen wurde erneut mikroskopisch beurteilt. Anschließend wurden die Zellen in dem entsprechenden Komplettmedium mit Humanserum aufgenommen, in ein Falcon überführt und bei 400 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde mit 1 mL PBS resuspendiert und bis zu den nachfolgenden Arbeitsschritten auf Eis gelagert. Anschließend wurde mit dem Nucleocounter® NC-3000™im „Viability and Cell Count Assay“ die Zellzahl der einzelnen Zellkulturen bestimmt. Von der vorbereiteten Zellsuspension wurden 250 µL in ein separates Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Im Vorfeld wurde ein weiteres Falcon mit einer Kombination aus Solution 10 (Lyse Puffer) und Solution 12 (Stock: 500 µg/mL DAPI) mit einer Endkonzentration von 10 µg DAPI/mL vorbereitet. Alle Arbeitsschritte fanden im Dunkeln statt. Nach der Zentrifugation wurde das PBS verworfen und die Zellpellets mit der vorbereiteten DAPI-Lösung überschichtet und in einem Heizblock für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde gut resuspendiert und zu jedem Eppendorf-Reaktionsgefäß 250 µL von Solution 11 (Stabilisierungspuffer) hinzugegeben. Die Messung erfolgte am Nucleocounter® NC-3000™ mittels des NC-Slides A8 und dem Protokoll „Two-step-cell-cycle Assay“.

3.9 Analyse des Zelltodes mittels Mitochondrial Potential Assay bzw. Annexin-v-Assay

3.9.1 Mitochondrial Potential Assay

Mittels des Mitochondrial Potential Assays lässt sich differenzieren, ob die zu untersuchenden Zellen viabel oder apoptotisch sind. Dieser Assay macht sich die Tatsache zu Nutze, dass ein Verlust des mitochondrialen, transmembranösen Potentials mit einer Apoptose und Nekrose

einhergeht. Der verwendete Metabolit 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodid (JC-1) befindet sich bei gesunden Zellen in der intakten mitochondrialen Membran und fluoresziert rot. Kommt es zu einer Apoptose, geht das transmembranöse, mitochondriale Potential zugrunde und das JC-1 tritt durch die geschädigte mitochondriale Membran ins Zytosol und fluoresziert grün. Eine Differenzierung zwischen einer Apoptose oder einer Nekrose ist bei diesem Assay nicht möglich (94). Zur Vorbereitung der Analysen wurde zunächst wie in *3.8* bis zum Ablösen der Zellen und der Lagerung auf Eis vorgegangen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte ebenfalls entsprechend mit dem Viability and Cell Count Assay. Für diesen Assay wurde die Zellzahlen aller Zellkulturen auf die niedrigste Zellzahl normiert, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Dementsprechend wurde die jeweilige Menge von der benötigten Zellsuspension in ein separates Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und auf ein Volumen von 250 µL mit PBS aufgefüllt. Im ersten Arbeitsschritt wurden bei diesem Assay 3,2 µL Solution 7 (200 µg/mL JC-1) zu jedem Zellkulturansatz hinzugefügt und für 10 min bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden für 5 min bei RT und 400 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Danach wurde mit jeweils 1 mL PBS resuspendiert, erneut für 5 min bei RT und 400 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Es folgte ein erneuter Waschschritt wie zuvor beschrieben. Anschließend wurde das Zellpellet mit 62,5 µL von Solution 8 (1 µg/ mL DAPI in PBS) resuspendiert und mit dem Nucleocounter® NC-3000™, dem dazugehörigen NC-Slide A2 und dem Protokoll „Mitochondrial Potential“ gemessen.

3.9.2 Annexin-V-Assay

Mittels des Annexin V Assays lässt sich eine frühe Apoptose, die durch die Umlagerung von Phosphatdiylserin gekennzeichnet ist, nachweisen (70, 91). Das in diesem Assay verwendete Annexin V bindet Phosphatidylserin und kann, an einen Fluoreszenz-Marker gekoppelt, detektiert werden. Annexin V bindet, neben Zellen der frühen Apoptose, auch an Zellen der späten Apoptose sowie an nekrotische Zellen. Durch die Verwendung von Propidiumiodid kann hier jedoch eine Differenzierung stattfinden. Bei Zellen der frühen Apoptose ist die Plasmamembran noch intakt, so dass Propidiumiodid diese Zellen anfärben kann, da es in der Zelle selbst verbleibt. Gleichzeitig wird in diesem Assay Hoechst 33342 verwendet, was die gesamte Zellpopulation anfärbt und damit überhaupt messbar macht (95). Alle durchgeführten Arbeitsschritte erfolgten im Dunkeln. Zur Vorbereitung der Analysen wurde zunächst wie in 3.2.2 bis zum Ablösen der Zellen und der Lagerung auf Eis vorgegangen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte ebenfalls mit dem „Viability and Cell Count Assay“ des Nucleocounter® NC-3000™. Die letzten verbliebenen 250 µL der vorbereiteten Zellsuspension wurden in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand

wurde im Anschluss verworfen und in 300 µL PBS resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 400 x g, das anschließende Absaugen des Überstandes und das Resuspendieren des Zellpellets in 100 µL Annexin V binding buffer, der zuvor als einfache Arbeitslösung angesetzt wurde. Anschließend wurden 2 µL Annexin V-CF488A conjugate und 2 µL Solution 15 (Hoechst 33342, 500 µg/mL) hinzugegeben, erneut resuspendiert und bei 37 °C für 15 min im Heizblock inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte für 5 min bei 400 x g ein erneuter Zentrifugationsschritt, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µL Annexin V binding buffer resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zwei Mal durchgeführt. Nach der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 100 µL der vorher angesetzten Lösung aus Annexin V binding buffer und Propidiumiodid (Stock: 500 µg/mL, mit einer Endkonzentration von 10 µg/mL PI) resuspendiert. Die Messung erfolgte ebenfalls mit dem Nucleocounter® NC-3000™, einem NC-Slide A2 und dem Protokoll „Annexin V Assay“.

3.10 Quantifizierung der Zytokine und Chemokine

Für die Analysen der Zytokine und Chemokine im Überstand wurde ein Multiplex Assay verwendet. Beim Multiplex Assay werden multiple Analyten zeitgleich automatisiert quantifiziert. Das Funktionsprinzip des Assays ist ein Enzym-gekoppelter Immuno-Assay (enzyme-linked immunosorbant assay, ELISA), im speziellen ein Sandwich-ELISA, dessen Basis eine Antigen-Antikörper-Reaktion ist. Ein Antigen wird an eine feste Oberfläche gebunden, die umliegende Oberfläche wird durch unwichtige Proteine blockiert (Abb.8) (96). Zwischen jedem Schritt wird gespült. Dann wird die Probe hinzugegeben, die Antikörper enthält, die an das Antigen auf der Oberfläche binden (Detektions-Antikörper). Um diese Bindung nun sichtbar machen zu können, wird im folgenden Waschschritt ein chromogenes Substrat zugegeben, das von dem Enzym des Detektions-Antikörpers in einen Farbstoff umgewandelt wird. Diese Farbreaktion lässt sich dann mittels eines Photometers messen.

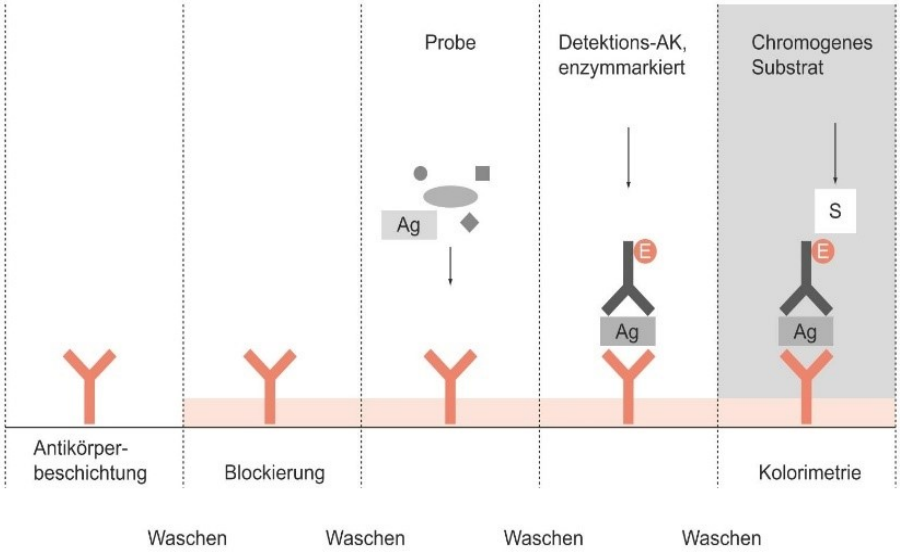

Abb. 8: Prinzip eines Sandwich-ELISA zum Antigennachweis nach Bröker/Schütt (96)

In den vorliegenden Versuchen wurde das Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, ein 29 Plex, verwendet und die Proben als Dupletts untersucht. Die, in 3.2.2 beschriebenen, bei - 20 °C gelagerten Überstände wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Alle weiteren Reagenzien wurden wie folgt bei RT vorbereitet. Control 1 und 2 wurden in 250 µL diH_2O gelöst, mehrfach über Kopf geschwenkt, mittels eines Vortex-Schüttlers resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden sie in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Standard wurde in 250 µL diH_2O (Endkonzentration 10 000 pg/mL) gelöst, ebenfalls mehrfach über Kopf geschwenkt, für 10 s mit einem Vortex-Schüttler resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Der gelöste Standard wurde anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe mit dem Assay Buffer, wobei 7 Konzentrationen (10 000 pg/mL, 2 000 pg/mL, 400 pg/mL, 80 pg/mL, 16 pg/mL, 3,2 pg/mL, 0 pg/mL) für die Standardkurve verwendet wurden. Alle Reagenzien wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Aus dem 5 x Waschpuffer wurde mit diH_2O eine 1 x verdünnte Lösung angesetzt. Zu Beginn der Analyse wurde zunächst zu jedem Well 200 µL Waschpuffer hinzugefügt und die Zellkulturplatte auf dem Platten-Schüttler für 10 min bei RT geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurde der Waschpuffer entfernt und die 96-Well Platte auf Tüchern ausgeschlagen. Nun wurden 25 µL MV2 Komplettmedium zu den Standards, Control 1 und 2 entsprechend der Plattenbelegung gegeben, gefolgt von jeweils 25 µL der Standardverdünnungsreihe sowie je 25 µL Control 1 und 2. Zu den Probenwells wurde jeweils 25 µL Assay Buffer hinzugegeben, gefolgt von je 25 µL/Well der entsprechenden Proben.
Die premixed Beads wurden zunächst für eine Minute mit dem Vortex-Schüttler resuspendiert und anschließend 25 µL/ Well auf die gesamte Zellkulturplatte verteilt. Abschließend wurde

die Zellkulturplatte lichtdicht verschlossen und über Nacht bei 4 °C schüttelnd gelagert. Am nächsten Tag wurde die Platte für eine Minute auf den Magneten gestellt, dann der Überstand ausgeschlagen, die Platte vom Magneten genommen und mit 200 µL Waschpuffer pro Well gewaschen. Nach 30 s Inkubationszeit des Waschpuffers wurde die Platte erneut für eine Minute auf den Magneten gestellt, der Überstand ausgeschlagen und der Waschschritt wiederholt. Im Anschluss wurde 25 µL der Detektionsantikörper/Well hinzugegeben und für eine Stunde bei RT auf dem Plattenschüttler inkubiert. Es folgte die Zugabe von 25 µL Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) pro Well mit einer Inkubationszeit von 30 min, schüttelnd bei RT. Darauf folgten zwei Waschschritte mit dem Waschpuffer wie bereits oben beschrieben. Als letzter Schritt wurde 150 µL Sheath Fluid hinzugefügt, für 5 min bei RT schüttelnd inkubiert und die Zellkulturplatte im Bio-Plex mit dem Bioplex Manager Version 6 gemessen.

3.11 Statistik

Alle Analysen wurden mit mindestens drei unabhängigen Zellkulturen mit je drei technischen Replikaten realisiert und mit ihren Kontrollen verglichen. Die Darstellung der Diagramme und die statistische Analyse wurden mit GraphPad Prism Version 8.00 Windows (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Die Daten sind als Boxplots dargestellt, wobei Boxplots ohne Whisker die Minimal- und Maximalwerte anzeigen und die horizontalen Linien innerhalb der Boxen die Mediane darstellen. Boxplots mit Whiskern repräsentieren die Interquartilsbereiche, die horizontalen Linien innerhalb der Boxen die Mediane und die Whisker die Minimal- und Maximalwerte. Da die erhaltenen Datensätze sowohl normalverteilt als auch nicht normalverteilt waren (Shapiro-Wilk-Test), wurde die statistische Signifikanz innerhalb der Daten mit der Zwei-Wege-Varianzanalyse (ANOVA) berechnet, gefolgt von einem Dunnett-Post-Hoc-Test für Mehrfachvergleiche. Der p-Wert wurde auf ≤ 0,05, ≤ 0,01 oder ≤ 0,001 gesetzt.

IV. Ergebnisse

4.1 Einfluss der Wachstumsfaktorexposition auf die Morphologie der Zellen

4.1.1 Morphologie der adMSC

Die Untersuchung der adMSC mittels Phasenkontrastmikroskopie zeigte im unbehandelten Zustand (Kontrolle) eine schlanke, spindelförmige Morphologie mit gut definierbaren Zellgrenzen. Teilweise organisierten sich die Zellen in dreidimensionalen Clustern, in denen sich die Zellen kreisförmig orientierten (Abb. 9 A, B). Die Zugabe von 1 ng/mL bzw. 10 ng/mL führte nicht zu Veränderungen der Zellmorphologie (Abb. 9 C, D, E, F). Bei keiner Stimulationskombination waren abgekugelte, apoptotische Zellen erkennbar. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass weder die Zugabe von T-WF noch die Zugabe von TGF-β1 zu Morphologieveränderungen der adMSC führten.

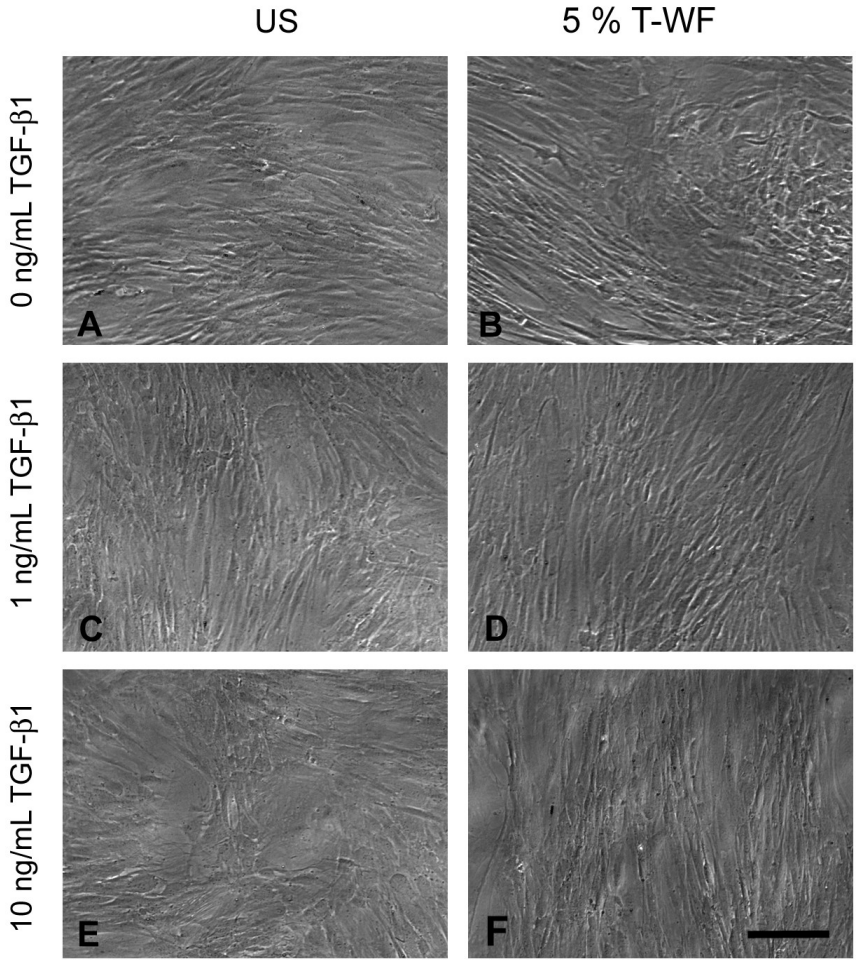

Abb. 9: Phasenkontrastmikroskopie von adMSC nach 48- stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der T-WF bzw. von TGF-β1 (n = 3, Maßstabsbalken: 100 µm)

4.1.2 Morphologie der HDMEC

Die Untersuchung der HDMEC mittels Phasenkontrastmikroskopie zeigte im unbehandelten Zustand (Kontrolle) einen dichten Zellrasen an polygonalen Zellen mit einem zentralen Nukleus (Abb. 10 A). Die Zellgrenzen waren nicht eindeutig erkennbar, jedoch stellten sich die HDMEC als homogene Population dar. Diese Morphologie veränderte sich weder durch Zugabe von 5 % an T-WF (Abb. 10 B) noch durch Zugabe von 1 ng/mL bzw. 10 ng/mL TGF-β1 (Abb. 10 C, D, E, F). Keinerlei apoptotische Zellen konnten dargestellt werden. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass hinsichtlich der Morphologie sowohl die Zugabe an T-WF als auch die Zugabe von TGF-β1 keinen mikroskopisch sichtbaren Effekt erzielte.

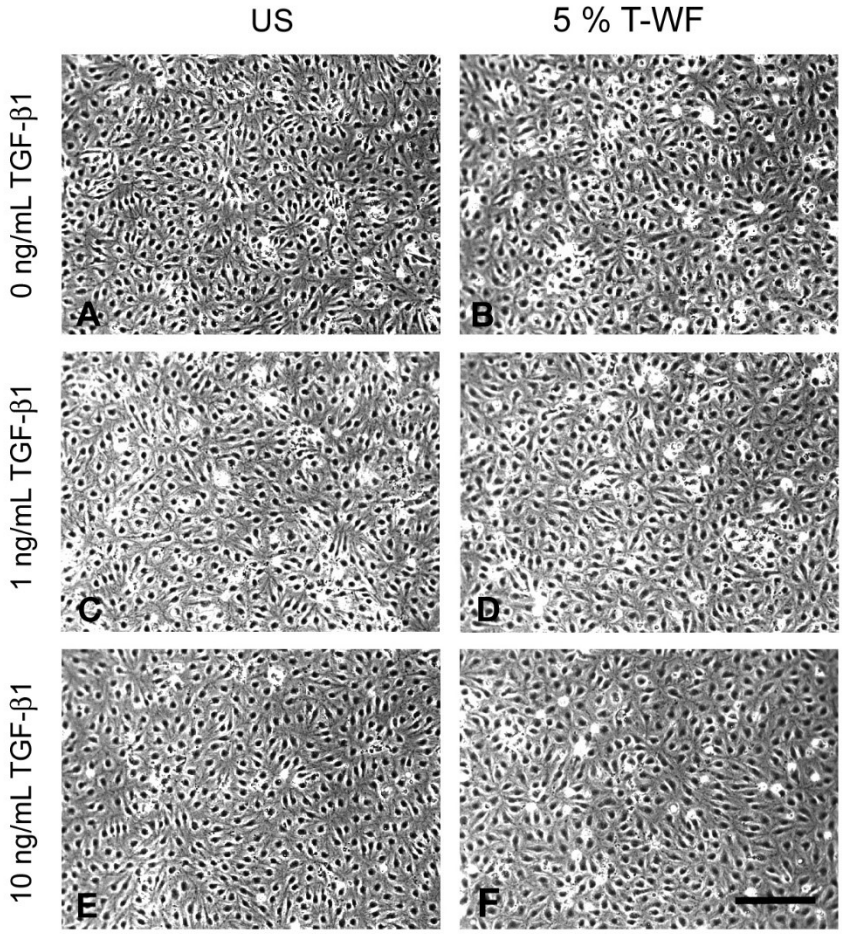

Abb. 10: Phasenkontrastmikroskopie von HDMEC nach 48- stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der T-WF bzw. von TGF-β1 (n = 3, Maßstabsbalken: 100 µm)

4.2 Morphologie der adMSC Mittels Lebend/Tot-Färbung nach Wachstumsfaktorexposition

4.2.1 Lebend/Tot-Färbung der adMSC

Die Morphologie und Viabilität der Zellen wurde durch eine Lebend/Tot-Färbung dargestellt. Die adMSC zeigten sich ohne Zugabe an T-WF und TGF-β1 lang, schlank und spindelförmig mit definierten Zellgrenzen (Abb. 11 A). 48 Stunden nach Start des Versuches war der Zellrasen noch subkonfluent. Durch die Zugabe von 5 % T-WF erreichte der Zellrasen Konfluenz, jedoch blieb die Zellmorphologie unverändert (Abb. 11 B). Tote Zellen konnten zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden.

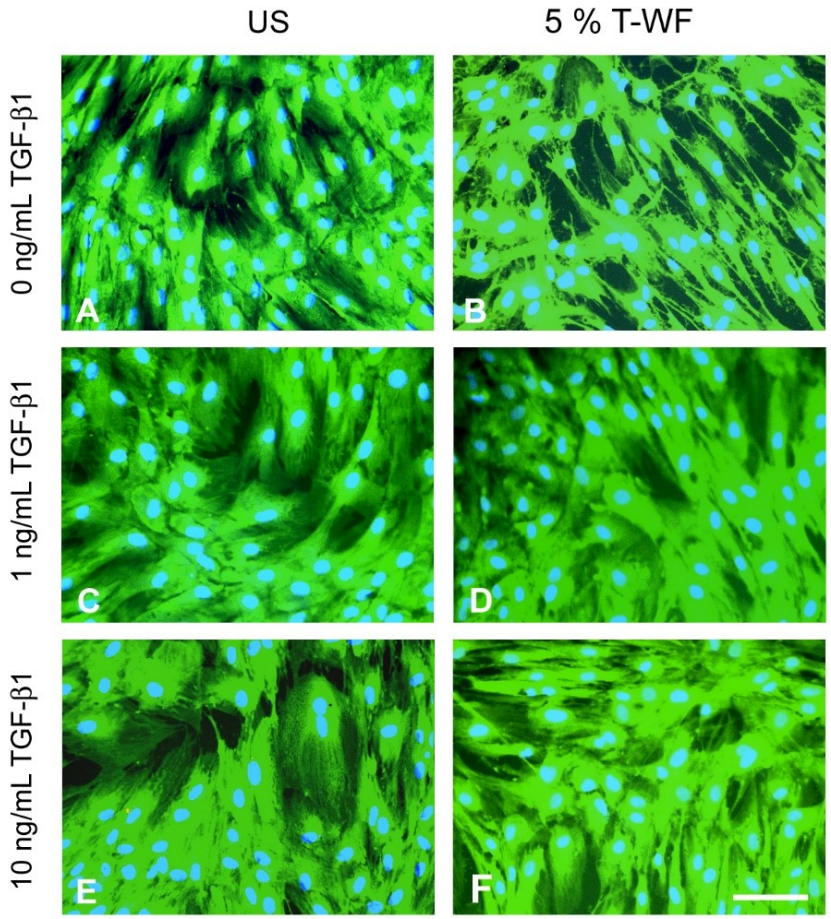

Abb. 11: Lebend/Tot-Färbung der adMSC nach 48 -stündiger Behandlung im unstimulierten Zustand (US) bzw. mit 5 % T-WF und zwei unterschiedlichen Konzentrationen von TGF-β1 (n = 3; Fluoreszenzmikroskopie, grün: lebende Zellen, blau: Zellkerne, rot: tote Zellen; Maßstabsbalken: 50 µm)

Die Zugabe von 1 ng/mL bzw. 10 ng/mL TGF-β1 (Abb. 11 C, D, E, F) führte nicht zu Veränderungen der Zellmorphologie der adMSC. Unterschiede zeigten sich jedoch dadurch, dass die

adMSC durch Zugabe von TGF-β1 ein vermehrt dreidimensionales Wachstum aufwiesen. Dieses mehrschichtige Wachstum ließ sich im phasenkontrastmikroskopischen Bild nicht erkennen. Generell scheint die Zugabe von T-WF einen geringen Einfluss auf die Morphologie der adMSC zu haben.

4.2.2 Lebend/Tot-Färbung der HDMEC

Die Morphologie und Viabilität der Zellen wurde auch bei den HDMEC durch eine Lebend/Tot-Färbung dargestellt. Die HDMEC zeigten sich im unstimulierten Zustand als dichter Zellrasen mit polygonalen Zellen und definierten Nuklei (Abb.12 A). Die Zellen wuchsen als dichter Monolayer und wiesen teilweise Nester von Zellen auf, die sich zirkulär anordneten. Auch in den phasenkontrastmikroskopischen Darstellungen wird dies bei genauerem Hinsehen deutlich, jedoch nicht so prominent wie in der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung.

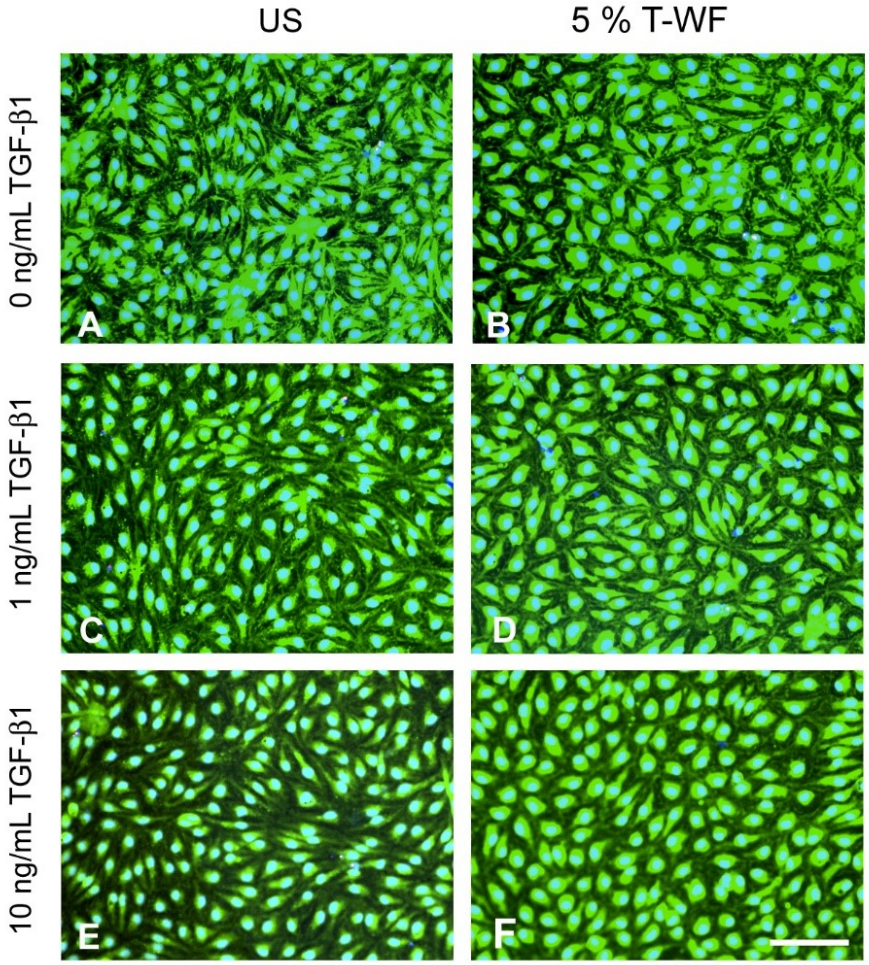

Abb. 12: Lebend/Tot-Färbung der HDMEC nach 48 -stündiger Behandlung im unstimulierten Zustand (US) bzw. mit 5 % T-WF und zwei unterschiedlichen Konzentrationen von TGF-β1 (n = 3; Fluoreszenzmikroskopie, grün: lebende Zellen, blau: Zellkerne, rot: tote Zellen; Maßstabsbalken: 50 µm)

Mit Zugabe von 5 % an T-WF (Abb. 12 B) und Zugabe von 1 ng/mL bzw. 10 ng/mL TGF-β1 (Abb. 12 C, D, E, F) zeigte sich in der Morphologie der HDMEC keine Veränderung. Auch die Konfluenz des Zellrasens erschien unverändert. Eine substanzielle Menge toter Zellen konnte bei keiner Stimulationskombination ausgemacht werden. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Morphologie der HDMEC weder durch Zugabe von T-WF noch durch Zugabe von TGF-β1 verändert wurde.

4.3 Testung der Viabilität mittels Lebend/Tot-Färbung

Die Quantifizierung des Lebend- bzw. Tot-Anteils wurde anhand der Bilder der Vitalfärbung Software-gestützt durchgeführt. Dazu wurden die Bilder der Vitalfärbung analysiert, indem einzelne Zellbestandteile mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert und diese durch die Software gezählt wurden. Anschließend wurde der Quotient aus den lebenden und toten Zellen berechnet und im Folgenden betrachtet (Abb. 13).

.

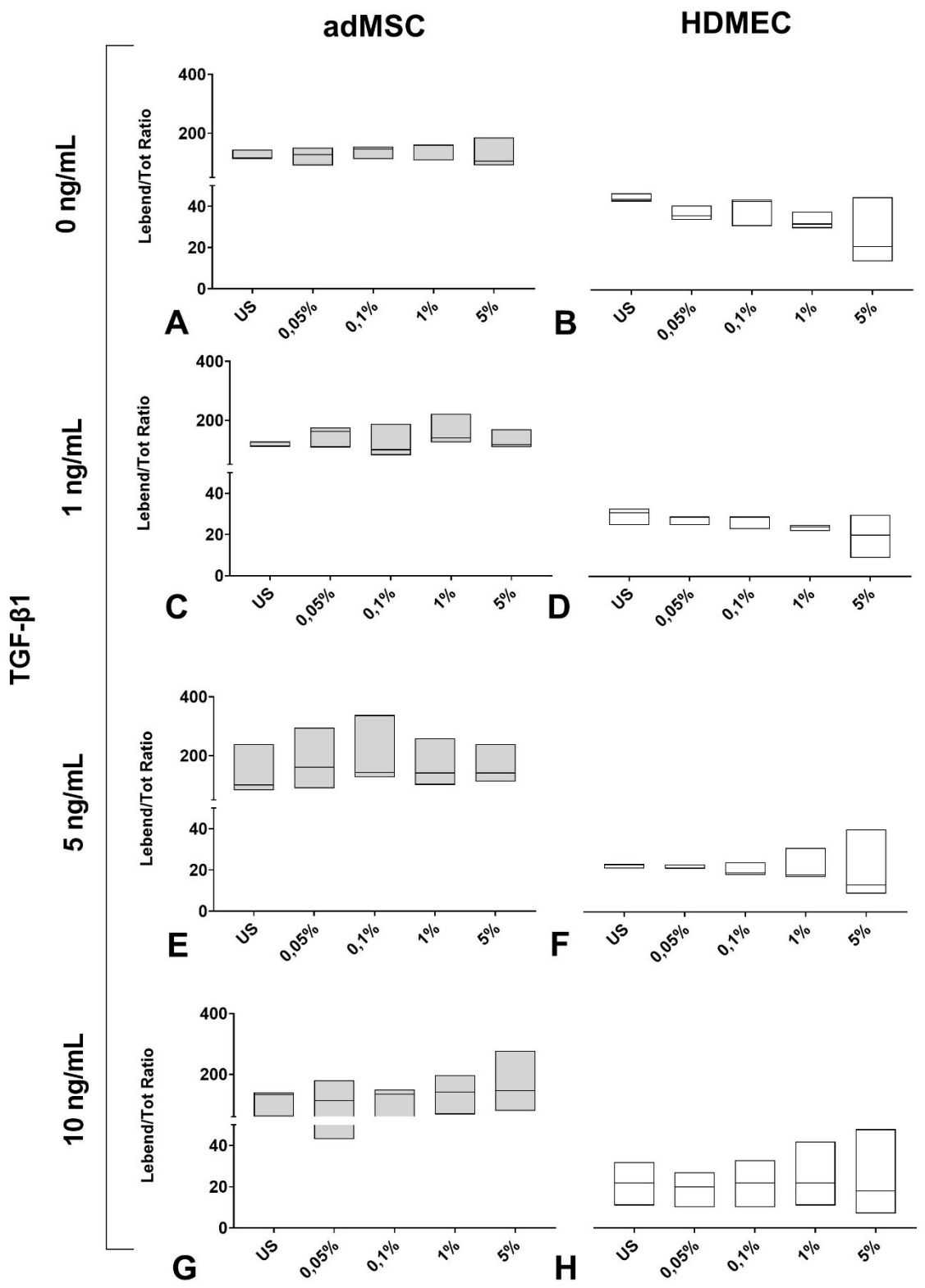

Abb. 13: Darstellung des Lebend/Tot- Anteils nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der T-WF bzw. von TGF-β1 (adMSC: graue Boxplots, HDMEC: weiße Boxplots; mit Median, Interquartil-, Minimum und Maximumwerten) (n = 3; Two-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison), $p < 0,05$ ermittelt)

Bei den adMSC kam es bei Zugabe von 5 ng/mL (Abb. 13 E) und 10 ng/mL TGF-β1 (Abb.13 G) zu einem dezenten konzentrationsabhängigen Anstieg der Lebend/Tot-Ratio, der mit einer erhöhten Varianz, im Vergleich zu 0 und 1 ng/mL TGF-β1, einherging (Abb. 13 A, C). Eine konzentrationsabhängige Reduktion der Lebend/Tot-Ratio konnte als Tendenz bei den HDMEC ausgemacht werden (Abb. 13 B, D, F). Mit Zugabe von 10 ng/mL TGF-β1 schien dieser Trend dezent abgeschwächt und die Varianz der Werte erhöhte sich. Auffallend war zudem der Wert bei 5 % an T-WF, der mit Zugabe von TGF-β1 weiter abfiel. Zur Verdeutlichung dieses komplexen Sachverhaltes wurde der Median der HDMEC bei 5 % T-WF in einer Tabelle (Tabelle 5) zusammengefasst

Tabelle 5: Mediane der Lebend/Tot-Ratio bei den HDMEC mit Zugabe von 5 % an T-WF in Abhängigkeit von der unterschiedlichen TGF-β1- Konzentration (n = 3, Deskriptive Statistik)

TGF-β1 [ng/mL]	Median HDMEC mit 5 % T-WF
0 ng/mL	21
1 ng/mL	20
5 ng/mL	13
10 ng/mL	18

Zusammenfassend lässt sich bei den adMSC mit steigender Konzentration an TGF-β1 ein dezenter konzentrationsabhängiger Anstieg der Lebend/Tot-Ratio erkennen. Bei den HDMEC stellte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Lebend/Tot-Ratio dar, die von der Zugabe an TGF-β1 minimal beeinflusst wurde. Es kam jedoch weder bei den adMSC noch bei den HDMEC zu signifikanten Veränderungen.

4.4 Nachweis der Metabolischen Aktivität nach Wachstumsfaktorexposition

Die metabolische Aktivität der Zellen wurde mittels des MTS- Konversionsassays untersucht. In der Analyse konnten bei der metabolischen Aktivität der adMSC nach Wachstumsfaktorexposition signifikante Veränderungen beobachtet werden.

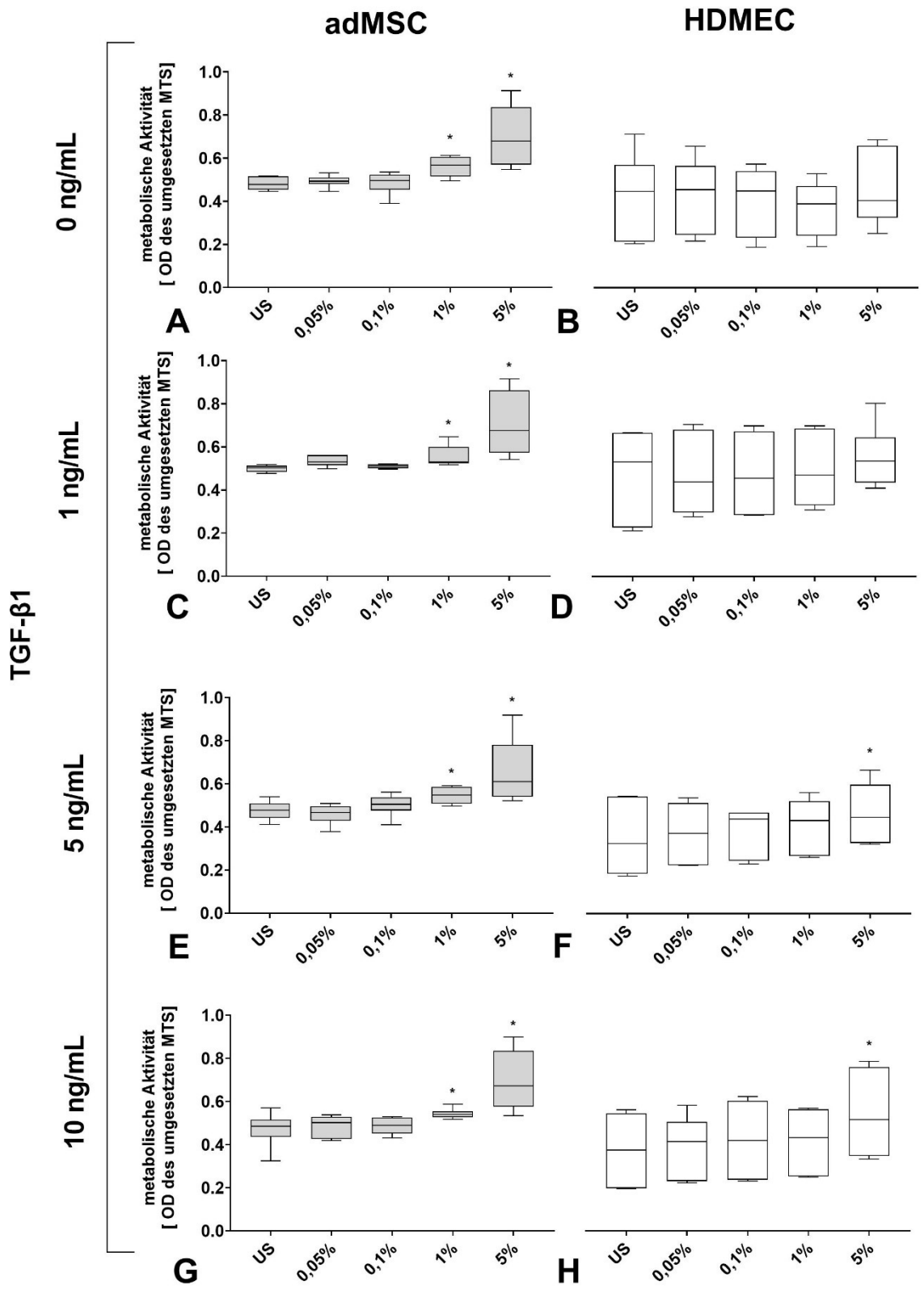

Abb. 14: Nachweis der metabolischen Aktivität nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der T-WF bzw. von TGF-β1 (adMSC: graue Boxplots, HDMEC: weiße Boxplots; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten) (n = 3; Two-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison), $p < 0,05$; OD: Optische Dichte)

Es stellte sich ein konzentrationsabhängiger, signifikanter Anstieg der metabolischen Aktivität bei Zugabe von 1 % und 5 % T-WF dar (Abb.14 A, C, E, G). Dieser zeigte sich unabhängig von der Konzentration an zugegebenem TGF-β1. Auffallend war ferner die geringe Varianz der Werte. Zur Verdeutlichung des Sachverhalts sind die Signifikanzen und Werte der metabolischen Aktivität in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Metabolische Aktivität der adMSC bei unterschiedlichen Konzentrationen sowohl an T-WF als auch TGF-β1 (OD der Mediane und dazugehörige Signifikanzniveaus) (n = 3, Two-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison), $p < 0,05$)

TGF-β1 [ng/mL]	Metabolische Aktivität	
	1 % T-WF	5 % T-WF
0 ng/mL	0,57 (p = 0,0007)	0,68 (p = 0,0001)
1 ng/mL	0,53 (p = 0,0207)	0,68 (p = 0,0207)
5 ng/mL	0,55 (p = 0,0030)	0,61 (p = 0,0030)
10 ng/mL	0,54 (p = 0,0029)	0,68 (p = 0,0001)

Auch bei den HDMEC zeigten sich signifikante Veränderungen. Ohne TGF-β1 blieb die metabolische Aktivität unverändert (Abb. 14 B). Ab Zugabe von 1 ng/mL TGF-β1 stellte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der metabolischen Aktivität dar (OD: 0,41 ohne TGF-β1 vs. 0,43 bei 1 ng/mL TGF-β1) (Abb. 14 D), der mit der Zugabe von 5 ng/mL (OD: 0,45, $p = 0,0009$) bzw. 10 ng/mL TGF-β1 (OD: 0,57, $p < 0,0001$) (Abb. 14 F, H) signifikant anstieg. Insgesamt wurde eine größere Varianz der Werte im Vergleich zu den Ergebnissen der adMSC beobachtet.

4.4.1 Normierung der Metabolischen Aktivität auf die Zellzahl

Um sowohl die adMSC als auch die HDMEC vergleichen zu können und gleichzeitig die Zellzahl zu berücksichtigen, haben wir die metabolische Aktivität auf die Zellzahl normiert. Es wurde der Quotient aus der metabolischen Aktivität und der Zellzahl gebildet. Die Analyse zeigte sowohl bei den adMSC als auch bei den HDMEC signifikante Veränderungen.

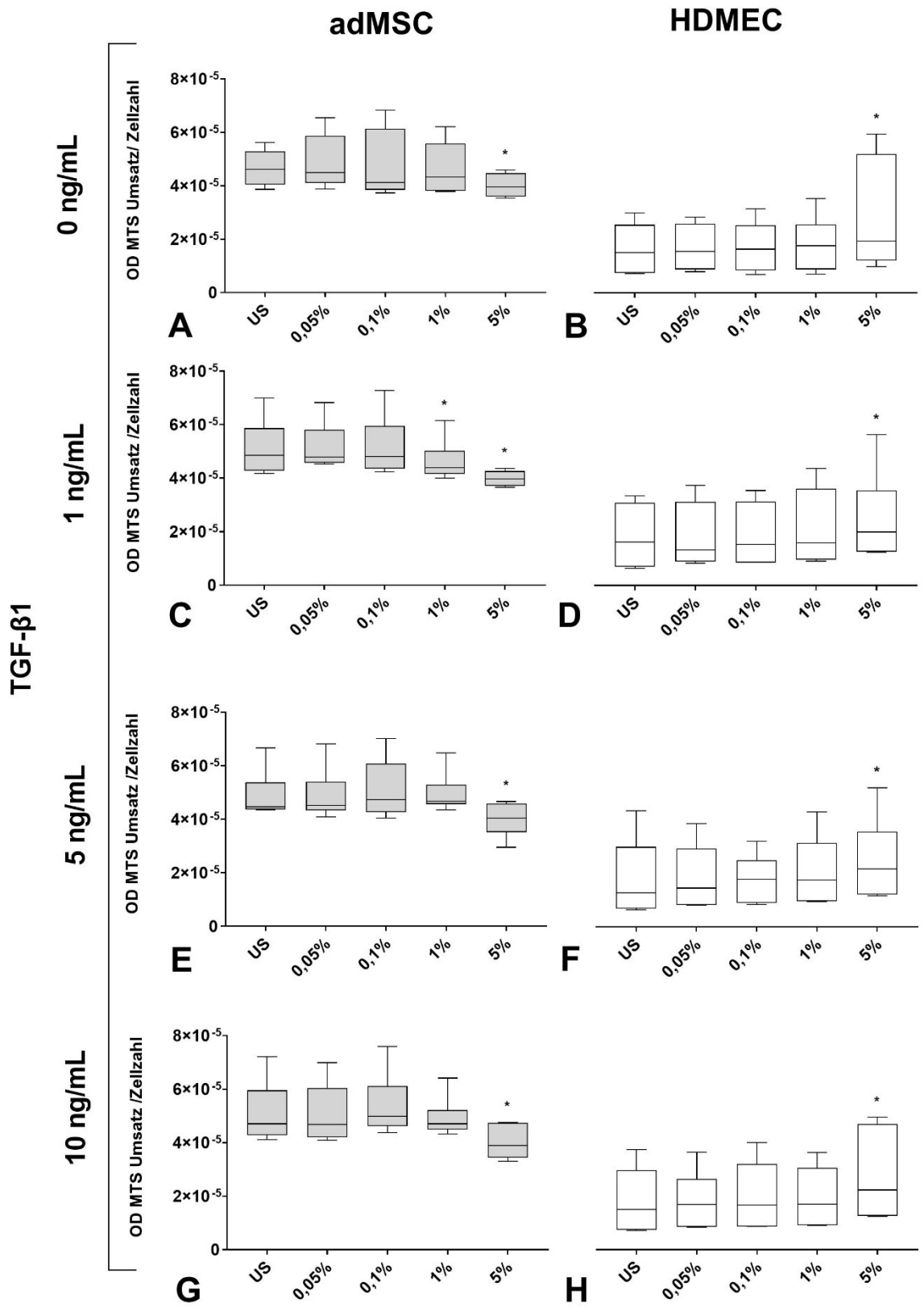

Abb. 15: MTS Umsatz bezogen auf die Zellzahl (Quotient) nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der T-WF bzw. von TGF-β (adMSC: graue Boxplots, HDMEC: weiße Boxplots; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten) (n = 3; Two-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison), $p < 0,05$; OD: Optische Dichte)

Bei den adMSC zeigte sich, unabhängig von der Zugabe an TGF-β1, eine signifikante Reduktion des Quotienten MTS-Umsatz/ Zellzahl bei Zugabe von 5 % T-WF (Abb. 15 A, C, E, G). Bei Zugabe von 1 ng/mL TGF-β1 ergab sich auch mit 1 % T-WF eine Signifikanz (Abb. 15 C). Die Tabelle 7 fasst die entscheidenden Quotienten und deren Signifikanzen bei den adMSC und HDMEC zusammen.

Tabelle 7: Quotienten MTS-Umsatz/Zellzahl der adMSC und HDMEC bei unterschiedlichen Konzentrationen von T-WF und TGF-β1 (Mediane und dazugehörige Signifikanzwerte) (n = 3; Two-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison), $p < 0,05$)

TGF-β1 [ng/mL]	**Quotient MTS Umsatz/Zellzahl (x 10^{-5})**		
	adMSC		**HDMEC**
	1 % T-WF	**5 % T-WF**	**5 % T-WF**
0 ng/mL	4,32	3,95 (p = 0,0026)	1,94 (p = 0,0001)
1 ng/mL	4,39 (p = 0,0351)	3,97 (p = 0,0001)	1,99 (p = 0,0050)
5 ng/mL	4,67	4,04 (p = 0,0001)	2,17 (p = 0,0036)
10 ng/mL	4,70	3,89 (p = 0,0001)	2,23 (p = 0,0001)

Auch bei den HDMEC ließ sich ein signifikanter Anstieg des Quotienten MTS Umsatz/Zellzahl, bei Zugabe von 5 % an T-WF erkennen (Abb. 15 B, D, F, H). Der Quotient blieb aber weitestgehend unbeeindruckt von der Zugabe an TGF-β1.

4.5 Proliferation nach Wachstumsfaktorexposition

4.5.1 Entwicklung der Zellzahlen nach Wachstumsfaktorexposition

Die Quantifizierung der Zellzahlen von adMSC und HDMEC nach Stimulation mit T-WF bzw. TGF-β1 erfolgte durch Färbung der Zellkerne und die anschließende mikroskopische Auswertung (3.5).

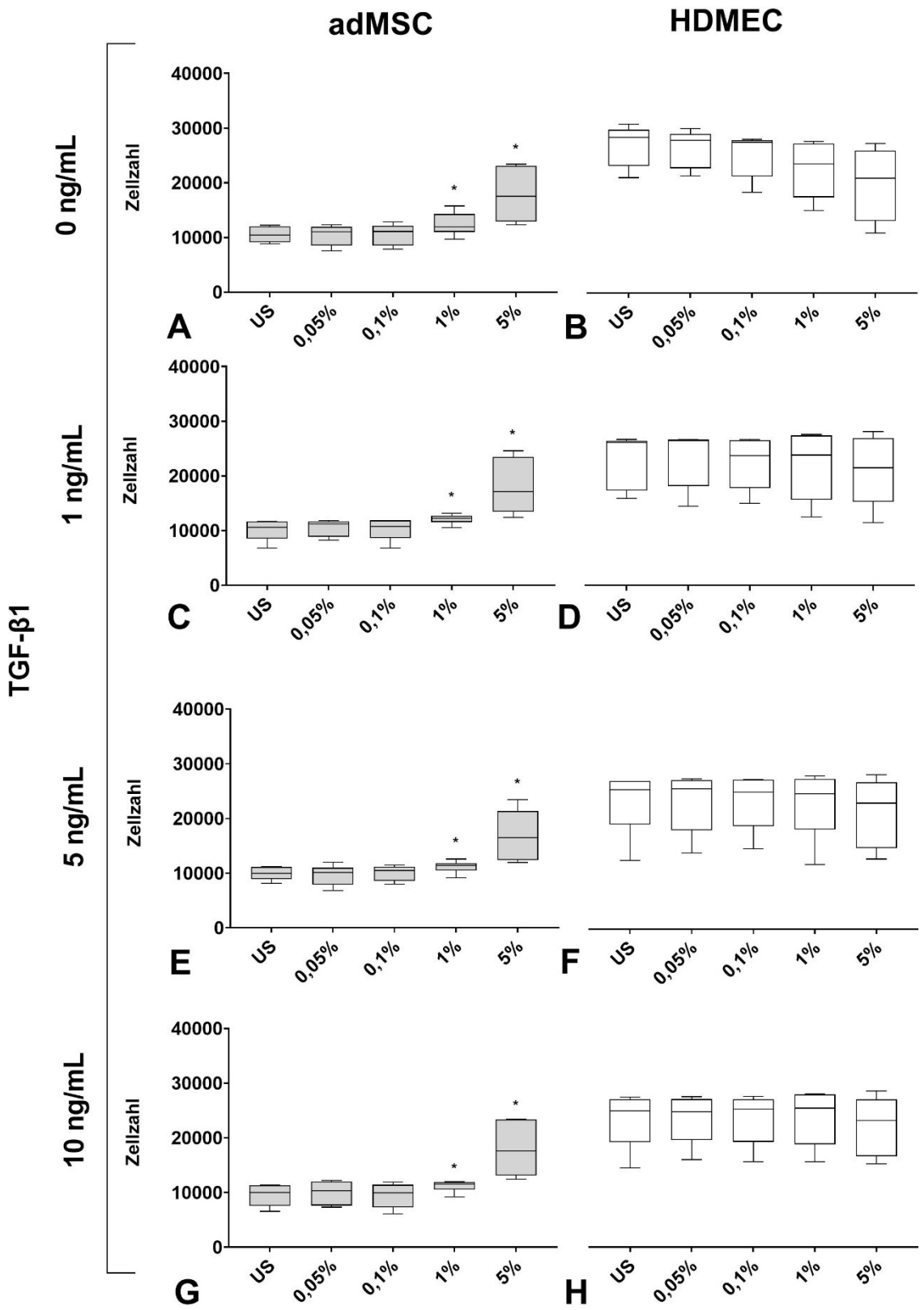

Abb. 16: Quantifizierung der Zellzahl nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von T-WF bzw. TGF-β1 (adMSC: graue Boxplots, HDMEC: weiße Boxplots; mit Median-, Interquartil- und Minimum/ Maximumwerten) (n = 3; Two-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison), $p < 0,05$ ermittelt)

Bei der Analyse der adMSC konnten signifikante Veränderungen detektiert werden. Die adMSC zeigten bei jeglicher Konzentration an TGF-β1 eine signifikante, konzentrationsabhängige Zunahme der Zellzahl (Abb. 16 A, C, E, G). Gleichzeitig auffallend war jedoch, dass die Zellzahl ohne Zugabe von T-WF mit steigender TGF-β1- Konzentration dezent geringer wurde (Tabelle 8).

Tabelle 8: Zellzahlen der adMSC bei unterschiedlichen Konzentrationen von T-WF und TGF-β1 (Mediane und dazugehörige Signifikanzniveaus) (n = 3; Two-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison), $p < 0,05$)

TGF-β1 [ng/mL]	Zellzahlen		
	Ohne T-WF	**1 % T-WF**	**5 % T-WF**
0 ng/mL	10.400	11.900 (p = 0,0002)	17.500 (p = 0,0001)
1 ng/mL	10.600	12.200 (p = 0,0002)	17.000 (p = 0,0001)
5 ng/mL	9.900	11.400 (p = 0,0198)	16.400 (p = 0,0001)
10 ng/mL	9.900	11.400 (p = 0,0011)	17.600 (p = 0,0001)

Bei den HDMEC konnten zwar keine signifikanten Veränderungen erkannt werden, jedoch kam es zu einer Zellzahlreduktion der HDMEC mit steigender Konzentration an TGF-β1 (Abb. 16 B, D, F, H) (Median von 28.300 Zellen ohne TGF-β1 gegen Median von 24.800 Zellen/Analyse bei 10 ng/mL TGF-β1, Abb. 16 B vs. H). Die Zellzahl bei Zugabe von 5 % an T-WF und steigender TGF-β1 Konzentration nahm zu (Median von 21.000 Zellen ohne TGF-β1 vs. Median von 23.100 Zellen bei 10 ng/mL TGF-β1, Abb. 16 B gegen H). Wir konnten zeigen, dass bei den HDMEC die Zugabe von 5 % T-WF die TGF-β1 induzierte Zellzahlreduktion ausglich.

4.5.2 Zellzyklusanalysen nach Wachstumsfaktorexposition

Die Zellzyklusanalysen erfolgten nach Stimulation mit T-WF und sowohl mit als auch ohne TGF-β1. Signifikante Veränderungen konnten weder bei den adMSC noch bei HDMEC detektiert werden. Insgesamt befand sich der größte Anteil der adMSC, unabhängig von der Zugabe an T-WF, in der G_0/G_1-Phase (Abb. 17 A). Es folgte der Anteil der Zellen, die sich in der G_2/M-Phase befanden. Am geringsten vertreten stellten sich die S- und sub-G_1- Phase dar. Mit steigender Zugabe an T-WF sank der in der G_0/G_1-Phase befindliche Anteil der adMSC dezent

ab, während die in der G_2/M-Phase und S-Phase befindlichen Zellen leicht anstiegen. Die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von TGF-β1 hatte keinen Effekt auf den Zellzyklus (Abb.22 im Anhang C, E).

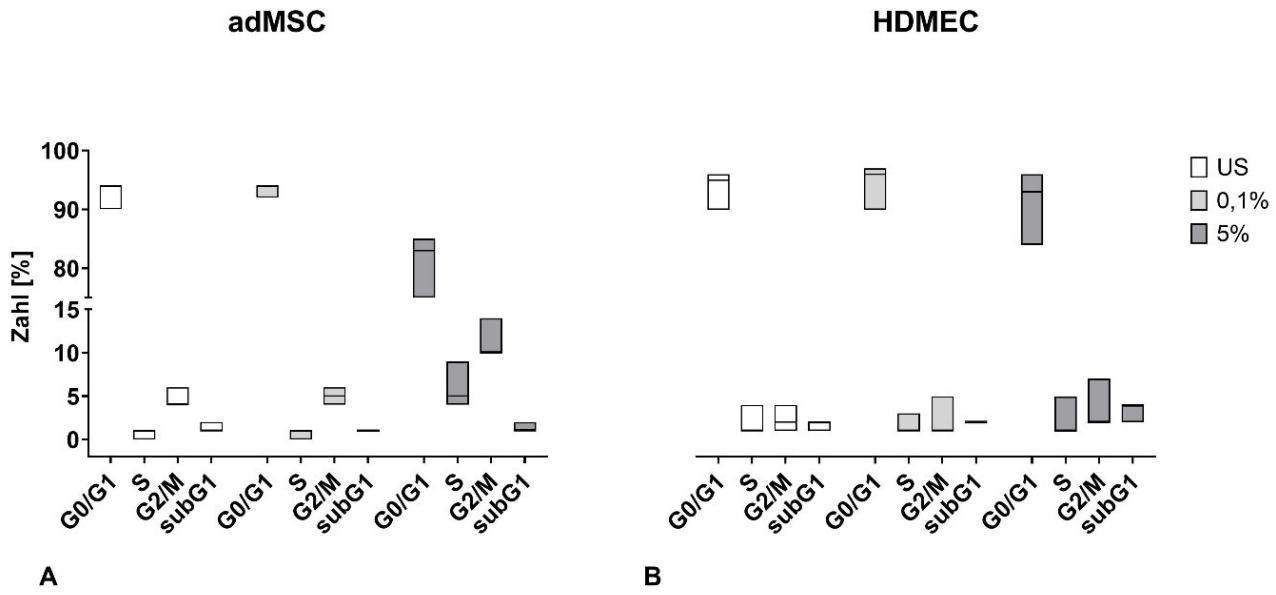

Abb. 17: Zellzyklusanalyse mittels Two-Step-Cell-Cycle Analysis Assay. Dargestellt ohne Zugabe von TGF-β1 (adMSC: links, HDMEC: rechts; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten) (n = 3; Deskriptive Statistik)

Auch bei den HDMEC befand sich der größte Teil der Zellen in der G_0/G_1-Phase, unabhängig von der Zugabe an T-WF. Insgesamt wirkte das Bild bei den HDMEC gleichmäßiger als bei den adMSC. Anteilig folgten daraufhin die Zellen der G_2/M-Phase, während die S- und sub-G_1-Phase erneut am geringsten abgebildet wurden. Dieser Sachverhalt änderte sich nicht durch Zugabe von TGF-β1 (siehe Anhang Abb. 22 D, F).

4.6 Spezifische Untersuchungen zur Apoptose

4.6.1 Analyse viabler und apoptotischer Zellen

Mittels des Mitochondrial Potential Assays lässt sich differenzieren, ob die zu untersuchenden Zellen viabel oder apoptotisch sind (94). Die Analyse zeigte weder bei den adMSC noch bei den HDMEC signifikante Veränderungen.

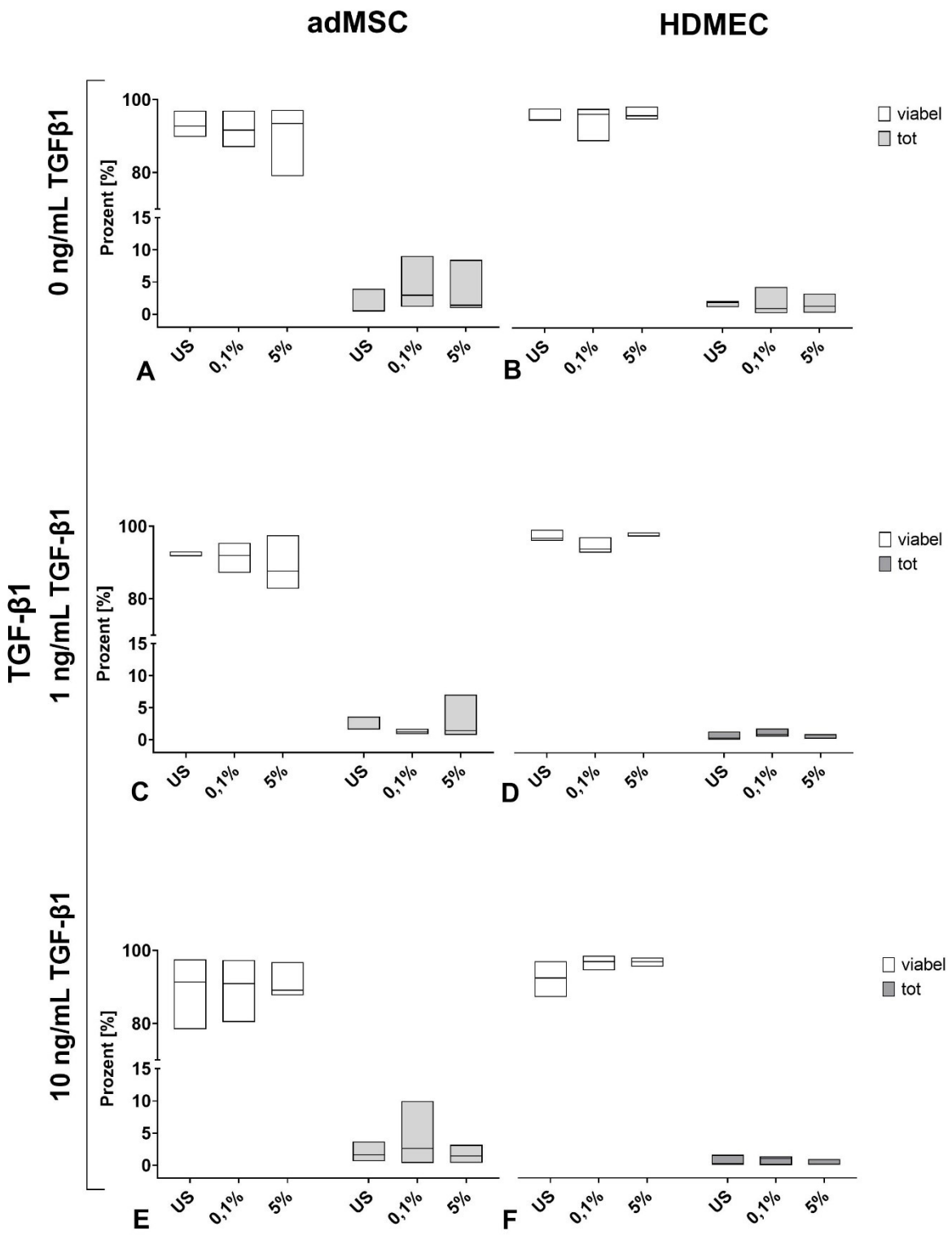

Abb. 18: Nachweis der lebenden und toten Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von T-WF bzw. TGF-β1 (adMSC: links, HDMEC: rechts; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten) (n = 3; Deskriptive Statistik)

Deutlich stellte sich jedoch bei den adMSC bei jeglicher Konzentration an TGF-β1 dar, dass der größte Anteil an Zellen viabel war. Bei 0 ng/mL TGF-β1 und keiner Zugabe an T-WF waren

92,8 % der Zellen viabel (Abb.18 A), was auch durch die Zugabe von T-WF keinen deutlichen Effekt hervorrief. Bei den toten Zellen konnten keine großen Veränderungen gesehen werden. Mit steigender Konzentration an TGF-β1 und der Zugabe von 5 % an T-WF konnte ein dezenter Abfall der viablen Zellen detektiert werden (Abb. 18 C, E). Zur Verdeutlichung sind in Tabelle 10 die Mediane der Viabilität bei 5 % T-WF mit unterschiedlichen Konzentrationen von TGF-β1 aufgeführt. Demnach führte die Zugabe von TGF-β1 zu einer dezenten Reduktion viabler adMSC.

Tabelle 9: Mediane der viablen Zellen bei den adMSC mit Zugabe von 5% an T-WF in Abhängigkeit von der unterschiedlichen TGF-β1- Konzentration (n = 3; Deskriptive Statistik)

TGF-β1 [ng/mL]	Median bei 5 % T-WF
0 ng/mL	93,5 %
1 ng/mL	87,7 %
10 ng/mL	89,1 %

Die Anzahl viabler HDMEC wies keine deutlichen Veränderungen auf, unabhängig von der Zugabe von T-WF als auch TGF-β1. In der unstimulierten Kontrolle gab 95,1% viable HDMEC (Abb. 18 B). Bei Zugabe von 5 % T-WF fiel eine dezente Reduktion der toten HDMEC auf, die mit zunehmender Konzentration an TGF-β1 umso deutlicher wurde (Abb. 18 B, D, F). Zur Verdeutlichung sind die Mediane der toten Zellen bei 5 % T-WF in der Tabelle 10 in Abhängigkeit von der Zugabe an TGF-β1 auch bei den HDMEC dargestellt.

Tabelle 10: Mediane der toten Zellen bei den HDMEC mit Zugabe von 5% an T-WF in Abhängigkeit von der unterschiedlichen TGF-β1- Konzentration (n = 3; Deskriptive Statistik)

TGF-β1 [ng/mL]	Median HDMEC bei 5 % T-WF
0 ng/mL	1,40 %
1 ng/mL	0,230 %
10 ng/mL	0,140 %

4.6.2 Untersuchungen zum Zelltod durch Apoptose

Mittels des Annexin V Assays lassen sich die Zellen in der frühen und späten Apoptosephase analysieren und von nekrotischen Prozessen unterscheiden. Signifikante Veränderungen ließen sich weder bei den adMSC noch bei HDMEC feststellen.

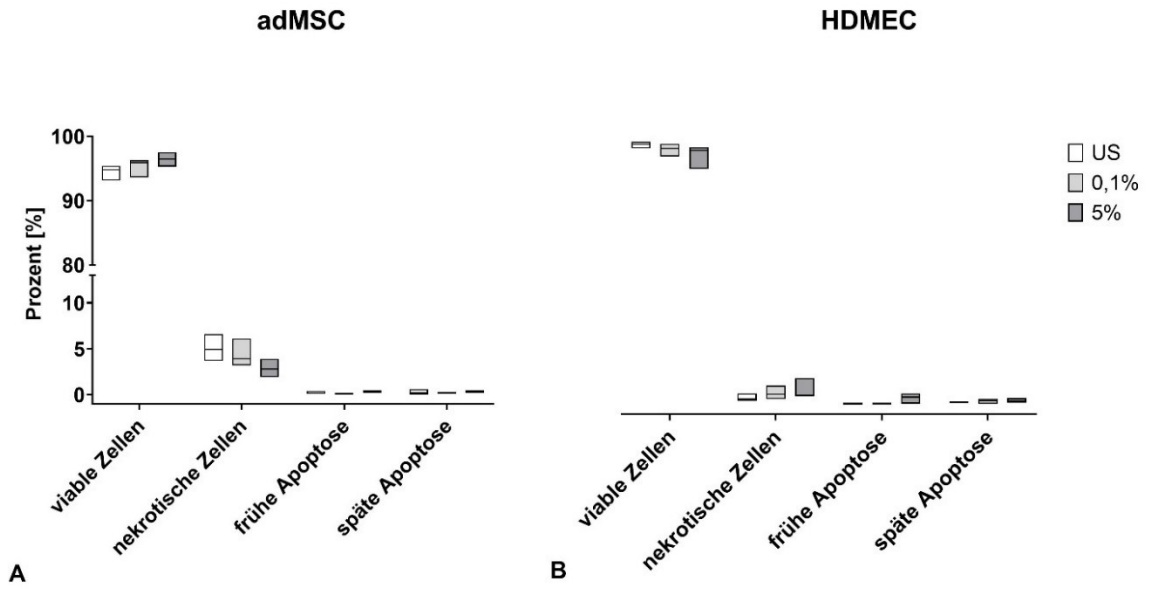

Abb. 19: Viable, nekrotische und apoptotische Zellen (frühe und späte Apoptose) nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der T-WF mit Zugabe von TGF-β1 (adMSC: links, HDMEC: rechts; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten dargestellt) (n = 3; Deskriptive Statistik)

Der größte Anteil der Zellen gehört zu den viablen Zellen, sowohl bei den adMSC als auch bei den HDMEC (Abb. 19 A, B). Anteilsmäßig deutlich geringer folgen bei beiden Zelltypen die nekrotischen Zellen. Die in der frühen und späten Apoptose befindlichen Zellen sind kaum vertreten. Weder die Zugabe von T-WF noch die Zugabe von TGF-β1 (siehe Abb. 23 C, D, E, F im Anhang) stellte einen großen Einfluss dar. Zur Verdeutlichung bildet Tabelle 11 diesen Sachverhalt sowohl bei den adMSC als auch den HDMEC ab.

Tabelle 11: Viable und nekrotische Zellen sowohl bei adMSC als auch HDMEC bei der Untersuchung des Zelltodes mittels des Annexin-V-Assays (n = 3; Deskriptive Statistik)

Zugabe von T-WF	Viable Zellen		Nekrotische Zellen	
	adMSC	HDMEC	adMSC	HDMEC
US	94,8 %	99,0 %	4,9 %	0,6 %
0,1 %	95,9 %	98,4 %	3,9 %	1,1 %
5 %	96,5 %	98,1 %	2,8 %	1,0 %

4.7 Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen

Die Quantifizierung der Zytokine und Chemokine erfolgte mittels eines Multiplex-Assays (3.10). Es wurden insgesamt 29 Analyten untersucht und exemplarisch werden folgende dargestellt: G-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-8, IL1-α und IL-1β. Zusätzlich konnten noch weitere lösliche Faktoren identifiziert werden: EGF, IFN-α2, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-15, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, VEGF, Eotaxin, INF-γ, IL-3, IL-12p40, IL-17A, IL-RA, IL-4, IL-5, IL-7, MIP-1α, MIP-1β, TNF-α, TNF-β. Nur bei den adMSC ließen sich IFN-α2, IL-10, IL12p70, MCP-1 und VEGF detektieren, wohingegen EGF, IL-15, IP-10 und IL-2 nur bei den HDMEC nachweisbar waren. Eine Tabelle im Anhang gibt einen Überblick über die weiteren gefundenen löslichen Faktoren (Tabelle 19 im Anhang).

4.7.1 G-CSF und GM-CSF

In der Analyse der Menge an G-CSF im Überstand der adMSC konnten zwar keine signifikanten Veränderungen detektiert werden, jedoch ließ sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg erkennen (Abb. 20 A, B).

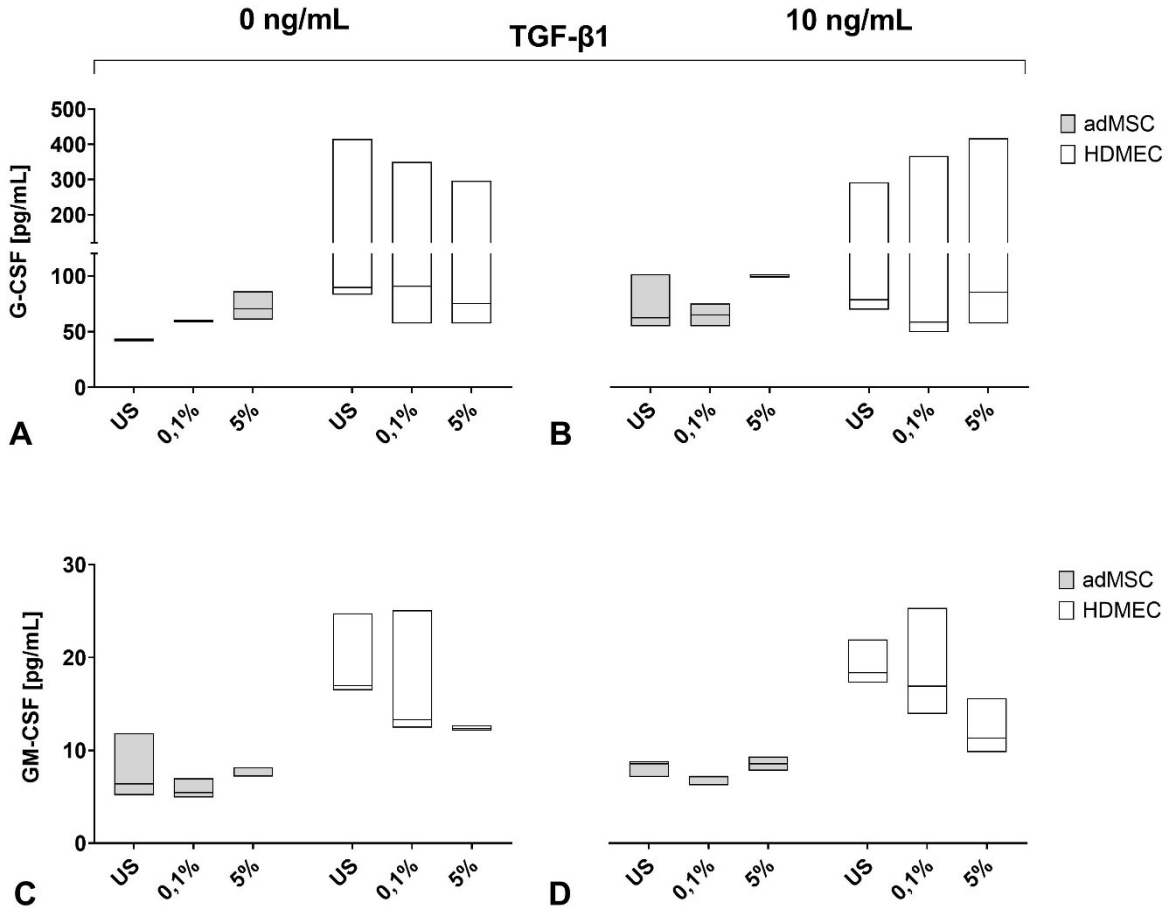

Abb. 20: Freisetzung von G-CSF und GM-CSF in dem Zellkulturüberstand nach 48-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von T-WF und TGF-β1 (adMSC: graue Boxplots, HDMEC: weiße Boxplots) (n = 3; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten)

Mit Zugabe von 10 ng/mL TGF-β1 veränderte sich zwar nicht die Tendenz, jedoch die absolute Menge an G-CSF, sie stieg (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Mediane der G-CSF- Menge im Überstand der adMSC nach Zugabe von T-WF und TGF-β1 (n = 3; Deskriptive Statistik)

TGF-β1 [ng/mL]	Menge an G-CSF	
	Ohne T-WF	Mit 5 % T-WF
0 ng/mL	42,5 pg/mL	70,4 pg/mL
10 ng/mL	62,0 pg/mL	99,1 pg/mL

Bei der Betrachtung der Menge an G-CSF im Überstand der HDMEC ließ sich ebenfalls keine Signifikanz beobachten, jedoch eine erhöhte Varianz im Vergleich zu den adMSC (Abb. 20 A, B). Ein Trend konnte nicht ausgemacht werden.

Hinsichtlich der Menge an GM-CSF im Überstand der adMSC konnten weder Signifikanzen noch tatsächliche Tendenzen erkannt werden (Abb. 20 C, D). Bei den HDMEC jedoch zeigte sich eine dezente Reduktion der Menge an GM-CSF im Überstand (Abb. 20 C, D), die in Tabelle 13 zusammengefasst wurde. Auch bei der Menge an GM-CSF fiel auf, dass die HDMEC im Vergleich zu den adMSC eine höhere Varianz aufwiesen.

Tabelle 13: Mediane der GM-CSF Menge im Überstand der HDMEC nach Zugabe von T-WF und TGF-β1 (n = 3; Deskriptive Statistik)

TGF-β1 [ng/mL]	Menge an GM-CSF	
	Ohne T-WF	**Mit 5 % T-WF**
0 ng/mL	16,9 pg/mL	18,4 pg/mL
10 ng/mL	12,3 pg/mL	11,3 pg/mL

4.7.2 IL-6 und IL-8

Die Analyse der Menge an IL-6 im Überstand der adMSC stellte keine signifikanten Veränderungen dar, gewisse Auffälligkeiten konnten jedoch beobachtet werden. Ohne Zugabe von TGF-β1 zeigte sich ein Anstieg der Konzentration an IL-6 (Abb.21 A), der durch die Zugabe von 10 ng/mL TGF-β1 scheinbar ausgeglichen wurde (Abb. 21 B). Zur Verdeutlichung werden die Werte in Tabelle 14 dargestellt.

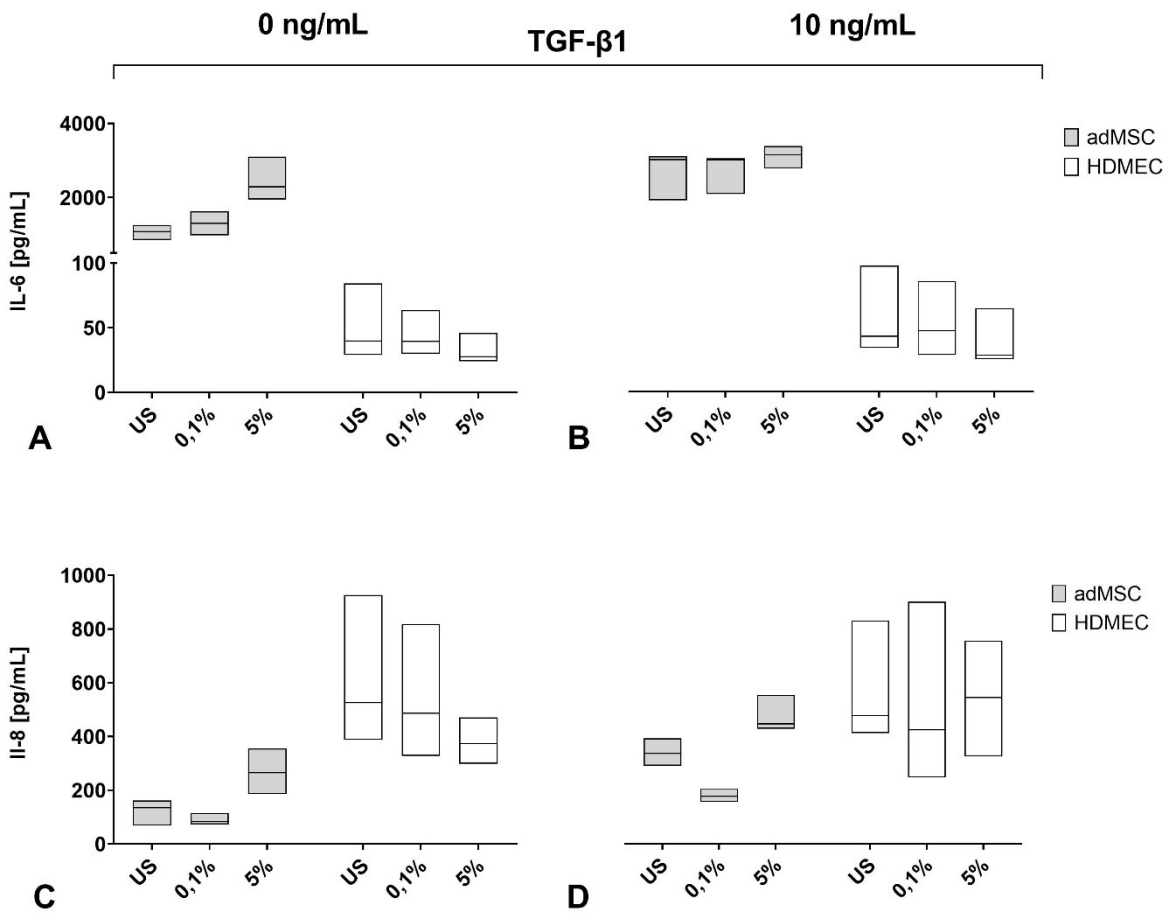

Abb. 21: Freisetzung von IL-6 und IL-8 nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen sowohl der T-WF als auch TGF-β1 (adMSC: graue Boxplots, HDMEC: weiße Boxplots; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten) (n = 3, Deskriptive Statistik)

Tabelle 14: Mediane der Menge an IL-6 im Überstand der adMSC in Abhängigkeit nach 48-stündiger Behandlung mit T -WF und TGF-β1 (n = 3; Deskriptive Statistik)

TGF-β1 [ng/mL]	Menge an IL-6	
	Ohne T-WF	Mit 5 % T-WF
0 ng/mL	1071 pg/mL	2999 pg/mL
10 ng/mL	2288 pg/mL	3126 pg/mL

Bei den HDMEC wurden zwar ebenfalls keine signifikanten Veränderungen detektiert, die Menge an IL-6 im Überstand sank jedoch tendenziell, mit und ohne Zugabe von TGF-β1, ab (Abb. 21 A, B), zur Verdeutlichung in Tabelle 15.

Tabelle 15: Mediane der Menge an IL-6 im Überstand der HDMEC in Abhängigkeit nach 48-stündiger Behandlung mit -WF und TGF-β1 (n = 3; Deskriptive Statistik)

TGF-β1 [ng/mL]	Menge an IL-6	
	Ohne T-WF	Mit 5 % T-WF
0 ng/mL	39,6 pg/mL	27,7 pg/mL
10 ng/mL	43,0 pg/mL	28,2 pg/mL

Bei der Betrachtung der Menge an IL-8 im Überstand der adMSC fiel ein konzentrationsabhängiger Anstieg auf (Abb. 21 C, D). Die Zugabe von TGF-β1 erhöhte die absolute Menge an IL-8 im Überstand der adMSC (Tabelle 16).

Tabelle 16: Mediane der Menge an IL-8 im Überstand der adMSC in Abhängigkeit nach 48-stündiger Behandlung mit -WF und TGF-β1 (n = 3; Deskriptive Statistik)

TGF-β1 [ng/mL]	Menge an IL-8	
	Ohne T-WF	Mit 5 % T-WF
0 ng/mL	135,7 pg/mL	265,3 pg/mL
10 ng/mL	274,0 pg/mL	363,0 pg/mL

Die HDMEC zeigten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen, jedoch ohne Zugabe von TGF-β1 (Abb. 21 C) einen konzentrationsabhängigen Abfall der Menge an IL-8 im Überstand. Mit Zugabe von 10 ng/mL TGF-β1 (Abb. 21 D) ließ sich kein Trend mehr erkennen.

V. Diskussion

5.1 Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Zellmorphologie

Um sich den Auswirkungen der T-WF alleine, aber auch zusammen mit dem TGF-β1 zu nähern, wurde zunächst die Morphologie sowohl der adMSC als auch der HDMEC betrachtet. Die adMSC zeigten ein Fibroblasten-ähnliches Erscheinungsbild mit langen, schlanken, spindelförmigen Zellen. Dieses Erscheinungsbild entspricht den gängigen Beschreibungen (18, 97, 98). Bei den HDMEC konnte nach Kultivierung ein konfluenter Monolayer mit nah beieinanderliegenden, polygonalen Zellen mit zentral gelegenem Nukleus beobachtet werden. Auch dieses Erscheinungsbild entspricht den gängigen Darstellungen (18). Bei der Kultivierung ordneten sich sowohl die adMSC als auch HDMEC zirkulär an und zeigten sich in einem dicht-gepackten Zellverband. Nach 48 Stunden Kultivierungszeit war das Wachstum der adMSC teilweise dreidimensional. Die HDMEC hingegen wachsen auch bei längerer Kultivierung einschichtig (Monolayer). Die Zugabe von T-WF alleine ergab bei beiden Zelltypen keine deutlichen Veränderungen in der Morphologie. Auch die Zugabe von T-WF zusammen mit TGF-β1 führte bei beiden Zelltypen nicht zu einer Veränderung der Morphologie. Hinweise auf den Zusammenhang von Morphologie und Differenzierung wurden bei den adMSC schon gefunden. Die nicht eintretenden morphologischen Veränderungen zu diesem frühen Zeitpunkt ergeben keinen Hinweis für eine eintretende Differenzierung (99). Bei den HDMEC wurde schon beschrieben, dass sich ihre Morphologie durch zytotoxischen Einflüsse verändert (100). Da dies bei unseren Ergebnissen nicht auftrat, können wir einen zytotoxischen Einfluss der T-WF bzw. des TGF-β1 auf die HDMEC ausschließen. Abgelöste, abgekugelte Zellen waren in keiner mikroskopischen Darstellung der beiden Zelltypen zu erkennen. Damit kann man schlussfolgern, dass weder die Zugabe von T-WF alleine, noch in der Kombination mit TGF-β1, auf beide Zelltypen toxisch wirkt.

5.2 Viabilität von adMSC und HDMEC unter dem Einfluss von T-WF und TGF-β1

Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf die Einschränkung der Zellviabilität. Daher wurde die Viabilität durch einen Lebend/Tot-Assay genauer untersucht. Dieser zeigte bei den adMSC eine TGF-β1 abhängige Reduktion des Anteils an toten Zellen, während bei den HDMEC eine T-WF abhängige Steigerung des Anteils toter Zellen zu beobachten war. Damit kann man schlussfolgern, dass der Anteil viabler Zellen bei den adMSC durch die Zugabe an TGF-β1 steigt, wohingegen bei den HDMEC eine T-WF abhängige Abnahme des

Anteils viabler Zellen eintrat. Somit zeigten die beiden Zelltypen bei Zugabe von T-WF als auch in Kombination mit TGF-β1 gegensätzliche Veränderungen hinsichtlich ihrer Viabilität.
Somit verändert die Zugabe von T-WF als auch TGF-β1 eindeutig die metabolische Aktivität beider Zelltypen. Hahn et al. zeigten, dass die TGF-β1- Exposition zu einer Reduktion der metabolischen Aktivität bei adMSC führt (101). Damit stehen diese Ergebnisse im Widerspruch. Bei genauerer Betrachtung der Versuchsbedingungen fällt jedoch auf, dass Hahn et al. einen längeren Stimulationszeitraum untersucht haben (bis zu 7 Tagen). Damit ist zu vermuten, dass die TGF-β1-Stimulationsdauer bei adMSC einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der metabolischen Aktivität haben könnte (101). Walenda et al. konnten, kongruent zu unseren Ergebnissen, eine Zunahme der metabolischen Aktivität bei mit TGF-β1 behandelten adMSC darstellen. Es gibt sonst wenige vergleichbare Studien, die den Einfluss der Zugabe von T-WF bzw. TGF-β1 auf adMSC und HDMEC abbilden. Jedoch zeigen Untersuchungen zu den Auswirkungen der Zugabe von PRPs auf z.B. Chondrozyten, dass durch eine wiederholte Stimulation einen Anstieg der metabolischen Aktivität verzeichnet werden konnte (102). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen zur erhöhten metabolischen Aktivität der adMSC durch T-WF Zugabe. Bosch et al. konnten in einer Studie zur Behandlung von Sehnenverletzungen beim Pferd mit PRPs zeigen, dass die metabolische Aktivität in dem betroffenen Areal anstieg (103). Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen von Sun et al. zur Exposition von pulmonalen Endothelzellen mit TGF-β1 eine verminderte mitochondriale Funktion an. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu unseren Ergebnissen, jedoch wurde in unseren Untersuchungen der Formazansalz-Umsatz betrachtet und nicht wie bei Sun et al. mittels eines Echtzeit-Zellmetabolismus-Analysegerätes (Seahorse Analyzer) quantifiziert. Die Unterschiede können durch verschiedene Aspekte hervorgerufen werden, wie beispielsweise andere Gewebequelle (Lunge vs. Haut), aber auch die Dauer der Stimulation mit TGF-β1 bzw. die jeweiligen spezifischen Kulturbedingungen (Medium, Präparationsart, etc.). Durch diese Datenlage lassen sich unsere Ergebnisse insoweit stützen, als dass Primärzelltypen unterschiedliche Tendenzen hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität aufweisen.

5.3 Proliferation der adMSC und HDMEC unter dem Einfluss von T-WF und TGF-β1

Um weitere Hinweise zu möglichen Zusammenhängen der gesteigerten metabolischen Aktivität mit der Proliferationsaktivität zu gewinnen, wurden die Zellzahlen quantifiziert. Bei den adMSC führte die Exposition mit T-WF zu einer konzentrationsabhängigen, signifikanten Zunahme der Zellzahl. Die HDMEC hingegen zeigten eine konzentrationsabhängige Zellzahlreduktion durch die Exposition mit T-WF. Das Ergebnis bei TGF-β1 Exposition ähnelt dem der

T-WF Exposition: hier stieg abhängig von der Konzentration die Zellzahl der adMSC an, während die Zellzahlen bei den HDMEC-Kulturen geringer wurden.
Es gibt bei Säugetieren drei Isoformen des TGF-β (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3) und die heterogenen Effekte des TGF-β werden Rezeptor-vermittelt ausgelöst. Bei genauer Betrachtung der Datenlage, werden seine dichotomen Effekte deutlich (104–108). Das Wachstum epithelialer und endothelialer Zellen *in vitro* wird gehemmt, wobei *in vivo* das epitheliale Zellwachstum unterstützt wird (7, 104–106, 109, 110). Gerade im Rahmen der Wundheilung kann *in vivo* eine erhöhte Festigkeit der Wunde und ein unterstütztes epitheliales Wachstum beobachtet werden (7, 111). In mesenchymalen Zellen stimuliert TGF-β1 das Zellwachstum (104, 105, 111). Gerade die Abhängigkeit von der entsprechenden Zielzelle, die Zellkulturbedingungen, ob andere Wachstumsfaktoren in der Nähe sind oder aber die Menge der Zugabe machen die Wirkung von TGF-β1 so unterschiedlich (106, 112). Beispielsweise zeigen glatte Muskelzellen bei einer geringen Menge eine erhöhte Proliferation, die bei einer höheren Menge an TGF-β1 nicht mehr hervorgerufen werden kann (106). Auch Fukamizu et al. konnten an isolierten Fibroblasten zeigen, dass die Dosis des TGF-β1 dessen Wirkung bestimmt. Bei einer geringen Konzentration wurde die Kollagensynthese stimuliert, während bei einer erhöhten Dosis die Kollagensynthese reduziert wurde (107) Dass TGF-β1 bei mesenchymalen Zellen zu einer Unterstützung des Zellwachstums führt, kann sowohl durch Cassiede et al. als auch Hahn et al. unterstrichen werden. Durch die TGF-β1 Zugabe stieg die Zellzahl der verwendeten MSC (101, 113). Damit stehen unsere Ergebnisse zu den adMSC im Einklang mit der Literatur.
Bei den HDMEC zeigte sich bei uns eine TGF-β1 abhängige Zellzahlreduktion, die ebenfalls mit der Datenlage konform geht. *In vivo* werden die HDMEC als proliferativ vergleichsweise ruhend angesehen, während sie *in vitro* einen proliferierenden Charakter haben (17, 114). Dies wird dadurch begründet, dass die endothelialen Zellen, sobald sie auf einer Plastikoberfläche kultiviert werden, den zellulären Kontakt zu anderen endothelialen Zellen, glatten Muskelzellen und Perizyten verlieren. Es wird vermutet, dass dies an einer Aktivierung des TGF-β1 liegt, die durch den Kontakt zwischen endothelialen Zellen und glatten Muskelzellen oder auch Perizyten hervorgerufen wird. Erst durch diese Aktivierung sei eine Wachstumsinhibition bei den Endothelzellen möglich (110). TGF-β1 wird weitgehend als starker Proliferationsinhibitor endothelialer Zellen gesehen (57). Insbesondere wird vermutet, dass die TGF-β1-vermittelten Effekte von den Zellkontakten der Zielzelle abhängig sind, das Vorhandensein eines bestimmten Milieus im Extrazellulärraum und auch die Anwesenheit von anderen Faktoren, die TGF-β1 beeinflussen könnten, entscheidend sind (109, 110, 115). Dies wird auch durch die Ergebnisse von Tsukada et al. unterstützt, die zeigen konnten, dass die Zellzahl der humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) TGF-β1 abhängig signifikant reduziert wird (116). Dass die Wirkung des TGF-β1 nicht nur vom Zelltyp, der Zellkultur, des entsprechenden Rezeptors und der Menge an TGF-β1 abhängig ist,

zeigen die Ergebnisse von Kilian et al., die zeigen konnten, dass geringe TGF-β1 Konzentrationen die Proliferation von Endothelzellen *in vitro* stimulieren (106, 117). Dies konnten wir in unseren Ergebnissen nicht darstellen, es gibt jedoch Hinweise auf die vielfältigen Wirkungen des TGF-β1. Generell zeigt sich aber, dass T-WF und TGF-β1 die Proliferation von adMSC und HDMEC gegensätzlich beeinflussen.

5.4 Der Zellzyklus und die Apoptose der adMSC und HDMEC in Abhängigkeit von der Zugabe an T-WF und TGF-β1

Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen deuten an, dass die Exposition von adMSC und HDMEC mit T-WF und TGF-β1 Effekte auf den Zellzyklus ausüben könnten.
Bei beiden Zelltypen befand sich ein Großteil der Zellen in der G_0/G_1-Phase. Die Exposition beider Zelltypen mit TGF-β1 induzierte dabei kaum Veränderung. Die Literaturlage stellt wenig Hinweise zum Einfluss von T-WF und TGF-β1 auf den Zellzyklus bei den adMSC und HDMEC dar. Als Näherung lässt sich jedoch anführen, dass die TGF-β1-Exposition bei Chondrozyten auch zu keiner signifikanten Veränderung des Zellzyklus führt (101). Bei Cornea-Endothelzellen führte die Exposition mit TGF-β1 zu einer Reduktion des Anteils an Zellen in der S-Phase bei gleichzeitiger Erhöhung des G_0/G_1-Phasen- Anteils (118). In unseren Versuchen zur Exposition von HDMEC und adMSC mit TGF-β1, zeigten sich diese Phasenverschiebungen nicht. Ursachen für Widersprüchlichkeiten können sowohl in der abweichenden Zellquelle (Mensch vs. Kaninchen, Haut vs. Hornhaut), aber auch in den spezifischen Kulturbedingungen (Zellkulturmedium, Behandlungszeitraum, etc.) liegen. Bei den Zellzyklusanalysen beider Zelltypen war der Anteil an Zellen in der sub-G_1-Phase äußerst gering. Die sub-G_1-Phase repräsentiert die apoptotischen Zellen, die vor der G_1-Phase einen Peak bilden (93). In der Literatur finden sich Hinweise auf eine apoptotische Aktivität des TGF-β1 auf unterschiedliche Zellen, wie Lymphozyten, Endothelzellen,Hepatozyten oder glatten Muskelzellen (119, 120). Bei unseren Ergebnissen gibt es keine Hinweise auf ausgeprägte Anteile apoptotischer Zellen nach Behandlung mit T-WF bzw. TGF-β1. Da unsere Hinweise auf Apopotose gering sind, müssen wir davon ausgehen, dass die geringen Anteile toter Zellen vornehmlich auf nekrotischen Prozessen beruhen.

5.5 Die Effekte der gemeinsamen Gabe von T-WF und TGF-β1 auf adMSC und HDMEC

Sowohl adMSC als auch HDMEC wurden mit dem Wachstumsfaktorgemisch, den T-WF, exponiert. T-WF enthält ,neben einer Reihe biologisch aktiver WF, ebenfalls TGF-β1 in großen Anteilen (80, 88). Gleichzeitig wurde TGF-β1 zusätzlich in den unterschiedlichen Konzentrationen auf die beiden Zelltypen gegeben. Diese zusätzliche TGF-β1 Exposition führte zu Veränderungen hinsichtlich der Viabilität und Proliferation. Interessant bei unseren Proliferationsergebnissen war die Tatsache, dass die Zellzahl bei den adMSC durch Zugabe von TGF-β1 ohne Zugabe von T-WF geringer wurde. Dies könnte sich insoweit erklären lassen, als dass die proliferative Antwort mesenchymaler Zellen durch die autokrine Induktion von PDGF und der Synthese von PDGF- ähnlichen Molekülen zustande kommt (105, 106). In dem Zusammenhang soll es einen autokrinen „PDGF“-Loop geben, der PDGF durch TGF-β1 hochreguliert. Somit soll die proliferative Funktion des TGF-β1 durch die Induktion von PDGF gesteuert werden (105, 106). Es würde bedeuten, dass in einem proliferativen Setting die gleichzeitige Gabe von PDGF mit TGF-β1 die proliferative Wirkung verstärkt. Die Zugabe von T-WF zusammen mit TGF-β1 würde somit erst zu der beobachteten Zellzahlsteigerung führen. Unsere Ergebnisse, dass ohne T-WF Zugabe die Zellzahl sinkt, unterstützen dies. Da die HDMEC keinen PDGF-Rezeptor exprimieren, ist eine abweichende Reaktion zu erwarten (106). Dies könnte eine Ursache für die gegensätzlichen Effekte der gemeinsamen Gabe von T-WF und TGF-β1 bei beiden Zelltypen sein. In dem Zusammenhang spielt, klinisch betrachtet, auch die Anwendung des PRP eine wesentliche Rolle, da damit eine Vielzahl von verschieden wirksamen biologischen Wachstumsfaktoren auf die Wunde gegeben werden können (52). In der Literatur zeigten sich positive Effekte des PRPs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an Zellen des muskuloskelettalen Systems, wie Chondrozyten, Tenozyten, oder Muskelzellen (30, 121). In dieser Hinsicht unterstützen unsere Ergebnisse die Verwendung von Wachstumsfaktorkombinationen, aber es sind weitere Forschungsanstrengungen erforderlich, um das Risiko widersprüchlicher zelltypabhängiger Wirkungen im klinischen Kontext besser einschätzen zu können.

5.6 Die Effekte von T-WF und TGF-β1 auf die Freisetzung löslicher Faktoren

Sowohl bei den adMSC als auch bei den HDMEC wurden eine Reihe von Faktoren in den Zellkulturüberstand freigesetzt. Dabei führte die Zugabe von T-WF und TGF-β1 zu Veränderungen im Freisetzungsmuster. Es ist bekannt, dass MSC lokale reparative Effekte durch Differenzierung in Gewebe-spezifische Zellen und durch parakrine Sekretion von Faktoren mit antiinflammatorischen und wundheilungsspezifischen Aktivitäten auslösen (122). In der entzündlichen Phase der Wundheilung regulieren die MSC scheinbar die Entzündung, während

sie in der proliferativen Phase nicht nur PDGF und VEGF produzieren, sondern auch Keratinozyten und weitere Stammzellen zum Wundgeschehen rekrutieren. In der länger anhaltenden Phase der Remodellierung produzieren die adMSC TGF-β, regulieren MMPs und die Kollagensynthese (8). Endothelzellen können in einem inflammatorischen Setting eine prothrombotische, antifibrinolytische Umgebung schaffen. Auch der Blutfluss wird durch die Sekretion und Aufnahme vasoaktiver Stoffe seitens der Endothelzellen reguliert (114).
Es gibt nur wenige Daten zur T-WF und TGF-β1-abhängigen Freisetzung von Zytokinen bei adMSC und HDMEC. Daher können im Folgenden nur exemplarische Näherungen im Kontext unserer Ergebnisse dargestellt werden. Beide Zelltypen setzten G-CSF, GM-CSF, IL-6 und IL-8 frei. Die Exposition mit TGF-β1 führte bei den adMSC nicht zu einer Veränderung der GM-CSF- Freisetzung, bei den HDMEC führte die Exposition zu einer geringfügigen Reduktion der GM-CSF-Menge im Zellkulturüberstand. Nilsen et al. beschrieben die Sekretion von GM-CSF bei HUVEC (123). Auch wird beschrieben, dass die GM-CSF Produktion durch TGF-β1 reduziert wird (124).
Endothelzellen setzen eine Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 frei (125). Dies können wir durch unsere Ergebnisse bestätigen, da die HDMEC sowohl IL-6 als auch IL-8 sezernieren. Chen et al. beschrieben ferner, dass die Stimulation von HUVEC mit TGF-β1 zu keiner Veränderung bei der Sekretion von IL-6 oder IL-8 führte (125). In unseren Untersuchungen jedoch konnten wir Veränderungen beobachten, es kam zu einer reduzierten Freisetzung dieser Faktoren. Die Ursachen für diese Unterschiede können durch verschiedene Aspekte hervorgerufen werden, wie beispielsweise die jeweiligen spezifischen Kulturbedingungen (Medium, Präparationsart, etc.).
Bei den beiden untersuchten Zelltypen gibt es Faktoren, welche nur von einem Zelltyp freigesetzt werden. So setzen in unseren Untersuchungen ausschließlich adMSC IL-10 und VEGF frei. Laut Literatur wird die Freisetzung von IL-10 durch MSC widersprüchlich beschrieben, d.h. einige Studien konnten die IL-10 Freisetzung bei MSC zeigen, anderen gelang der Nachweis nicht (122). Beispielsweise konnten Park et al. zwar zeigen, dass die von ihnen verwendeten, Knochenmark-MSC sowohl IL-8 als auch VEGF sezernierten, dafür jedoch kein IL-10 (126). Bei Newman et al. findet man keinerlei Hinweise für eine Sekretion von IL-10 oder VEGF (127). Hingegen bei Ma et al. konnte zunächst die Sekretion von VEGF durch MSC bestätigt werden, der Nachweis der IL-10-Freisetzung gelang jedoch nicht (128). Blaber et al. konnten bei adMSC die Freisetzung von IL-10 nachweisen. Die Exposition der adMSC mit TGF-β1 führte zu einer Steigerung der IL-10 und VEGF-Freisetzung. IL-10 wirkt anti-inflammatorisch, induziert die Immuntoleranz und hemmt die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (122). Die von den adMSC sezernierten löslichen Faktoren werden entweder spontan oder durch den Einfluss anderer Zytokinme wie IFN-γ, TNFα und IL-1β freigesetzt (122). Möglicherweise hat auch

TGF-β1 einen Einfluss auf die Freisetzung dieser löslichen Faktoren. Die Tatsache, dass Fibroblasten innerhalb der Wunde durch TGF-β1 und PDGF zur Differenzierung in Myofibroblasten stimuliert werden, würde diese Vermutung stützen (7). Auch die HDMEC zeigen ein spezifisches Freisetzungsmuster. So werden EGF, IL-2 und IL-15 ausschließlich durch HDMEC, nicht aber durch adMSC freigesetzt. IL-2, sowie auch IL-15, wirken immunmodulierend und proinflammatorisch. EGF unterstützt die Wundheilung, indem es die Teilung von endothelialen Zellen und unter anderem die Angiogenese stimuliert (7, 56, 129). Es ist bekannt, dass Endothelzellen eine Reihe von Faktoren wie PDGF und TGF-β1 sezernieren und damit eine entscheidende Rolle während der Angiogenese im Rahmen der Wundheilung einnehmen (4, 7, 53).
Generell lässt sich durch unsere Ergebnisse schlussfolgern, dass das Freisetzungsmuster von Zytokinen und Chemokinen durch die Zugabe von T-WF und TGF-β1 beeinflusst wird und dass es Zytokine und Chemokine gibt, die nur von einem der beiden untersuchten Zelltypen sezerniert werden.

5.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in einem *in vitro*-Modellsystem, d.h. einem artifiziellen System gewonnen. Dabei bleiben grundsätzlich große Fragen zur Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation offen. Jedoch könnten Anpassungen des Versuchsprotokolls, wie z.B. die Verlängerung der Expositionszeiten oder Mehrfachstimulation Hinweise auf langfristigere Effekte geben. Weiterhin müssten die Ergebnisse der metabolischen Aktivität mittels MTS-Test kritisch betrachtet werden. Da es sich lediglich um einen Tetrazoliumsalz-Konversionsassay handelt, kann über die genaue Funktion des Energiestoffwechsels nur eine Näherung angenommen werden. Hier wären weitere Untersuchungen zum Energiestoffwechsel im Allgemeinen, wie z.B. mit einem Echtzeit-Metabolismus Analysegerät in den nächsten Schritten zu tätigen. Auch der Aspekt der verschiedenen Interaktionen der Zytokine und Chemokine zueinander und zu den einzelnen Zelltypen müsste weiter *in vitro* erforscht werden. Dabei könnte dann auch die Proteomanalytik von Bedeutung sein, die hilft, alle von den einzelnen Zelltypen sezernierten löslichen Faktoren zu katalogisieren. In einem weiteren Schritt könnte auch ein dreidimensionales *in-vitro* Modell und gerade für die Fragen der Wundheilung, eine künstlich erzeugte Wunde von Interesse sein. Zudem wären tierexperimentelle Untersuchungen zur Darstellung der Effekte in einer komplexen in vivo-Situation von Bedeutung. Generell wurden in unseren Untersuchungen die Aspekte auf molekularer Ebene, z.B. hinsichtlich der Genexpression, nicht betrachtet. Auch dieses Feld der Forschung könnte für die weiteren Fragen der Wundheilung und der an ihr beteiligten Zytokine, Chemokine und Zelltypen von Bedeutung sein.

Um Rückschlüsse für den klinischen Kontext ziehen zu können, müssen die Vorteile für die Behandlung chronischer Wunden mit Wachstumsfaktoren evaluiert werden. Frühere Studien konnten bereits einen Zusammenhang von chronischen Wunden und einem Wachstumsfaktor-Defizit nachweisen (13). Gandhi et al. konnten beispielsweise nachweisen dass die Frakturhämatome von Patienten mit einem Diabetes mellitus deutlich weniger PDGF und TGF-β1 enthielten (9). Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass sowohl die Zugabe von T-WF als auch TGF-β1 sowohl auf adMSC als auch HDMEC Veränderungen hinsichtlich der metabolischen Aktivität und Proliferationsaktivität hervorruft. Diese Veränderungen können zukünftig im Bereich der Wund- und Knochenheilung eingesetzt werden. Ein weiterer wichtiger, bisher kaum untersuchter Aspekt sind zudem die Auswirkungen von PRP und T-WF auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Die EMT könnte ein wichtiger Aspekt bei der Regeneration sein. Insbesondere die Interaktionen und Wirkungen einzelner löslicher Faktoren hinsichtlich der Wundheilung sollten betrachtet werden. Diese Zusammenhänge der einzelnen Wachstumsfaktoren, der MSC und HDMEC im Rahmen der Wundheilung sind Facetten, die noch aufgedeckt werden müssen, damit wir zukünftig die Möglichkeit haben, die Wundheilung spezifisch positiv zu beeinflussen

VI. Zusammenfassung

Eine Verletzung geht initial mit einer Entzündungsreaktion einher, welche mit der Freisetzung von inflammatorischen Faktoren verbunden ist. Am Ort der Gewebeschädigung können die beteiligten Zelltypen mit den von unterschiedlichen Zellen sezernierten Faktoren interagieren und so die Wundheilung vorantreiben. Während des Wundheilungsprozesses kommt es zur Gefäßneubildung (v.a. ausgehend von Endothelzellen) und der Mobilisierung und Differenzierung verschiedener adulter Stammzellen (u.a. mesenchymale Stammzellen/MSC).
Die klinische Anwendung von Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) versucht, sich die für die Wundheilung positiven Eigenschaften der Wachstumsfaktoren, wie insbesondere der Thrombozyten-stämmige Wachstumsfaktoren (T-WF) zu Nutze zu machen. In den Bereichen der Knochen- und Weichgewebsregeneration, bei Sehnenverletzungen und auch bei der Behandlung chronischer Wunden konnten positive Effekte der PRP-Behandlung gezeigt werden.
In diesem Kontext haben wir das Verhalten von MSC und Endothelzellen hinsichtlich ihrer *in vitro*-Reaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen an T-WF und TGF-β1 analysiert und diese Effekte vergleichend dargestellt. Bei adMSC und HDMEC führte die Zugabe von T-WF und TGF-β1 nicht zu Morphologieveränderungen, auch zytotoxischen Effekte konnten nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten wir bei der Viabilität Veränderungen beobachten. Durch die TGF-β1-Zugabe kam es bei den adMSC zu einer Reduktion des Anteils an toten Zellen, während bei den HDMEC der Anteil toter Zellen durch die T-WF-Exposition konzentrationsabhängig anstieg. Die metabolische Aktivität stieg bei beiden Zelltypen konzentrationsabhängig signifikant an, bei den adMSC durch die T-WF-Zugabe, bei den HDMEC durch die TGF-β1 Zugabe. Bei der Proliferationsaktivität zeigte sich ein gegenläufiges Bild: die adMSC ließen eine T-WF abhängige, signifikante Zellzahlzunahme erkennen, während bei den HDMEC eine T-WF abhängige Zellzahlreduktion zu beobachten war. Eine detaillierte Analyse des Zellzyklus zeigte bei jedoch beiden Zelltypen keine signifikanten Veränderungen. Generell konnten wir durch unsere Untersuchungen feststellen, dass die gleichzeitige Anwendung von T-WF und TGF-β1 insbesondere bei den adMSC zu einer deutlichen Steigerung der Zellmenge führte. Auch unsere Untersuchungen zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen konnten zeigen, dass bestimmte lösliche Faktoren nur von einem Zelltyp freigesetzt wurden (adMSC u.a. IL-10, VEGF; HDMEC u.a. EGF, IL-2, IL-15) und diese Freisetzung von der Zugabe an T-WF und TGF-β1, wenn auch geringfügig, verändert wird. Obwohl unsere Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Verwendung sowohl von T-WF als auch von TGF-β1 bei der Wundheilung von Bedeutung sein könnte, zeigen vor allem die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse, dass noch viel Forschungsarbeit hinter einem klinischen Einsatz solcher Wachstumsfaktorpräparate und ihrer allogenen Verwendung steht.

VII. Literatur

1. Diener H, Kleinspehn E, Larena-Avellaneda A, Kaschwich M, Rieß HC, Heidemann F et al. Wundheilungsstörungen im Kontext – Epidemiologie und Pathophysiologie. Gefässchirurgie 2017; 22(8):524–32. doi: 10.1007/s00772-017-0330-3.
2. Joachim Dissemond KK. Chronische Wunden: Diagnostik-Therapie-Versorgung. 1.Auflage: Elsevier; 2020.
3. Reibnitz C von, Skowronsky A. Wundversorgung von A–Z. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
4. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. Int J Inflam 2019; 2019:3706315. doi: 10.1155/2019/3706315.
5. Moll I. Dermatologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016.
6. Strodtbeck F. Physiology of wound healing. Newborn and Infant Nursing Reviews 2001; 1(1):43–52. doi: 10.1053/nbin.2001.23176.
7. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. Plast Reconstr Surg 2006; 117(7 Suppl):12S-34S. doi: 10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2.
8. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. Stem Cells Transl Med 2012; 1(2):142–9. doi: 10.5966/sctm.2011-0018.
9. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. J Craniofac Surg 2005; 16(6):1043–54. doi: 10.1097/01.scs.0000186454.07097.bf.
10. Yamaguchi Y, Yoshikawa K. Cutaneous wound healing: an update. J Dermatol 2001; 28(10):521–34. doi: 10.1111/j.1346-8138.2001.tb00025.x.
11. Gonzalez ACdO, Costa TF, Andrade ZdA, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. An Bras Dermatol 2016; 91(5):614–20. doi: 10.1590/abd1806-4841.20164741.
12. Weise K, Schäffer M. Behandlungsstrategien bei Wundheilungsstörungen. Unfallchirurg 2000; 103(2):100–9. doi: 10.1007/s001130050020.
13. Becker HD, Coerper S. Wunde, Wundheilung und Wundbehandlung. In: Siewert JR, Hrsg. Chirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. S. 73–85 (Springer-Lehrbuch).

14. S3-Leitlinie 091-001. Lokaltherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz [Stand: 08.08.2021]. Verfügbar unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/091-001l_S3_Lokaltherapie_chronischer_Wunden_2012-ungueltig.pdf.

15. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Nature 2008; 453(7193):314–21. doi: 10.1038/nature07039.

16. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. Human Pathology 1987; 18(3):234–9. Verfügbar unter: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0046817787800059.

17. Peters K, Kamp G, Berz A, Unger RE, Barth S, Salamon A et al. Changes in human endothelial cell energy metabolic capacities during in vitro cultivation. The role of "aerobic glycolysis" and proliferation. Cell Physiol Biochem 2009; 24(5-6):483–92. doi: 10.1159/000257490.

18. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 1973; 52(11):2745–56. doi: 10.1172/JCI107470.

19. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. J Investig Dermatol Symp Proc 2000; 5(1):40–6. doi: 10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x.

20. Mills SJ, Cowin AJ, Kaur P. Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process. Cells 2013; 2(3):621–34. doi: 10.3390/cells2030621.

21. Schmitz S. Der Experimentator: Neurowissenschaften. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2010. (Der Experimentator).

22. Twardzik T, Rapp UR. Somatische Stammzellen. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2002; 45(2):79–84. doi: 10.1007/s00103-001-0345-4.

23. Bartsch G, Frimberger D. Embryonale und adulte Stammzellen für Tissue Engineering in der Urologie. Urologe A 2004; 43(10):1229–36. doi: 10.1007/s00120-004-0691-6.

24. Tallone T, Realini C, Böhmler A, Kornfeld C, Vassalli G, Moccetti T et al. Adult human adipose tissue contains several types of multipotent cells. J Cardiovasc Transl Res 2011; 4(2):200–10. doi: 10.1007/s12265-011-9257-3.

25. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T. FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta2. Biochem Biophys Res Commun 2007; 359(1):108–14. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.067.

26. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. STEM CELLS 2019; 37(7):855–64. doi: 10.1002/stem.3016.

27. Sorice S, Rustad KC, Li AY, Gurtner GC. The Role of Stem Cell Therapeutics in Wound Healing: Current Understanding and Future Directions. Plast Reconstr Surg 2016; 138(3 Suppl):31S-41S. doi: 10.1097/PRS.0000000000002646.

28. Crisan M, Corselli M, Chen WCW, Péault B. Perivascular cells for regenerative medicine. J Cell Mol Med 2012; 16(12):2851–60. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01617.x.

29. Peters K, Salamon A, van Vlierberghe S, Rychly J, Kreutzer M, Neumann H-G et al. A New Approach for Adipose Tissue Regeneration Based on Human Mesenchymal Stem Cells in Contact to Hydrogels-an In Vitro Study. Adv. Eng. Mater. 2009; 11(10):B155-B161. doi: 10.1002/adem.200800379.

30. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest 2009; 119(6):1420–8. doi: 10.1172/JCI39104.

31. Michelson AD. Platelets (2nd ed.): Elsevier; 2007.

32. Andreas Zakrzewicz, Pschyrembel Redaktion. Thrombozyten; 2020 [Stand: 22.05.2021]. Verfügbar unter: https://www.pschyrembel.de/thrombozyten/K0MHX/doc/.

33. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Thromb Haemost 2004; 91(1):4–15. doi: 10.1160/TH03-07-0440.

34. Cho J-W, Kim S-A, Lee K-S. Platelet-rich plasma induces increased expression of G1 cell cycle regulators, type I collagen, and matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. Int J Mol Med 2012; 29(1):32–6. doi: 10.3892/ijmm.2011.803.

35. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen 2008; 16(5):585–601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.

36. Bixler SL, Goff AJ. The Role of Cytokines and Chemokines in Filovirus Infection. Viruses 2015; 7(10):5489–507. doi: 10.3390/v7102892.

37. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer; 2014. (Springer-Lehrbuch).

38. Vilcek J, Feldmann M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. Trends Pharmacol Sci 2004; 25(4):201–9. doi: 10.1016/j.tips.2004.02.011.

39. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev 2003; 83(3):835–70. doi: 10.1152/physrev.2003.83.3.835.

40. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. J Eur Acad Dermatol Venereol 2012; 26(7):812–20. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04415.x.

41. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. Physiol Rev 1990; 70(2):427–51. doi: 10.1152/physrev.1990.70.2.427.

42. Liang W, Chen X, Zhang S, Fang J, Chen M, Xu Y et al. Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines. Cell Mol Biol Lett 2021; 26(1):3. doi: 10.1186/s11658-020-00246-5.

43. Huang H, Zhang Q, Liu J, Hao H, Jiang C, Han W. Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) Accelerates Wound Healing in Hemorrhagic Shock Rats by Enhancing Angiogenesis and Attenuating Apoptosis. Med Sci Monit 2017; 23:2644–53. doi: 10.12659/MSM.904988.

44. Jimi S. G-CSF Administration Accelerates Cutaneous Wound Healing Accompanied With Increased Pro-Hyp Production In db/db Mice. CRDOA 2017; 4(2):1–9. doi: 10.15226/2378-1726/4/2/00155.

45. Touw IP, van de Geijn G-JM. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders. Front Biosci 2007; 12:800–15. doi: 10.2741/2103.

46. Ibelgaufts H. Lexikon Zytokine. München: Medikon; 1992.

47. Rumalla VK, Borah GL. Cytokines, growth factors, and plastic surgery. Plast Reconstr Surg 2001; 108(3):719–33. doi: 10.1097/00006534-200109010-00019.

48. Trebst C, Ransohoff RM, Windhagen A, Stangel M. Chemokine. Neue Therapieansätze für die Multiple Sklerose? Nervenarzt 2003; 74(10):850–7. doi: 10.1007/s00115-003-1571-9.

49. Jin T, Xu X, Hereld D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. Cytokine 2008; 44(1):1–8. doi: 10.1016/j.cyto.2008.06.017.

50. Strang H, Kaul A, Parikh U, Masri L, Saravanan S, Li H et al. Role of cytokines and chemokines in wound healing. In: Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes: Elsevier; 2020. S. 197–235.

51. Waugh DJJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. Clin Cancer Res 2008; 14(21):6735–41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4843.

52. Pascale MR de, Sommese L, Casamassimi A, Napoli C. Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. Transfus Med Rev 2015; 29(1):52–61. doi: 10.1016/j.tmrv.2014.11.001.

53. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. J. Cell. Biochem. 1991; 45(4):319–26. doi: 10.1002/jcb.240450403.

54. Bürger A, Wagner C, Viedt C, Reis B, Hug F, Hänsch GM. Fibronectin synthesis by human tubular epithelial cells in culture: effects of PDGF and TGF-beta on synthesis and splicing. Kidney Int 1998; 54(2):407–15. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00009.x.

55. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF-β family in wound healing, burns and scarring: a review. Int J Burns Trauma 2012; 2(1):18–28.

56. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors. The American Journal of Surgery 1993; 165(6):728–37. doi: 10.1016/S0002-9610(05)80797-4.

57. Assoian RK, Sporn MB. Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. J Cell Biol 1986; 102(4):1217–23. doi: 10.1083/jcb.102.4.1217.

58. Sinno H, Prakash S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. Plast Surg Int 2013; 2013:146764. doi: 10.1155/2013/146764.

59. Bartkova J, Grøn B, Dabelsteen E, Bartek J. Cell-cycle regulatory proteins in human wound healing. Archives of Oral Biology 2003; 48(2):125–32. doi: 10.1016/S0003-9969(02)00202-9.

60. Schafer KA. The cell cycle: a review. Vet Pathol 1998; 35(6):461–78. doi: 10.1177/030098589803500601.

61. Geley S, Hengst L. Zellzyklus. In: Hiddemann W, Bartram CR, Hrsg. Die Onkologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. S. 162–80.

62. Lüscher B, Nordheim A. Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose. In: Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K, Hrsg. Kompendium Internistische Onkologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. S. 6–17.

63. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. Annu Rev Physiol 1998; 60:601–17. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.601.

64. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. International Journal of Clinical Practice 2004; 58(12):1134–41. doi: 10.1111/j.1742-1241.2004.00284.x.

65. Vermeulen K, Berneman ZN, van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. Cell Prolif 2003; 36(3):165–75. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00267.x.

66. Martinez MM, Reif RD, Pappas D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. Anal. Methods 2010; 2(8):996. doi: 10.1039/c0ay00247j.

67. Papaliagkas V, Anogianaki A, Anogianakis G, Ilonidis G. The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals. Hippokratia 2007; 11(3):108–13.

68. Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M, Zeiher AM. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. FEBS Lett 1996; 399(1-2):71–4. doi: 10.1016/S0014-5793(96)01289-6.

69. Höffeler F. Die Maschinerie der Apoptose: Chronik eines angekündigten Todes. Biologie in unserer Zeit 2004; 34(1):16–23. doi: 10.1002/biuz.200410240.

70. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35(4):495–516. doi: 10.1080/01926230701320337.

71. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F-T, Zhou T-T, Liu B et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Prolif 2012; 45(6):487–98. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.

72. Desmoulière A, Badid C, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 1997; 29(1):19–30. doi: 10.1016/S1357-2725(96)00117-3.

73. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. Int J Low Extrem Wounds 2005; 4(3):138–44. doi: 10.1177/1534734605280018.

74. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. Biomaterials 2007; 28(31):4551–60. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.037.

75. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. Am J Sports Med 2009; 37(11):2259–72. doi: 10.1177/0363546509349921.

76. Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. Yale J Biol Med 2010; 83(1):1–9.

77. Fadadu PP, Mazzola AJ, Hunter CW, Davis TT. Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: a call for PRP standardization. Reg Anesth Pain Med 2019. doi: 10.1136/rapm-2018-100356.

78. Stevens HP. ACA-Technik: „stromal vascular fraction“, „platelet-rich plasma“ und Mikrofett zur körpereigenen Regeneration und Hautverjüngung. J Ästhet Chir 2019; 12(2):77–83. doi: 10.1007/s12631-018-0151-6.

79. Psychrembel Redaktion. Pschyrembel Online_ PLasma; 2019 [Stand: 21.03.2022]. Verfügbar unter: https://www.pschyrembel.de/plasma/A005G/doc/.

80. Gentile P, Scioli MG, Bielli A, Orlandi A, Cervelli V. Concise Review: The Use of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet Rich Plasma in Regenerative Plastic Surgery. Stem Cells 2017; 35(1):117–34. doi: 10.1002/stem.2498.

81. Baek SJ, Kang SK, Ra JC. In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. Exp Mol Med 2011; 43(10):596–603. doi: 10.3858/emm.2011.43.10.069.

82. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Cytotherapy 2013; 15(6):641–8. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006.

83. DPBS, (10x) w/o: Ca and Mg - DPBS - Gepufferte Salzlösungen - Reagenzien; 2020 [Stand: 19.12.2020]. Verfügbar unter: https://www.pan-biotech.de/dpbs-10x-w-o-ca-and-mg.html.

84. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. Stem Cells 2006; 24(2):376–85. doi: 10.1634/stemcells.2005-0234.

85. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. J Histochem Cytochem 2006; 54(4):385–95. doi: 10.1369/jhc.4A6514.2005.

86. Dynabeads® CD34 Positive Isolation Kit. Dynabeads® CD34 Positive Isolation Kit. invitrogen 2011.

87. chemometec. Viability and Cell Count nc-3000. chemometec.

88. Kieb M, Sander F, Prinz C, Adam S, Mau-Möller A, Bader R et al. Platelet-Rich Plasma Powder: A New Preparation Method for the Standardization of Growth Factor Concentrations. Am J Sports Med 2017; 45(4):954–60. doi: 10.1177/0363546516674475.

89. Portugal J, Waring MJ. Assignment of DNA binding sites for 4′,6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimide (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1988; 949(2):158–68. Verfügbar unter: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167478188900796.

90. Riss T. Cell Viability Assays 2016. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/.

91. Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola GC. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. J Histochem Cytochem 1998; 46(8):895–900. doi: 10.1177/002215549804600804.

92. BD Bioscoences. Propidium,Iodide,Staining,Solution,RUO - 556463 | BD Biosciences-US; 2020 [Stand: 19.12.2020]. Verfügbar unter: https://www.bdbiosciences.com/us/applications/research/apoptosis/buffers-and-ancillary-products/propidium-iodide-staining-solution/p/556463.

93. Ormerod MG. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. Journal of Immunological Methods 2002; 265(1-2):73–80. doi: 10.1016/S0022-1759(02)00071-6.

94. chemometec. Mitochondrial-Potential-Assay. Verfügbar unter: https://marketing.chemometec.com/acton/attachment/21287/f-00ee/1/-/-/-/-/994-3008-Mitochondrial-Potential-Assay.pdf.

95. chemometec. Annexin V Assay using the NucleoCounter® NC-3000™ System. Verfügbar unter: https://chemometec.com/wp-content/uploads/2015/04/994-3017-Annexin-V-Assay.pdf.

96. Bröker B, Schütt C, Fleischer B. Grundwissen Immunologie. 4. Auflage; 2019.

97. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001; 7(2):211–28. doi: 10.1089/107632701300062859.

98. Blande IS, Bassaneze V, Lavini-Ramos C, Fae KC, Kalil J, Miyakawa AA et al. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. Transfusion 2009; 49(12):2680–5. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02346.x.

99. Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y et al. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. PLoS One 2013; 8(2):e55082. doi: 10.1371/journal.pone.0055082.

100. Peters K, Unger RE, Stumpf S, Schäfer J, Tsaryk R, Hoffmann B et al. Cell type-specific aspects in biocompatibility testing: the intercellular contact in vitro as an indicator for endothelial cell compatibility. J Mater Sci Mater Med 2008; 19(4):1637–44. doi: 10.1007/s10856-007-3227-y.

101. Hahn O, Ingwersen L-C, Soliman A, Hamed M, Fuellen G, Wolfien M et al. TGF-ß1 Induces Changes in the Energy Metabolism of White Adipose Tissue-Derived Human Adult Mesenchymal Stem/Stromal Cells In Vitro. Metabolites 2020; 10(2). doi: 10.3390/metabo10020059.

102. Hahn O, Kieb M, Jonitz-Heincke A, Bader R, Peters K, Tischer T. Dose-Dependent Effects of Platelet-Rich Plasma Powder on Chondrocytes In Vitro. Am J Sports Med 2020; 48(7):1727–34. doi: 10.1177/0363546520911035.

103. Bosch G, van Schie HTM, Groot MW de, Cadby JA, van de Lest CHA, Barneveld A et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. J Orthop Res 2010; 28(2):211–7. doi: 10.1002/jor.20980.

104. Clark DA, Coker R. Molecules in focus Transforming growth factor-beta (TGF-β). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 1998; 30(3):293–8. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00128-3.

105. Sintich SM, Lamm ML, Sensibar JA, Lee C. Transforming growth factor-beta1-induced proliferation of the prostate cancer cell line, TSU-Pr1: the role of platelet-derived growth factor. Endocrinology 1999; 140(8):3411–5. doi: 10.1210/endo.140.8.6921.

106. Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. TGF-β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. Cell 1990; 63(3):515–24. doi: 10.1016/0092-8674(90)90448-N.

107. Fukamizu H, Grinnell F. Spatial organization of extracellular matrix and fibroblast activity: Effects of serum, transforming growth factor β, and fibronectin. Exp Cell Res 1990; 190(2):276–82. doi: 10.1016/0014-4827(90)90197-I.

108. Bretland AJ, Reid SV, Chapple CR, Eaton CL. Role of endogenous transforming growth factor beta (TGFbeta)1 in prostatic stromal cells. Prostate 2001; 48(4):297–304. doi: 10.1002/pros.1110.

109. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. Science 1986; 233(4763):532–4. doi: 10.1126/science.3487831.

110. Iruela-Arispe ML, Sage EH. Endothelial cells exhibiting angiogenesis in vitro proliferate in response to TGF-beta 1. J. Cell. Biochem. 1993; 52(4):414–30. doi: 10.1002/jcb.240520406.

111. Lawrence W, Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. Clinics in Dermatology 1994; 12(1):157–69. doi: 10.1016/0738-081x(94)90266-6.

112. Kassem M, Kveiborg M, Eriksen EF. Production and action of transforming growth factor-beta in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitriol. Eur J Clin Invest 2000; 30(5):429–37. doi: 10.1046/j.1365-2362.2000.00645.x.

113. Cassiede P, Dennis JE, Ma F, Caplan AI. Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. J Bone Miner Res 1996; 11(9):1264–73. doi: 10.1002/jbmr.5650110911.

114. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP et al. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. Blood 1998; 91(10):3527–61.

115. Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: problems and prospects. Cell Regul 1990; 1(12):875–82. doi: 10.1091/mbc.1.12.875.

116. Tsukada T, Eguchi K, Migita K, Kawabe Y, Kawakami A, Matsuoka N et al. Transforming growth factor beta 1 induces apoptotic cell death in cultured human umbilical vein endothelial cells with down-regulated expression of bcl-2. Biochem Biophys Res Commun 1995; 210(3):1076–82. doi: 10.1006/bbrc.1995.1766.

117. Kilian O, Flesch I, Wenisch S, Taborski B, Jork A, Schnettler R et al. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. Eur J Med Res 2004; 9(7):337–44.

118. Harris DL, Joyce NC. Transforming growth factor-beta suppresses proliferation of rabbit corneal endothelial cells in vitro. J Interferon Cytokine Res 1999; 19(4):327–34. doi: 10.1089/107999099314027.

119. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. J Cell Physiol 2009; 219(2):449–58. doi: 10.1002/jcp.21706.

120. Schuster N, Krieglstein K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. Cell Tissue Res 2002; 307(1):1–14. doi: 10.1007/s00441-001-0479-6.

121. Tischer T, Bode G, Buhs M, Marquass B, Nehrer S, Vogt S et al. Platelet-rich plasma (PRP) as therapy for cartilage, tendon and muscle damage - German working group position statement. J Exp Orthop 2020; 7(1):64. doi: 10.1186/s40634-020-00282-2.

122. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. World J Stem Cells 2014; 6(5):552–70. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.552.

123. Nilsen EM, Johansen FE, Jahnsen FL, Lundin KE, Scholz T, Brandtzaeg P et al. Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. Gut 1998; 42(5):635–42. Verfügbar unter: https://gut.bmj.com/content/42/5/635.short.

124. Bhattacharya P, Budnick I, Singh M, Thiruppathi M, Alharshawi K, Elshabrawy H et al. Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy. J Interferon Cytokine Res 2015; 35(8):585–99. doi: 10.1089/jir.2014.0149.

125. Chen CC, Manning AM. TGF-beta 1, IL-10 and IL-4 differentially modulate the cytokine-induced expression of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells. Cytokine 1996; 8(1):58–65. doi: 10.1006/cyto.1995.0008.

126. Park CW, Kim K-S, Bae S, Son HK, Myung P-K, Hong HJ et al. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. Int J Stem Cells 2009; 2(1):59–68. doi: 10.15283/ijsc.2009.2.1.59.

127. Newman RE, Yoo D, Leroux MA, Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. Inflamm Allergy Drug Targets 2009; 8(2):110–23. doi: 10.2174/187152809788462635.

128. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. Cell Death Differ 2014; 21(2):216–25. doi: 10.1038/cdd.2013.158.

129. Dembic Z. Cytokines of the Immune System. In: The Cytokines of the Immune System: Elsevier; 2015. S. 143–239.

VIII. ANHANG

Tabelle 17: Spenderdetails adMSC

Spender	Geschlecht	Alter	Datum eingefroren	Probenentnahme
1	weiblich	47 J.	14.03.2015	Bauch
2	männlich	49 J.	13.12.2015	Bauch
3	männlich	37 J.	02.01.2016	Bauch
4	weiblich	32 J.	12.02.2018	Bauch
5	weiblich	41 J.	19.02.2018	Bauch
6	divers	28 J.	21.03.2018	Bauch /Hüfte

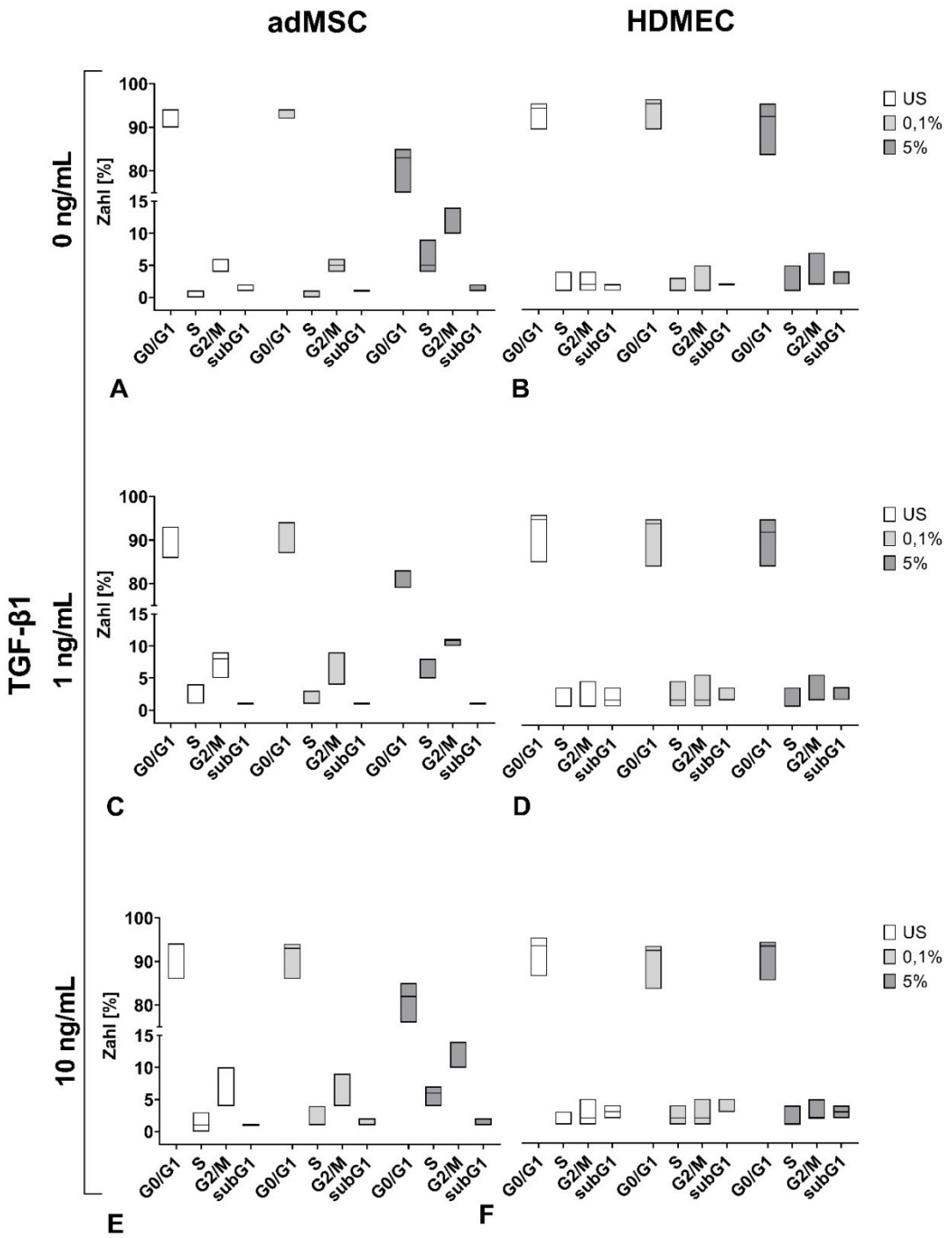

Abb. 22: Zellzyklusanalyse mittels Two-Step-Cell-Cycle Analysis Assay (adMSC: graue Boxplots, HDMEC: weiße Boxplots; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten) (n = 3; Deskriptive Statistik)

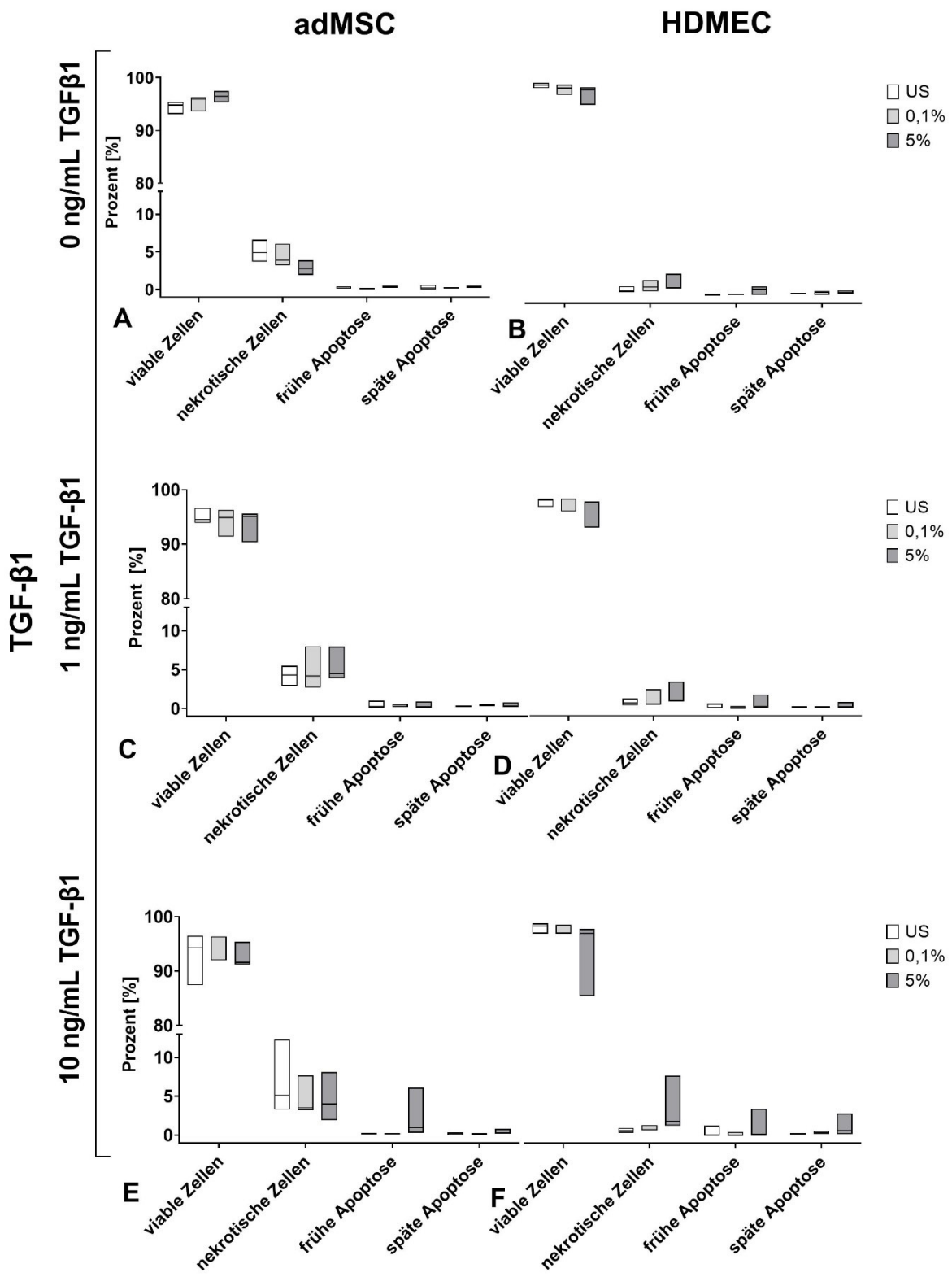

Abb. 23: Nachweis von viablen, nekrotischen und apoptotischen Zellen (frühe und späte Apoptose) nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Thrombozyten-stämmigen Wachstumsfaktoren bzw. TGF-β1. (adMSC: graue Boxplots, HDMEC: weiße Boxplots; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten dargestellt) (n = 3; Deskriptive Statistik)

Tabelle 18: Lösliche Analyten, die mit dem Multiplex-Assay detektiert wurden (nn = nicht nachweisbar)

Analyt [pg/mL]	Stimulation		Zelltyp	
	TGF-β1 (ng/ml)	T-WF (%)	adMSC	HDMEC
EGF	0	0	nn	69,43
	0	0,1	nn	83,76
	0	5	nn	283,5
	10	0	nn	71,66
	10	0,1	nn	53,11
	10	5	nn	197,66
G-CSF	0	0	42,5	89,6
	0	0,1	59,6	90,7
	0	5	70,4	75,1
	10	0	62,0	78,5
	10	0,1	64,5	58,3
	10	5	99,1	85,2
GM-CSF	0	0	6,36	16,9
	0	0,1	5,44	13,3
	0	5	7,27	12,3
	10	0	8,55	18,4
	10	0,1	7,14	16,9
	10	5	8,55	11,3
IFN-α2	0	0	5,10	nn
	0	0,1	5,10	nn
	0	5	7,12	nn
	10	0	15,4	nn
	10	0,1	13,9	nn
	10	5	9,85	nn
IL-10	0	0	8,75	nn
	0	0,1	5,93	nn
	0	5	10,8	nn
	10	0	11,7	nn
	10	0,1	11,7	nn
	10	5	13,0	nn
IL-12p70	0	0	5,22	nn
	0	0,1	6,15	nn
	0	5	8,33	nn
	10	0	9,56	nn
	10	0,1	10,4	nn
	10	5	7,05	nn
IL-13	0	0	3,62	6,08
	0	0,1	4,63	5,28
	0	5	6,08	4,63
	10	0	5,60	5,28
	10	0,1	4,80	5,92
	10	5	6,86	4,63

Analyt	Stimulation		Zelltyp	
[pg/mL]	TGF-β1 (ng/ml)	T-WF (%)	adMSC	HDMEC
IL-15	0	0	nn	6,20
	0	0,1	nn	4,78
	0	5	nn	4,03
	10	0	nn	5,50
	10	0,1	nn	7,85
	10	5	nn	6,20
IL-1α	0	0	4,33	3,05
	0	0,1	2,56	4,21
	0	5	3,98	5,17
	10	0	4,89	3,17
	10	0,1	2,90	3,75
	10	5	3,05	2,81
IL-1β	0	0	4,29	3,20
	0	0,1	5,96	3,28
	0	5	6,17	3,43
	10	0	5,20	3,28
	10	0,1	5,89	3,93
	10	5	6,98	3,06
IL-2	0	0	nn	3,27
	0	0,1	nn	2,97
	0	5	nn	2,44
	10	0	nn	3,05
	10	0,1	nn	4,46
	10	5	nn	2,51
IL-6	0	0	1071	39,6
	0	0,1	1304	39,4
	0	5	2288	27,7
	10	0	2999	43,0
	10	0,1	2988	47,1
	10	5	3126	28,2
IL-8	0	0	135,7	526,1
	0	0,1	84,36	486,4
	0	5	265,3	373,6
	10	0	274,0	387,9
	10	0,1	144,1	344,6
	10	5	363,0	442,9
IP-10	0	0	nn	89,3
	0	0,1	nn	78,1
	0	5	nn	34,7
	10	0	nn	56,6
	10	0,1	nn	43,4
	10	5	nn	45,2
MCP-1	0	0	1442	nn
	0	0,1	1530	nn
	0	5	2534	nn
	10	0	3104	nn
	10	0,1	2049	nn
	10	5	3058	nn

Analyt	Stimulation		Zelltyp	
[pg/mL]	TGF-β1 (ng/ml)	T-WF (%)	adMSC	HDMEC
VEGF	0	0	101	nn
	0	0,1	113	nn
	0	5	445	nn
	10	0	389	nn
	10	0,1	370	nn
	10	5	622	nn
Eotaxin	0	0	47,19	11,16
	0	0,1	18,70	18,70
	0	5	36,36	13,50
	10	0	38,61	nn
	10	0,1	38,24	15,71
	10	5	45,97	10,42
IFN-γ	0	0	9,08	nn
	0	0,1	2,16	2,54
	0	5	2,16	nn
	10	0	4,00	nn
	10	0,1	3,11	3,95
	10	5	4,08	nn
IL-3	0	0	7,67	nn
	0	0,1	nn	2,35
	0	5	2,55	nn
	10	0	nn	nn
	10	0,1	nn	5,03
	10	5	2,39	2,42
IL-12p40	0	0	9,88	12,1
	0	0,1	nn	10,8
	0	5	nn	nn
	10	0	11,3	15,7
	10	0,1	10,4	13,4
	10	5	9,88	12,1
IL-17A	0	0	2,91	nn
	0	0,1	nn	nn
	0	5	nn	nn
	10	0	nn	nn
	10	0,1	nn	4,07
	10	5	nn	nn
IL-1RA	0	0	9,12	16,1
	0	0,1	nn	29,4
	0	5	nn	nn
	10	0	15,6	nn
	10	0,1	nn	67,1
	10	5	11,4	nn
IL-4	0	0	nn	nn
	0	0,1	nn	nn
	0	5	10,1	nn
	10	0	2,52	nn
	10	0,1	nn	nn
	10	5	nn	3,35

Analyt	Stimulation		Zelltyp	
[pg/mL]	TGF-β1 (ng/ml)	T-WF (%)	adMSC	HDMEC
IL-5	0	0	9,12	16,1
	0	0,1	nn	29,4
	0	5	nn	nn
	10	0	15,6	nn
	10	0,1	nn	67,1
	10	5	11,4	nn
IL-7	0	0	10,58	17,7
	0	0,1	nn	16,3
	0	5	13,46	nn
	10	0	14,13	15,0
	10	0,1	15,62	19,8
	10	5	15,61	12,2
MIP-1α	0	0	30,5	nn
	0	0,1	nn	nn
	0	5	nn	nn
	10	0	nn	nn
	10	0,1	nn	nn
	10	5	11,7	nn
MIP-1β	0	0	8,85	30,5
	0	0,1	nn	nn
	0	5	nn	nn
	10	0	nn	nn
	10	0,1	nn	nn
	10	5	nn	11,7
TNF-α	0	0	nn	nn
	0	0,1	nn	nn
	0	5	nn	nn
	10	0	nn	nn
	10	0,1	nn	nn
	10	5	nn	nn
TNF-β	0	0	8,96	nn
	0	0,1	nn	nn
	0	5	nn	nn
	10	0	nn	nn
	10	0,1	1,97	3,74
	10	5	1,97	nn

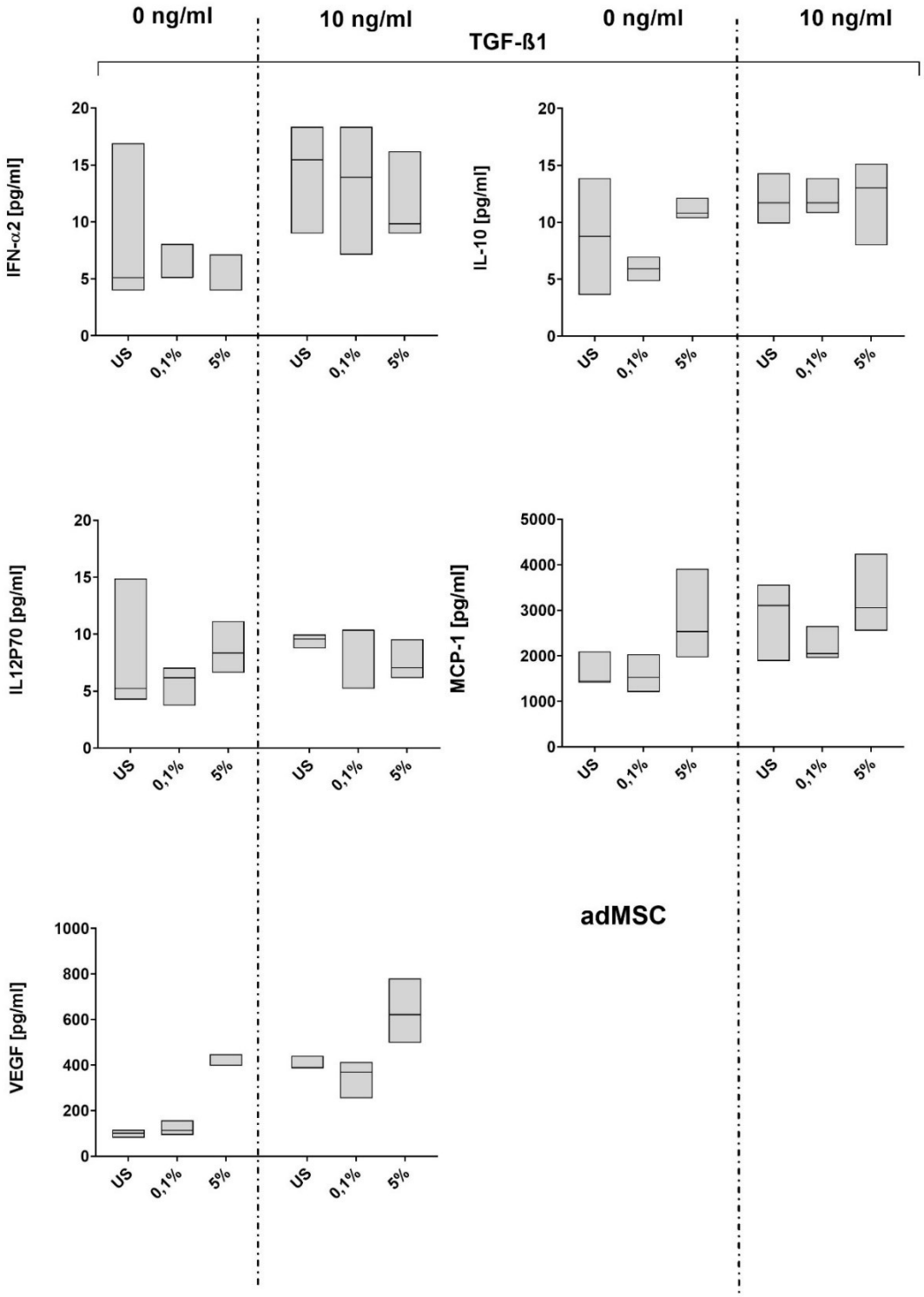

Abb. 24: Nachweis von Zytokinen und Chemokinen nach 48-stündiger Stimulation im Zellkulturüberstand, die nur bei den adMSC aufgefunden wurden. Dargestellt ist die Konzentration in [pg/mL] ausgewählter Zytokine und Chemokine nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen sowohl der T-WF als auch TGF-β1. (adMSC: graue Boxplots, HDMEC: weiße Boxplots; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten) (n = 3)

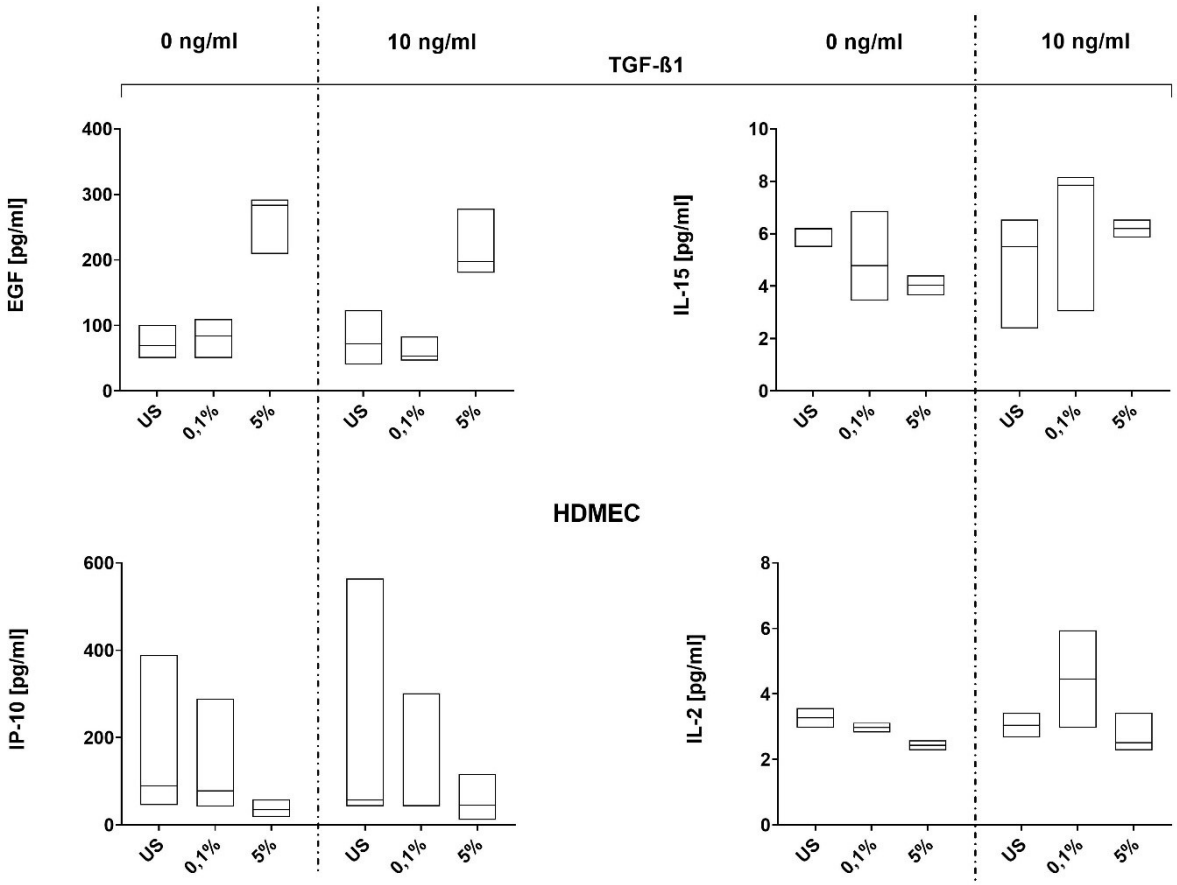

Abb. 25: Nachweis von Zytokinen und Chemokinen nach 48-stündiger Stimulation im Zellkulturüberstand, die nur bei den HDMEC aufgefunden wurden. Dargestellt ist die Konzentration in [pg/mL] ausgewählter Zytokine und Chemokine nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen sowohl der T-WF als auch TGF-β1. (adMSC: graue Boxplots, HDMEC: weiße Boxplots; mit Median-, Interquartil- und Minimum-/Maximumwerten) (n = 3)

IX. THESEN

Auf Grundlage der Untersuchungen dieser Arbeit zu Effekten T-WF auf humane Primärzellen *in vitro* konnten folgende Thesen aufgestellt werden:

1. T-WF und TGF-β1 führen zu Morphologieveränderungen bei adMSC bzw. HDMEC.
2. T-WF und TGF-β1 wirken nicht toxisch auf adMSC bzw. HDMEC.
3. Die Zugabe von T-WF und TGF-β1 beeinflusst die Viabilität der adMSC bzw. HDMEC.
4. Die metabolische Aktivität wird sowohl durch Zugabe von T-WF und TGF-β1 bei adMSC und HDMEC verändert.
5. T-WF und TGF-β1 beeinflussen die Proliferation der adMSC bzw. HDMEC.
6. Der Zellzyklus zeigt sowohl durch die Zugabe von T-WF als auch TGF-β1 Veränderungen bei adMSC und HDMEC.
7. Ein Großteil der adMSC und der HDMEC zeigen keine Anzeichen für Apoptose.
8. Ein Großteil der adMSC und HDMEC zeigen keine Anzeichen für eine Nekrose.
9. Die Anwendung von T-WF und TGF-β1 ist sowohl bei adMSC als auch HDMEC sinnvoll.
10. Die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen wird durch die Zugabe von T-WF und TGF-β1 beeinflusst.
11. Es gibt Zytokine und Chemokine, die nur von einem Zelltyp sezerniert werden.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht und in meinem Arbeiten habe ich nach guter wissenschaftlicher Praxis gehandelt.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock _____ _____

(Abgabedatum) (Vollständige Unterschrift)

Danksagung

Hiermit danke ich meinen Eltern, meinem Verlobten Philipp für die durchgängige Unterstützung bei allen Belangen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuerinnen Olga Hahn und Kirsten Peters.