

Einfluss von Wundflüssigkeit unter Okklusivverbänden auf die Wundheilung von
Spalthautentnahmestellen bei Patienten mit Diabetes mellitus

Anna Sophia Wiesmeier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin (Dr.med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hans-Günther Machens

2. Priv.-Doz. Dr. Thomas Volz

Die Dissertation wurde am 05.07.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.11.2021 angenommen.

Inhalt

1	Zusammenfassung	4
2	Abstract	6
3	Abkürzungsverzeichnis	8
4	Einleitung.....	9
4.1	Physiologie der Wundheilung	9
4.1.1	Exsudations- und Entzündungsphase	11
4.1.2	Granulations- und Proliferationsphase	11
4.1.3	Epithelialisierungs- und Remodellingphase	12
4.2	Diabetes mellitus	14
4.2.1	Pathophysiologische Grundlagen des Diabetes mellitus	15
4.2.2	Diagnostik und Therapie des Diabetes mellitus Typ II nach den nationalen Versorgungsleitlinien	17
4.2.3	Besonderheiten in der Wundheilung bei Patienten mit Diabetes mellitus	18
4.3	Die Spalthauttransplantation	22
4.3.1	Entnahmetechniken	22
4.3.2	Einsatz- und Therapiemöglichkeiten	24
4.4	Nachbehandlung von Spalthautentnahmestellen.....	25
4.4.1	Der trockene bzw. einfache Verband	25
4.4.2	Der Semi-/Okklusivverband	26
4.5	Zielsetzung und Hypothese der Studie.....	28
5	Methodik und Materialien	30
5.1	Studiendesign und Ablauf	30
5.2	Aufarbeitung der Proben	31
5.3	Vorbereitung der Zelllinien und Proben	31
5.4	Testverfahren	31
5.4.1	Scratch-Assay	31
5.4.2	Tube-Formation-Assay.....	34
5.4.3	Alamarblue-Assay.....	36
5.4.4	LDH-Messung.....	37
5.4.5	Zellzählung im Casy Counter.....	38
5.5	Statistische Auswertung.....	38
6	Resultate.....	40
6.1	Wundsekret- und Blutproben.....	40
6.2	Einfluss von Wundflüssigkeit von Diabetikern und Nicht-Diabetikern auf Fibroblasten (HS-27).....	40

6.2.1	Einflüsse auf die Zellmigration (Scratch-Assay)	40
6.2.2	Einflüsse auf den Zellmetabolismus (Alamarblue-Assay)	43
6.2.3	Einflüsse auf die Zytotoxizität (LDH-Assay)	43
6.2.4	Einflüsse auf die Zellzahl und Zellviabilität (Casy-Counter)	44
6.3	Einfluss von Wundflüssigkeit von Diabetikern und Nicht-Diabetikern auf Endothelzellen (HUVEC) und die Neoangiogenese	45
6.4	Zusammenfassung der Einflüsse von diabetischer und nicht-diabetischer Wundflüssigkeit auf Fibroblasten und Endothelzellen	50
7	Diskussion	52
7.1	Diskussion von Material und Methoden	52
7.2	Potentieller Einfluss der Wundflüssigkeit auf Fibroblasten diabetischer Wunden ...	54
7.2.1	Einfluss auf die Fibroblastenmigration im Scratch-Assay	55
7.2.2	Einfluss auf die Fibroblastenviabilität und den Zellmetabolismus	56
7.2.3	Einfluss auf die Zytotoxizität	57
7.3	Potentieller Einfluss der Wundflüssigkeit auf Endothelzellen und die Neoangiogenese diabetischer Wunden	57
7.4	Ausblick	59
8	Schlussfolgerungen	61
9	Literaturverzeichnis	62
10	Abbildungsverzeichnis	68
11	Danksagung	70

1 Zusammenfassung

Einleitung

Die Behandlung und Heilung von verschiedensten Wunden stellen nahezu alle medizinischen Fachbereiche vor vielfältige Probleme. Die Wahl des richtigen Verbandes kann hier bereits entscheidend für ein gutes Ergebnis sein und die Kaskade der Wundheilung - bestehend aus Entzündungsphase, Reepithelialisierungsphase und Remodellingphase - positiv beeinflussen. So zeigen okklusiv behandelte Wunden durch die Erschaffung eines feuchten Milieus und die dadurch beschleunigte Reepithelialisierung, Neovaskularisierung, Zellmigration sowie durch geringere Schmerzskalen, Infektionsraten und Narbenbildung deutlich bessere Ergebnisse im Vergleich zu trockenen Wundauflagen.

Diabetische Wunden hingegen weisen oft durch den veränderten Zellmetabolismus eine prolongierte Heilung auf und führen so zu zahlreichen Problemen in der Therapie. Untersucht wurde in dieser Studie deshalb der Einfluss des Okklusivverbandes und der Wundsekrete auf das Zellverhalten diabetischer Wunden in vitro, um eventuelle Unterschiede zur Wundheilung bei Patienten ohne Wundheilungsstörung durch den diabetischen Stoffwechsel aufzudecken.

Material und Methodik

22 Spalthautentnahmestellen (SHE), davon 11 von Patienten mit der Diagnose Diabetes mellitus Typ II wurden noch intraoperativ mit Okklusivverbänden versorgt. SHE bieten hier die ideale Grundlage, da die entstehenden Hebestellen sehr gut vergleichbare, iatrogene und unter sterilen Bedingungen zugefügte Wunden mit ähnlichen Eigenschaften darstellen.

Am 3. post-operativen Tag wurde mithilfe einer Kanüle Wundflüssigkeit beim Verbandswechsel gewonnen. Parallel erfolgte die Entnahme von Blutserum als Kontrolle bei jedem Patienten. Der Einfluss der Wundflüssigkeit auf Fibroblasten wurde bezüglich der metabolischen Aktivität (Alamarblue Assay, Casy Counter), des Zellstressses (LDH Assay) und der Migration (Scratch Assay) untersucht. Die

Angiogenese von Endothelzellen (HUVEC) wurde mittels Tube Formation Assay analysiert.

Ergebnisse

Beim Vergleich der in vitro Wundheilung von diabetischen und nicht-diabetischen Wunden unter OV ließen sich einige Trends und signifikante Unterschiede finden. Den am stärksten ausgeprägten Effekt zeigt die Zellmigration im Scratch Assay. Die Fibroblasten, die mit den Wundsekreten der Diabetiker inkubiert wurden, wiesen eine sehr stark erhöhte Migrationsrate auf. Bei beiden Gruppen zeigte sich hier auch allgemein der positive Effekt des Wundsekrets im Vergleich zum reinen Blutserum in Form von beschleunigter Zellmigration. Der Angiogenese-Assays zeigte, dass die Endothelzellen unter dem Einfluss des Wundsekrets der Diabetikergruppe signifikant längere Schlaufen bildeten und sich ein Trend zu vermehrter Schleifenbildung feststellen ließ. Auch hier ist der positive Effekt des Wundsekrets im Vergleich zum Blutserum allgemein durch die signifikant erhöhte mittlere Schlaufenlänge zu erkennen. Ein weiterer Trend zeigt sich im Zellmetabolismus der Fibroblasten, der unter Einfluss des diabetischen Wundsekrets höher war als bei der Kontrollgruppe. Weitere Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung

Die bereits mehrfach gezeigten positiven Effekte der Wundflüssigkeit auf die Wundheilung konnten in unserer Studie ebenfalls aufgezeigt werden. Auch bei diabetischen Wunden können regenerative Effekte gezeigt und die Wundheilung beschleunigt werden. Unsere Studie zeigt einen Effekt diabetischer Wundsekrete unter Okklusivverbänden auf die Neoangiogenese durch Endothelzellen sowie die Migration und Proliferation von Fibroblasten. Beide Zelllinien stellen wesentliche Modulatoren der Wund- und Narbenheilung dar und sind v.a. essenziell in der proliferativen Phase der Wundheilung.

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden unter dem Titel "Wound fluid under occlusive dressings from diabetic patients show an increased angiogenic response and fibroblast migration" im Journal of Tissue Viability zur Veröffentlichung eingereicht.

2 Abstract

Introduction

Metabolic diseases like diabetes mellitus often show prolonged healing, chronic wounds and wound infections. Most important is the decision regarding the right treatment.

Occlusive dressings are known to support wound closure by creating a moist environment which supports collagen synthesis, epithelialization and angiogenesis. Therefore, we aimed to assess the effect of occlusion on diabetic wound fluid on the cellular level regarding fibroblast activity and angiogenetic response.

This in vitro analysis aimed to assess the effects of occlusion on diabetic wounds on the cellular level focusing on fibroblast activity and angiogenetic response.

Methods and Material

22 wound fluid samples of split skin donor site wounds were harvested (11 diabetics, 11 control) after treating them with occlusive dressings intraoperatively

Those donor sites offer ideal wounds for clinical trials. The patients wounds were taken in the same manner in near identical size which provides good conditions for a comparison.

A blood serum sample was taken as well to have a reference. Both wound fluids and blood samples were analyzed concerning their influence on fibroblasts (scratch assay, easy counter, alamarblue assay, LDH assay) and endothelial cells (tube formation assay).

Results

The study shows that there are indeed some significant differences between the diabetic and the control group concerning the in vitro wound healing capacity.

Fibroblasts were tested regarding their migration rate (scratch assay) and presented a more rapid growth under the influence of diabetic wound fluid.

The tube formation assay showed as well longer tubes and more loops when the endothelial cells were treated with diabetic wound fluid compared to the control.

Furthermore, the cell metabolism in the LDH assay was higher in the diabetes group.

Almost every test could demonstrate the positive effect of wound fluid compared to the blood serum on in vitro wound healing in general.

Conclusion

Occlusive dressings seem to stimulate regenerative effects in diabetic wounds. Our study shows the influence of wound fluid under occlusive dressings from diabetic patients on angiogenesis, migration and proliferation of fibroblasts, which are essential modulators of wound healing and scar modulation.

It could be shown that there are indeed some significant differences between the diabetic and the control group concerning the in vitro wound healing ability. Fibroblasts tested regarding their migration rate (scratch assay) are presenting a more rapid growth under the influence of diabetic wound fluid. The tube formation assay showed longer tubes and more loops when the endothelial cells were treated with diabetic wound fluid. Furthermore, the cell metabolism in the LDH assay was higher in the diabetic group. Almost every test could demonstrate the positive effect of wound fluid compared to blood serum on in vitro wound healing in general.

Our study reflects the already known positive influences of a moist environment on wound healing. It also shows a positive effect on diabetic wounds. Especially cell migration and angiogenesis seem to profit from occlusive dressings. This shows a positive impact on the two most important cell types in wound healing: fibroblasts and endothelial cells.

3 Abkürzungsverzeichnis

DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECGM	Endothelial Cell Growth Media
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EPC	Endothelial Progenitor Cells
EPO	Erythropoetin
FCS	Fetal Calf Serum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor
HbA1c	Glykohämoglobin
HIF	Hypoxia Induced Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
LDH	Laktatdehydrogenase
mi-/RNA	mikro/ Ribonukleinsäure
NAD/NADH	Nikotinamiddinukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
oGTT	oraler Glucosetoleranztest
OV	Okklusivverband
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEDF	Pigmental Epithelial Derived Growth Factor
RPMI	Zellkulturmedium des Roswell Park Memorial Institute
S	(Blut-) Serum
SHE	Spalthautentnahmestelle
SHT	Spalthauttransplantation
SOV	Semi-Okklusivverband
TNF α	Tumornekrosefaktor α
V1/2	Versuchsreihe 1 und 2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WS	Wundsekret

4 Einleitung

Die menschliche Wundheilung besteht aus einer durch Verletzungen ausgelöste Kaskade aufeinander abgestimmter Schritte. Physiologischerweise laufen diese in einer bestimmten Reihenfolge ab und führen schlussendlich zur Wiederherstellung der Integrität und Funktion der Haut. Von medizinischer Seite kann diese Kaskade durch die richtige Wundversorgung unterstützt werden. Hierbei gilt es abzuwägen, welche Therapieform, ob operativ oder konservativ, die Richtige ist. Abhängig ist diese Entscheidung zum einen von der Art der Verletzung, zum anderen aber auch von individuellen Begleiterkrankungen des jeweiligen Patienten, die teils einen starken Einfluss auf die Wundheilung haben können. Erschwerte Heilungsbedingungen finden sich beispielsweise bei der Diagnose Diabetes mellitus.

In dieser Arbeit soll auf die Effektivität der konservativen Wundversorgung mittels Okklusivverbänden (OV) als eine der möglichen Therapieformen eingegangen werden. Die Überlegenheit gegenüber trockenen Verbänden wurde bereits in vielen Studien nachgewiesen. Genauer wird nun untersucht, ob es einen Unterschied in den Resultaten bei ansonsten gesunden Patienten und Patienten mit der Nebendiagnose Diabetes mellitus gibt.

Als Grundlage für das weitere Verständnis der Wundtherapie und die dadurch mögliche Beeinflussung des Heilungserfolgs wird zunächst auf die Physiologie der Wundheilung sowie auf die Erkrankung Diabetes mellitus und die damit einhergehenden Komplikationen in der Wundheilung eingegangen.

4.1 Physiologie der Wundheilung

Der physiologische Ablauf der Wundheilung besteht aus einer fein abgestimmten Kaskade bestehend aus Hämostase, Entzündung, Debridement, Proliferation, Epithelialisierung und Wiederaufbau der Hautbarriere durch Narbenbildung (Martin 2002). Die Abfolge dieser Schritte kann in drei Phasen eingeteilt werden. Diese sind allerdings nicht strikt voneinander getrennt, sondern gehen ineinander über und überschneiden sich (Witte and Barbul 1997).

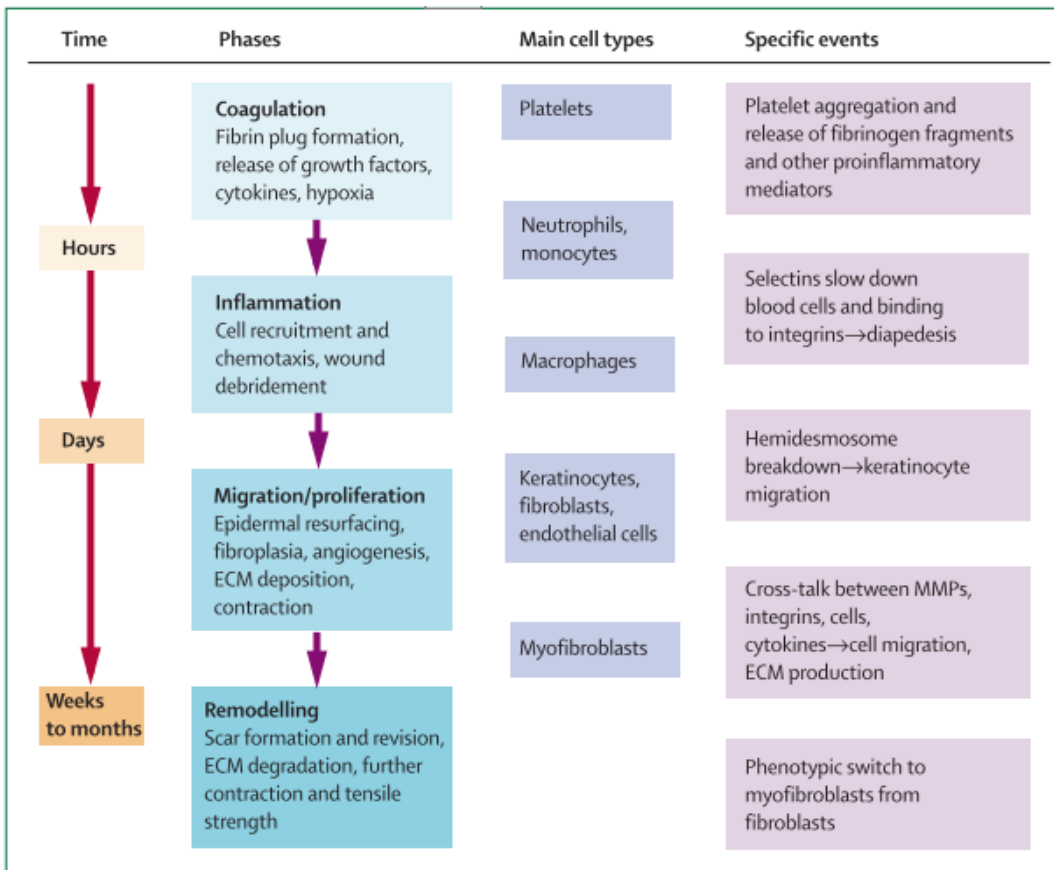


Figure 1: Phases of wound healing, major types of cells involved in each phase, and selected specific events

Abbildung 1 (Falanga 2005) Überblick über den Ablauf der Physiologischen Wundheilung, ihre Phasen und die daran beteiligten Faktoren

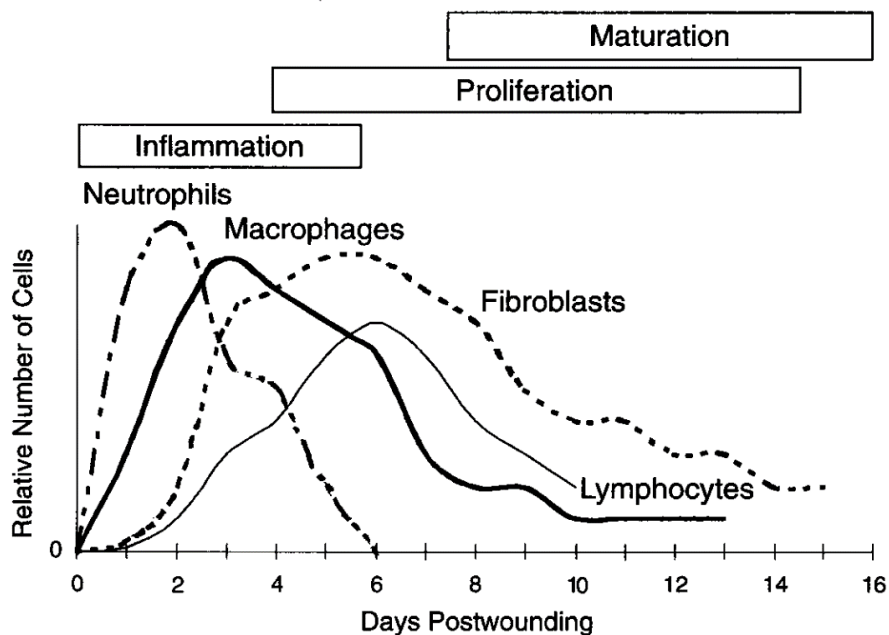


Abbildung 2 (Witte and Barbul 1997) Darstellung der an der Wundheilung hauptsächlich beteiligten Zellen.

Die Abbildungen 1 und 2 geben eine Übersicht über die in jeder Phase ablaufenden Schritte und die darin vorherrschenden Zellen. Im Folgenden werden die einzelnen Abläufe und die Aufgaben der jeweiligen Zelllinien näher erläutert.

4.1.1 Exsudations- und Entzündungsphase

Die erste Phase beginnt unmittelbar nach Verletzung der Haut. Dabei kommt es initial zu einer Aktivierung der Gerinnungs- und Entzündungskaskade. Somit kommt es zur Hämostase und Reaktion des Immunsystems (Gurtner 2008). Durch die Schädigung des Gefäßendothels kommt es zur Plättchenaggregation und zur weiteren Abfolge der Gerinnungskaskade. Diese führt zur Bildung eines Fibrin-Aggregats, wodurch die sekundäre Hämostase abgeschlossen wird (Witte and Barbul 1997). Die Inflammation des Gewebes führt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Diese sorgt für eine erleichterte Ausschüttung chemotaktischer Stoffe und die darauffolgende Zellmigration in die Wundregion (Witte and Barbul 1997). Die ersten Zellen, die durch diese Stimulierung angelockt werden, sind neutrophile Granulozyten. Sie sind primär in den ersten beiden Tagen nach Verletzung nachweisbar und verhindern vor allem eine bakterielle Infektion der Wunde. In den folgenden Tagen findet auch eine Migration von Makrophagen und Monozyten statt, die mit der Phagozytose des toten Gewebes beginnen (Walmsley 2015). Durch die Aktivierung der Makrophagen wird parallel die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verstärkt. Durch diese kommt es wiederum zu einer Anregung der Zellaktivierung, Angiogenese und Induktion der Matrixsynthese (Witte and Barbul 1997). Parallel beginnt durch vermehrte Exsudation die Selbstreinigung der Wunde. Proteasen und polymorph kernige Zellen sorgen für die Auflösung und Abtragung toten Gewebes (Vogt 2011).

4.1.2 Granulations- und Proliferationsphase

In dieser oben beschriebenen initialen Phase werden die Grundbausteine für die nach wenigen Tagen beginnende zweite Stufe gelegt. Hier steht die Gewebsneubildung durch Granulation und Proliferation im Vordergrund. Fibroblasten und Endothelzellen migrieren aus dem umliegenden Gewebe und bestimmen in dieser Phase das Zellbild

(Falanga 2005). Stimuliert werden sie durch die vorher von Makrophagen freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren (Witte and Barbul 1997). An der Wundoberfläche lässt sich die Proliferation von Keratinozyten beobachten. Durch deren Differenzierung an der Wundoberfläche wird die Barrierefunktion der Epidermis wiederhergestellt. Das in der ersten Phase gebildete Fibringerüst dient zunächst noch als Leitstruktur für einwandernde Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. Im Verlauf wird es durch Makrophagen abgebaut und durch Fibroblasten ersetzt (Gurtner 2008). Die steigende Zellzahl, das Bindegewebe und einsproßende Gefäße sorgen für die Bildung von Granulationsgewebe. An den Wundrändern wird nekrotisches Gewebe weiterhin durch autolytisches Debridement abgebaut und mit der Neubildung von extrazellulärer Matrix begonnen (Vogt 2011).

In der proliferativen Phase der Wundheilung kommt es auch zur Azidose, zur Erhöhung des Laktatspiegels und zur Unterversorgung des Gewebes, was wiederum Neovaskularisation initiiert und stimuliert. Vor allem die vorliegende Hypoxie hat durch die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren-Faktors-1 (HIF1) einen großen Einfluss auf die Initiierung der Gefäßneubildung. Durch HIF1 werden vermehrt Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) und FGF2 (fibroblast growth factor 2) ausgeschüttet. Diese stimulieren die Endothelzellen und sorgen somit vermehrt für die Einsprossung neuer Gefäße (Duscher 2017).

4.1.3 Epithelialisierungs- und Remodellingphase

Die letzte Phase der Wundheilung beginnt nach einigen Tagen und dauert etwa bis zwei Wochen nach der Verletzung an. Es kommt zum endgültigen Wundverschluss und zu Umbauvorgängen im Narbengewebe. Einige der Fibroblasten wandeln sich in Myofibroblasten um und sorgen durch ihre Kontraktilität für den Wundverschluss und die Kollagenbildung (Gurtner 2008). Epithelzellen legen sich über das Bindegewebe und Keratinozyten differenzieren sich weiter zur neuen Epidermis. Andere in den vorangegangenen Stufen der Wundheilung eingewanderte Zellen verlassen das Wundgebiet oder gehen apoptotisch zu Grunde. Extrazelluläre Proteine und ein Kollagenfasengerüst bleiben übrig (Falanga 2005). In diesem wird das anfänglich gebildete Kollagen Typ III größtenteils zu Kollagen Typ I umgewandelt. (Gurtner 2008)

Dies führt zu ähnlichen Verhältnissen wie in gesunder Haut. Die Umbauvorgänge im neu gebildeten Gewebe können bis zu einem Jahr andauern (Vogt 2011).

4.1.4. Narbenbildung und mögliche Komplikationen

Das beim Wundverschluss entstehende Narbengewebe fügt sich nach diesen oben beschriebenen Umbauvorgängen oft problemlos in die Ebene der Haut ein und ist nach einigen Monaten oder Jahren visuell nur noch schwach von unbeschädigter Haut zu unterscheiden. Yang, Geng et al. untersuchten in ihrer Studie jedoch die morphologischen, zytologischen und histologischen Unterschiede zwischen gesunder Haut und Narbengewebe. Auffallend waren eine verdickte Epidermis, unstrukturiert verlaufende Kollagengerüste in der Dermis, das Fehlen einer Basalmembran und damit einer festen Verankerung der Epidermis, sowie eine höhere Proliferationsrate der Keratinozyten. Letztere kann unter Umständen Ursache für eine hypertrophe Narbenbildung sein (Yang, Geng et al. 2016). Ein weiterer Unterschied ergibt sich durch die in gesunder Haut vorhandenen Proteine Fibrillin und Elastin, welche durch die Bildung von elastischen Fasern für Widerstandsfähigkeit, Spannkraft und Elastizität der Haut sorgen. Bei der Wundheilung und Narbenbildung werden diese jedoch teils nicht neu gebildet oder zeigen veränderte Eigenschaften, wodurch es zur Veränderung der Narbenelastizität kommen kann (Cohen, Geronemus et al. 2017). In einigen Narben können lediglich ausgedünnte, unregelmäßige elastische Fasern nachgewiesen werden (Tsuji and Sawabe 1987). In anderen scheint die Zusammensetzung und Konzentration der beiden Proteine verändert. So konnten in der Dermis von verschiedenen Narben deutlich geringere Konzentrationen an Fibrillin-1 als in normaler Haut gemessen werden, die Elastin-Konzentration scheint in der oberflächlichen Dermis ebenfalls vermindert zu sein, während sie bei Keloiden - ein durch überschießende Fibroblastenproduktion entstehender benigner Hauttumor - in den tieferen Dermis-Schichten eher erhöht zu sein scheint. (Amadeu, Braune et al. 2004) Keloide und Hypertrophe Narben führen in diesem Zusammenhang zu weiteren Problemen in der Wundbehandlung. Es entsteht Narbengewebe, das funktionell und ästhetisch störend für den Patienten sein kann. (Niessen, Spauwen et al. 1998)

Juckreiz, Schmerzen und Empfindungsstörungen im Narbenbereich können die Folge sein (Murray 1994).

Beeinflusst wird das Ergebnis der Narbenbildung durch verschiedenste Prozesse. So können sich zum Beispiel Wundinfekte, Hämatome, Fremdmaterialien oder mechanische Reize negativ auf die Ästhetik auswirken (Atiyeh 2003). Auch die genetische Veranlagung und der Zustand des Immunsystems spielen eine Rolle für das Ergebnis der Wundheilung (Niessen, Spauwen et al. 1998). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen Hormonstatus und Keloidbildung beobachtet werden. Diese Form der gestörten Narbenbildung tritt bei prädisponierten Personen vermehrt ab der Pubertät auf und nimmt mit dem Eintreten der Wechseljahre wieder ab. Während der Schwangerschaft ergibt sich ebenso ein erhöhtes Risiko (Murray 1994). Einen Einfluss auf das Narbenergebnis kann auch die Lokalisation der Wunde haben. Es lässt sich eine schnellere und bessere Heilung in Bereichen mit starker Durchblutung zeigen, da so ein schneller Stoffaustausch und Transport von Zellen und Nährstoffen für die Wunde gewährleistet werden kann (Son and Harijan 2014). Viele dieser Faktoren lassen sich von ärztlicher Seite schwer beeinflussen. Dennoch kann durch das richtige chirurgische Vorgehen und die Nachsorge durch sorgfältig ausgewählte Verbandsmaterialien - auf welche in einem eigenen Abschnitt näher eingegangen wird - ein gutes und den Patienten zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden.

4.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine der häufigsten Erkrankungen der westlichen Welt. In Deutschland liegt die Prävalenz laut Robert-Koch-Institut bei 7,2%, bei 80-90% davon handelt es sich um einen Diabetes mellitus Typ II. Die Krankheit ist mit einer weit gesteigerten Morbidität durch viele Folge- und Begleiterkrankungen assoziiert. Durch die chronische Hyperglykämie im Blut werden verschiedenste Mechanismen in Gang gesetzt, durch die nahezu alle körperlichen Organe und Systeme angegriffen oder verändert werden. Auch die Wundheilung ist davon betroffen. Im Folgenden sollen hierzu die pathophysiologischen Grundlagen sowie die expliziten Unterschiede in der Wundheilung bei Patienten mit Diabetes mellitus (DM) erläutert werden. Dabei soll vor

allem auf den Typ II eingegangen werden, da alle Patientin, die in die Studie eingeschlossen wurden unter dieser Form der Erkrankung litten.

4.2.1 Pathophysiologische Grundlagen des Diabetes mellitus

Die Erkrankung Diabetes mellitus (DM) kann übergeordnet in zwei Typen eingeteilt werden. Der Diabetes mellitus vom Typ I ist autoimmunbedingt und angeboren. Die Pathogenese besteht hier in der Zerstörung der Langerhans-Zellen des Pankreas, die für die Insulinproduktion verantwortlich sind. Es kommt somit zu einem absoluten Insulinmangel im Körper. Diese Form des Diabetes manifestiert sich bereits in jungen Jahren mit fortschreitender Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen.

Der Diabetes mellitus Typ II tritt hingegen meist erst im höheren Alter auf und entsteht durch eine sich langsam entwickelnde Insulinresistenz. Er ist meist assoziiert mit dem Metabolischen Syndrom und tritt bei vorliegender stammbetonter Adipositas und Fettstoffwechselstörung vermehrt auf. Die Pathophysiologie liegt bei dieser Form des DM zum einen in einer peripheren Insulinresistenz, durch die der Glukosestoffwechsel in Muskeln und Fettgewebe nicht mehr regelrecht ablaufen kann, zum anderen entfällt die Hemmung der Glykogenolyse und Gluconeogenese in der Leber durch Insulin. Die dritte Komponente bildet die mit der Zeit auftretende verminderte Insulinsekretion in des Pankreas (Herold 2016). Risikofaktoren für den Typ II Diabetes mellitus stellen das höhere Lebensalter, verschiedene Lebensstilfaktoren (Tabakkonsum, sozialer Status, Übergewicht, geringe körperliche Aktivität, fettreiche Ernährung), Medikamente mit Einfluss auf den Blutzuckerspiegel sowie andere endokrine Erkrankungen (Metabolisches Syndrom, Polyzystisches Ovar Syndrom, Gestationsdiabetes) dar (Bundesärztekammer (BÄK) 2014).

Durch diese Vorgänge liegt bei beiden Typen des DM, sowohl durch einen absoluten Insulinmangel als auch durch eine Insulinresistenz, eine chronisch andauernde hyperglykämische Stoffwechsellage vor (Brownlee 2001). Diese führt auf Dauer zu makro- und mikrovaskulären Pathologien, die Diabetes-typische Erkrankungen und Komplikationen zur Folge haben (Herold 2016) (Duscher 2017). Durch die chronische Hyperglykämie kommt es zu Veränderungen im Blutfluss und der Gefäßpermeabilität. Durch den konstanten Kontakt zu hyperglykämischem Blut verlieren die

Endothelzellen ihre Funktion. Die Zellverbände lösen sich und es kommt vermehrt zur Apoptose. Die abgestorbenen Endothelzellen werden mit dem Blutstrom weiter transportiert und fügen sich so in die Reihe der Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse ein (Okonkwo and DiPietro 2017). Auch auf die glatte Muskulatur der Gefäßwände nimmt die chronische Hyperglykämie Einfluss. Es zeigt sich eine gesteigerte Vasokonstriktion durch Hemmung der NO-Sekretion (Brownlee 2001), eine Aktivierung der Gerinnungskaskade sowie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Martin 2002). Durch Umbauvorgänge und durch das oben beschriebene Lösen und Absterben von Endothelzellen wird die erhöhte Gefäßpermeabilität irreversibel. Hinzu kommt der Verschluss kleiner Kapillaren durch die Überproduktion extrazellulärer Matrix. Diese Mechanismen führen zur Bildung von Ödemen, zu gebietsweiser Ischämie sowie zu reaktiv gesteigerter Neovaskularisierung (Brownlee 2001). Diese läuft jedoch nicht unter normalen physiologischen Bedingungen ab, da auch die Angiogenese bei Patienten mit Diabetes mellitus stark durch die hyperglykämische Stoffwechsellage beeinflusst wird. Interessanterweise kann diese, je nach Gewebe und Pathologie, vermindert oder gesteigert sein (Thangarajah 2010). So findet zum einen in bestimmten Regionen des Körpers eine durch Hypoxie induzierte übermäßige Gefäßneubildung statt (Duscher 2017). Diese wird vor allem durch eine Überaktivität des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) bestimmt. Darauf nehmen verschiedene Faktoren Einfluss. Hypoxie, Hyperglykämie sowie das Vorhandensein von Vasokonstriktoren, Wachstumsfaktoren und Zytokinen steigern die VEGF-Expression und somit die Neoangiogenese (Martin 2002). Auch weiß man, dass durch die vorherrschende Hyperglykämie ein Defekt in der Aktivierung des Hypoxie-Induzierten Faktors (HIF-1 α) entsteht. Dieser ist ein Transkriptionsfaktor für VEGF, sodass dessen Dysfunktion wiederum zu einer gesteigerten Gefäßneubildung führt (Duscher 2017). Dieses Phänomen findet sich zum Beispiel bei der diabetischen Retinopathie sowie der glomerulären Nephropathie. Es entsteht ein zwar weit verzweigtes Gefäßnetz, das jedoch durch zahlreiche Leckagen und instabile Gefäßwände nicht funktionstüchtig ist (Okonkwo and DiPietro 2017).

Zum anderen kann die Expression von VEGF und damit die Angiogenese im gegenteiligen Sinn vermindert sein. Gezeigt wurde dies bei DM auf Grund einer Insulinresistenz. Hier wird vermutet, dass der VEGF-Spiegel vor allem im Myokard

Insulin-abhängig ist (Thangarajah 2010). Dies liefert wiederum eine Erklärung für die bei Diabetikern fehlenden koronararteriellen Kollateralen und das unter anderem dadurch erhöhte Myokardinfarkttrisiko (Martin 2002). Die verringerte Angiogenese spielt vor allem bei der Wundheilung bei Diabetes-mellitus-Patienten eine große Rolle. Die Problematik wird im Folgenden noch näher erläutert werden.

4.2.2 Diagnostik und Therapie des Diabetes mellitus Typ II nach den nationalen Versorgungsleitlinien

Da alle Patienten der hier vorliegenden Studie an DM Typ II erkrankt waren, soll im Folgenden auf das bei dieser Diagnose übliche Vorgehen eingegangen werden, während die genaueren Herangehensweisen bei DM Typ I themenbedingt nicht genauer erläutert werden.

Die Diagnose des Typ II DM erfolgt durch ausführliche Anamnese, Evaluierung von Risikofaktoren, körperliche Untersuchung sowie durch Labordiagnostik. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Blutfette, Elektrolyte, Nierenretentionsparameter sowie der Langzeitwert HbA1c, der einen guten Überblick über des Blutzuckerprofil der letzten Wochen gibt. Auch die Ermittlung der Plasmaglucoese mittels oGTT (oraler Glucosetoleranztest) und eine Urinanalyse bezüglich Ketonkörper- und Eiweißausscheidung sollten erfolgen. Des Weiteren sollten Untersuchung bezüglich möglicher Begleiterkrankungen durchgeführt werden. Dazu gehören die diabetische Neuro-, Nephro- und Retinopathie sowie das diabetische Fußsyndrom. Eine Überprüfung des allgemeinen vaskulären Risikos wird zusätzlich empfohlen. Abbildung 3 zeigt als Flussdiagramm die einzelnen diagnostischen Säulen.

Die Indikation zur Therapie wird anschließend bei jedem Patienten individuell gestellt. Eine Zusammenschau aus Risikofaktoren, Symptomen und Begleiterkrankungen führt dann zum passenden Therapiekonzept. Der HbA1c kann nach erfolgter Diagnostik als Verlaufparameter dienen und sollte zwischen 6,5% und 7,5% liegen. Generell bildet eine Lebensstilanpassung die Basis der Diabetestherapie und sollte in jeder Stufe beibehalten werden. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Schulung bezüglich der Ernährung (mediterrane Kost wird empfohlen), die Steigerung der körperlichen Aktivität sowie die Eliminierung weiterer

Risikofaktoren, soweit dies möglich ist. Bei noch nicht ausreichender Senkung des Blutzuckerspiegels durch diese Maßnahmen kann die medikamentöse Monotherapie durch ein orales Antidiabetikum begonnen und gegebenenfalls auf eine Kombinationstherapie oder zusätzliche Insulingabe eskaliert werden.

(Bundesärztekammer (BÄK) 2014)

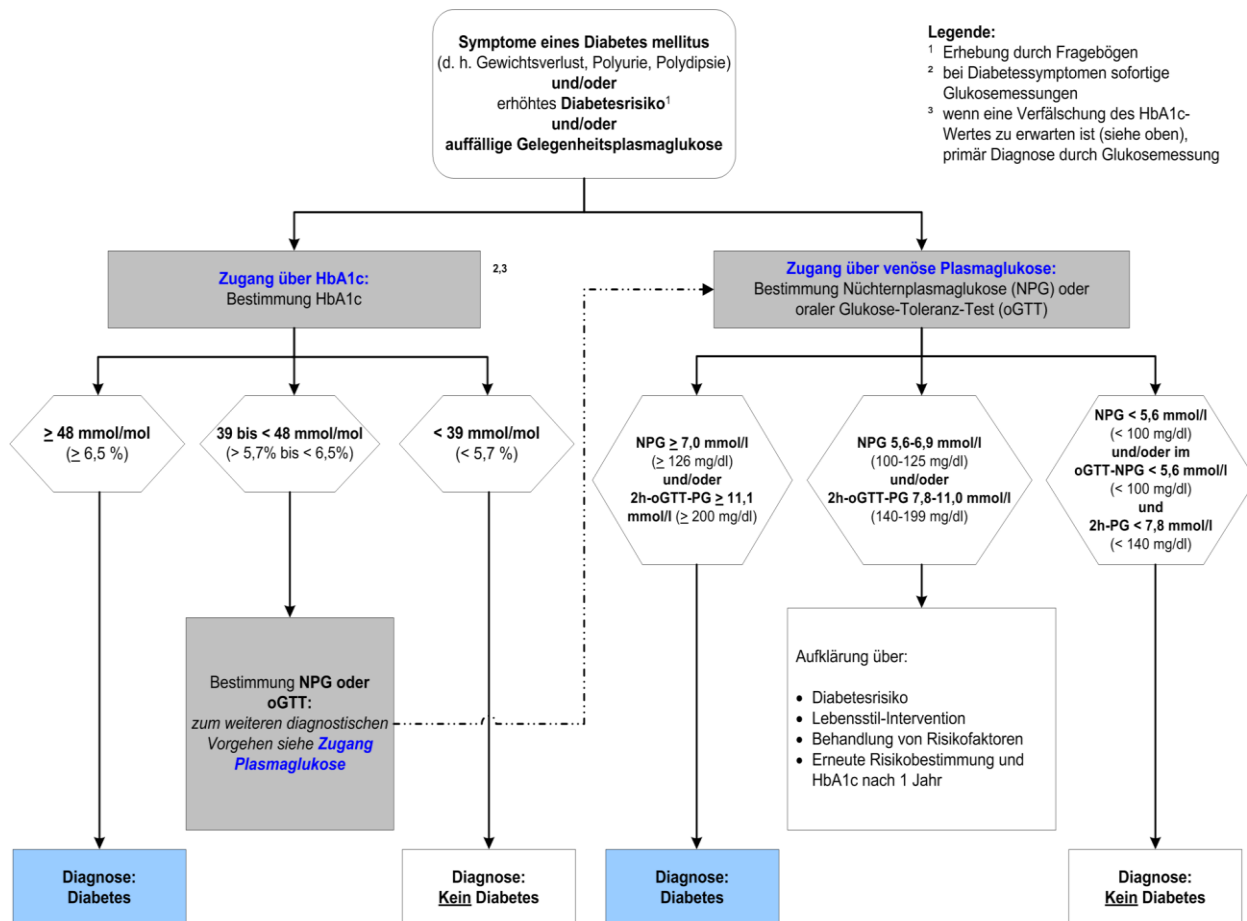


Abbildung 3 Algorithmus zur Diagnose des Typ II DM aus den aktuellen Leitlinien (Bundesärztekammer (BÄK) 2014)

4.2.3 Besonderheiten in der Wundheilung bei Patienten mit Diabetes mellitus

Durch die vorangehend beschriebenen Pathologien, die mit der Diabetes mellitus Erkrankung einhergehen, kommt es zu einem Versagen der physiologisch ablaufenden Reparaturvorgänge während der Wundheilung (Duscher 2017). Im

Folgenden soll deshalb auf die Ursachen und die Besonderheiten im Vergleich zu Nicht-Diabetikern eingegangen werden.

Abbildung 4 gibt die wesentlichen Unterschiede der Wundheilung bei Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zur physiologischen Wundheilung wieder.

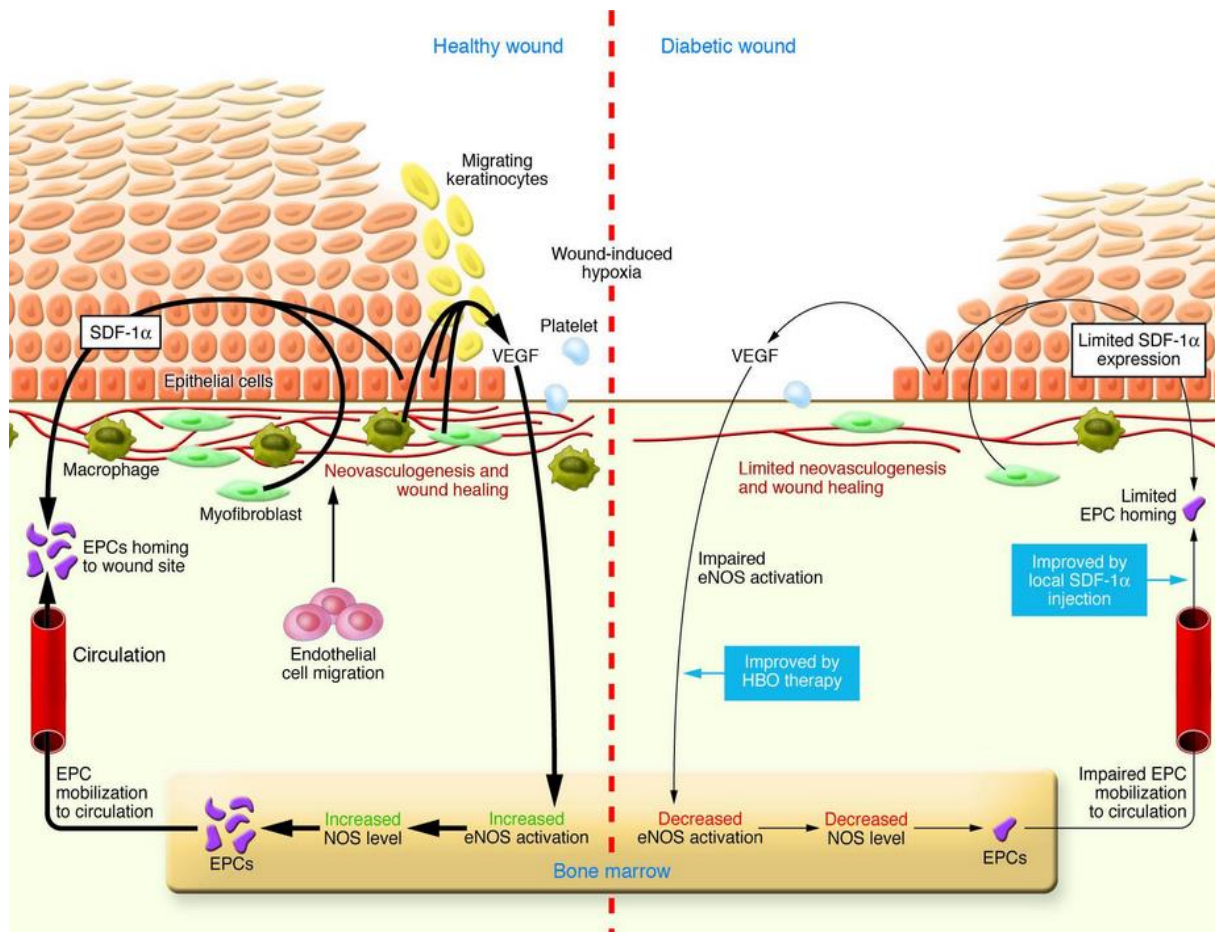


Abbildung 4 Wundheilung bei Diabetes mellitus (rechts) im Vergleich zur physiologischen Wundheilung (links) (Brem and Tomic-Canic 2007)

Bereits in der Frühphase kommt es zu Störungen im Ablauf. Physiologischerweise sezernieren die Thrombozyten im Wundgebiet Platelet-derived growth factor (PDGF). Dieser lockt andere Zellen für die Wundheilung an und regt sie zur Teilung an. Außerdem hat er eine stabilisierende Wirkung auf das Kapillarbett. Bei diabetischen Mäusen wurde PDGF in geringeren Konzentrationen gefunden als bei gesunden Mäusen. Dies lässt auf eine verlangsamte Induktion der Wundheilung schließen (Beer 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Wunden bei Patienten mit Diabetes mellitus mehrere Phasen der Wundheilung gleichzeitig und ohne strukturierte Progression ablaufen. Ursächlich sind die zu Grunde liegende Vasculopathie, die

fehlerhafte Angiogenese sowie Abnormalitäten der an der Wundheilung beteiligten Zellen (Falanga 2005). Die bei Diabetikern vorliegende chronische unterschwellige Entzündung, die länger andauernde Immunantwort bei Verletzungen, die chronische Hyperglykämie sowie eine verstärkte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Faktoren wie Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Interleukin 1 und 6 nehmen Einfluss auf die Entzündungsphase der Wundheilung (Baltzis, Eleftheriadou et al. 2014). Auch die Debridement- und Proliferationsphase werden beeinträchtigt, wodurch die weitere Wundheilungskaskade gestört wird (Martin 2002). Die insuffiziente Proliferationsphase rührt daher, dass Keratinozyten und Fibroblasten bei Diabetes Patienten eine geringere Mitoserate und eine schlecht ausgeprägte Zellmigration aufweisen (Baltzis, Eleftheriadou et al. 2014). Ursächlich hierfür ist vor allem das fehlende oder malformierte Mikrotubuligerüst der Fibroblasten, wodurch diese mitoseunfähig werden (Martin 2002).

Wie oben bereits beschrieben findet sich bei vorliegendem DM eine von der Norm abweichende Neoangiogenese. In der Haut und vor allem bei der Wundheilung ist diese im Vergleich zur diabetischen Retinopathie oder Nephropathie aber vermindert. Okonkwo et al. beschreiben in ihrer Arbeit zur Angiogenese in Wunden bei Diabetikern die pathophysiologischen Hintergründe. In diabetischen Wunden wurde zunächst eine sehr geringe Gefäß- und Kapillardichte gefunden. Dies passt zu den vermindert vorhandenen pro-angiogenetischen Faktoren wie VEGF und den erhöhten anti-angiogenetischen Faktoren wie PEDF (Pigment-Epithelium-Derived-Factor) im Serum. Die vorhandenen Gefäße sind instabil und undicht und ihre Endothelzellen weisen veränderte RNA-Sequenzen auf. Bestimmte mikro Ribonukleinsäuren (miRNA) wie miR26-b und miR200-b scheinen die Wundheilung zu bremsen und konnten in Endothelzellen bei diabetischen Wunden nachgewiesen werden. Eine weitere Rolle spielt die verminderte Anzahl und teilweise Funktionslosigkeit von endothelialen Vorläuferzellen (EPC), die sich normalerweise zu Endothelzellen differenzieren und für die Auskleidung der Gefäßwände zuständig sind (Okonkwo and DiPietro 2017). Die aus diesen Faktoren resultierende fehlerhafte und unzureichende Angiogenese im Wundbett führt zu einer geringen Sauerstoffsättigung im umliegenden Gewebe. Es entstehen vermehrt freie Sauerstoffradikale, sodass die Zellen im Wundgebiet unter oxidativem Stress stehen. Dieser wird durch die bestehende Hyperglykämie und die chronische Entzündung weiter verstärkt. Auch die erhöhte Anzahl an neutrophilen

Granulozyten führt durch die vermehrte Bildung von reaktivem Sauerstoff zu Gewebsschäden statt zur Heilung der Wunde (Baltzis, Eleftheriadou et al. 2014). Das Wundgebiet wird somit nicht ausreichend mit Nährstoffen versorgt und steht durch diesen Mangelzustand unter zusätzlichem Stress.

Auch auf zellulärer Ebene lassen sich einige Unterschiede zwischen Diabetes Patienten und Gesunden finden. In der Arbeit von Boniakowski, Kimball et al. wird auf die Rolle der Makrophagen in der Wundheilung eingegangen. Unterschieden werden zwei Typen von Makrophagen: Der pro-inflammatorische Typ (M1), der vor allem in der Entzündungsphase der Wundheilung eine Rolle spielt und der immunmodulatorische Typ (M2), der die weiteren regenerativen Phasen der Wundheilung mit beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen vom pro-inflammatorischen Typ (M1) bei DM-Patienten in höheren Zahlen auftreten als bei nicht an DM erkrankten Personen. Dies gilt zum einen bereits für die unbeschädigte Haut, die durch erhöhte M1-Zahlen und abweichende Level von Entzündungs- und Wachstumsfaktoren eine chronische unterschwellige Entzündung aufweist. Zum anderen konnten auch in Wunden bei DM-Patienten erhöhte Zahlen von M1 und vor allem deren prolongiertes Auftreten nachgewiesen werden. So wird nicht, wie bei Gesunden mit voranschreitender Wundheilung durch Makrophagen vom M2-Typ die Regeneration der Haut vorangetrieben, sondern durch die pro-inflammatorischen Makrophagen M1 eine chronische Entzündung beibehalten, die durch Anwesenheit von Entzündungsmediatoren wie Interleukin-6 und TNF α weiter aufrechterhalten wird (Boniakowski, Kimball et al. 2017). Auch die Mastzellen spielen auf zellulärer Ebene eine wichtige Rolle. Diese sind ebenfalls auf der Haut von DM-Patienten chronisch erhöht und konnten bei diabetischen Mäusen in erhöhter degranulierter Form nachgewiesen werden. Die Mastzelldegranulation sorgt für die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren, die auch bei Allergien eine wichtige Rolle spielen. Die Degranulation sorgt also wie die proinflammatorischen Makrophagen zu einer verstärkten Immunantwort. So können die Mastzellen ihre Funktion als Mediatoren in der Entzündungs- und Proliferationsphase nicht mehr ordnungsgemäß ausführen. Abläufe wie Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Fibroblastenaktivierung, Anregung der Zellmigration, Neoangiogenese und Kollagenreifung werden hierdurch gestört (Tellechea, Leal et al. 2016).

Betrachtet man all diese durch Diabetes mellitus veränderten Prozesse, ist es nicht verwunderlich, dass die Wundheilung bei DM Patienten davon deutlich beeinträchtigt wird und somit langsamer und ineffektiver abläuft. Ob und inwieweit dies auch bei der Wundversorgung mit Okklusivverbänden der Fall ist, gilt es in dieser Studie zu prüfen.

4.3 Die Spalthauttransplantation

Spalthautentnahmestellen bieten ideale Eigenschaften für Studien zur Untersuchung der Wundheilung. Durch standardisierte Techniken entsteht eine iatrogen verursachte Wunde, die bei jeder Entnahme in etwa die gleichen Charakteristika wie Größe, Tiefe und betroffene Hautareale aufweisen. Somit lassen sich die Wunden untereinander gut vergleichen (Läuchli, Hafner et al. 2013). Die Grundlagen zur Spalthauttransplantation sollen deshalb im Folgenden erläutert werden.

4.3.1 Entnahmetechniken

Hauttransplantationen zur Deckung von nicht selbst heilenden Defekten werden in verschiedenen Techniken durchgeführt. Bei der Vollhauttransplantation wird die gesamte Dermis und Epidermis entnommen, an die Defektstelle angepasst und dort fixiert. Auf diese Form der Hauttransplantation soll themenbedingt nicht genauer eingegangen werden.

Bei der Entnahme von Spalthaut wird im Vergleich dazu lediglich die Epidermis mit einem Teil der Dermis entfernt. Große Vorteile hierbei sind die Einheilung auch in Gebiete mit schlechterer Durchblutung, die Regeneration und geringere Komplikationsrate der Entnahmestelle, die damit mögliche wiederholte Entnahme von Spalthaut, sowie die Größe der Fläche, die durch ein Spalthauttransplantat gedeckt werden kann. Abgetragen wird die Haut mit Hilfe eines Dermatoms, welches schräg zum Hautniveau aufgesetzt werden muss und so unter kontrolliertem Zug eine Schicht von 0,2 bis 0,8, in manchen Fällen bis zu 1,0 mm, entfernt werden kann. Anschließend kann die Spalthaut mit Hilfe eines Mesh-Geräts durch Perforation auf das 1,5-6-fache vergrößert werden. Auch wenn keine Vergrößerung des Hautlappens gewünscht ist, sollte dieser durch kleine Einschnitte perforiert werden, um im Wundbereich den Ablauf

von Exsudat zu ermöglichen (Vogt 2011, Praxis der Plastischen Chirurgie, 78-79). Nach Präparation des Hautlappens wird dieser im Wundgebiet aufgelegt und durch feine Nähte, Gewebekleber oder Klammern fixiert. Wichtig ist, das Transplantat vor mechanischen Einwirkungen zu schützen und es ausreichend durch Druckverbände zu fixieren. Dies stellt auch die Versorgung des Transplantats sicher, welches in den ersten Tagen nur durch Diffusion erfolgt und daher einen ausreichenden Anpressdruck benötigt. Bei korrekter Operationstechnik und im richtiger Handhabung Zuge der Wundversorgung kommt es selten zu Komplikationen. Dennoch ergeben sich einige Nachteile der Spalthauttransplantation. Zum einen können Probleme bezüglich des ästhetischen Ergebnisses auftreten. Es kann zu Narbenkontrakturen und hypertropher Narbenbildung am Transplantat und zu veränderter Pigmentierung der Hebestelle kommen. Die Hebestelle kann des Weiteren Schmerzen und Unbehagen beim Patienten verursachen (Dornseifer 2009). Die Deckung mit Spalthaut ist also eher eine funktionelle Wiederherstellung der Haut als eine kosmetisch oder ästhetisch ideale Methode.

Weitere Probleme können eine fehlende Ausbildung sensibler Nervenendigungen sowie verminderte Resistenz gegenüber mechanischen Kräften im Transplantatgebiet sein (Schubert, Brandstetter et al. 2012). Die Wahl der richtigen Entnahmestelle hängt von verschiedenen Faktoren ab. Das beste kosmetische Ergebnis ergibt sich bei Hebung nahe des Wundgebietes beziehungsweise von vergleichbaren Stellen mit ähnlichen Eigenschaften in der Hautbeschaffenheit. Hierdurch entstehen jedoch eventuell Narben an deutlich sichtbaren Bereichen der Haut, sodass auch eine weniger auffällige Stelle (Glutealregion, lateraler Oberschenkel) gewählt werden kann (Skouge 1987). Wichtig ist auch, eine möglichst ebene Fläche für die Hebung zu schaffen. Diese Voraussetzung ist zum Beispiel am seitlichen Oberschenkel gegeben. Sollte eine andere, von Natur aus nicht ebene Entnahmestelle gefordert sein, kann diese Region mit Natriumchlorid oder Adrenalin unterspritzt werden, um ideale Voraussetzungen zu schaffen und Hautniveauunterschiede auszugleichen (Schubert, Brandstetter et al. 2012).

4.3.2 Einsatz- und Therapiemöglichkeiten

Wie bereits erwähnt können mit Spalthauttransplantaten (SHT) große Wundflächen gedeckt werden. Dies wird bei verschiedenen Formen der Wunddeckung benötigt, wodurch die Indikationen für SHT sehr vielfältig sind.

Einsatz finden SHT vor allem bei chronischen, nicht heilenden und schlecht vaskularisierten Wunden, durch die die Barrierefunktion der Haut nicht mehr gewährleistet ist. Durch Spalthaut wird die Wunde verschlossen und kann so wieder als Schutzmantel gegen externe Einflüsse und Infektionen fungieren. Hier ist die Eigenschaft von Spalthaut, auch in wenig oder schlecht durchbluteten Gebieten einzuheilen, von großem Vorteil (Herskovitz, Hughes et al. 2016). Auch bei nekrotisierender Faszitis oder großflächigen Verbrennungen sind oft SHT nötig, um die beschädigten Hautareale zu decken (Vindenes 1999). Die Transplantation erfolgt hier unmittelbar nach Debridement und Reinigung der Wundflächen. Teilweise dient die Spalthaut als Akuttherapie nach der Verbrennung zum Schutz der offen gelegten Hautschichten, teilweise aber auch als dauerhafte Defektdeckung (Müller 2000). Unterschieden werden kann auch die körpereigene – autogene Hauttransplantation von der allogenen Spenderhauttransplantation. Letztere kommt vor allem bei großflächigen Verbrennungen zum Einsatz, da hier oft die eigene noch intakte Hautoberfläche nicht mehr ausreichend ist, um verletzte Areale zu decken (Schubert, Brandstetter et al. 2012). Ebenfalls kann nach Entfernung maligner Hauttumoren eine SHT nötig sein. Während eine Vollhauttransplantation hier zwar ein deutlich besseres kosmetisches Ergebnis liefern würde, hat die SHT den Vorteil, dass eventuelle Tumorrezidive in tieferen Schichten nicht verdeckt und so schneller erkannt werden können. Eine ästhetisch ansprechendere Deckung kann in einer zweiten Operation erfolgen, sobald die Therapie des Tumors abgeschlossen ist (Skouge 1987).

Die erwähnten Einsatzmöglichkeiten von SHT sind nur beispielhaft für die vielfältige Verwendung dieser Technik. Durch ihre simple Anwendung und gute funktionelle Rehabilitation der zu verschließenden Wunde ist die Entnahme von Spalthaut oft das Mittel der Wahl. Nicht unbeachtet sollte allerdings die Entnahmestelle gelassen werden, durch die eine weitere zu versorgende Wunde entsteht.

4.4 Nachbehandlung von Spalthautentnahmestellen

Wie bereits erwähnt können Spalthautentnahmestellen mit einigen Komplikationen im Heilungsverlauf vergesellschaftet sein. Oftmals bereiten sie sogar größere Probleme als das eigentliche Operationsgebiet selbst. Sie werden nicht selten von Patienten als sehr unangenehm und schmerzhaft empfunden (Schubert, Brandstetter et al. 2012). Bei der Heilung können außerdem unschöne, hypertrophe Narben oder eine ungleichmäßige Pigmentierung entstehen, sodass das kosmetische Ergebnis für viele Patienten nicht zufriedenstellend ist (Han, Yoon et al. 2007). Umso wichtiger ist es, die Hebestelle gut zu versorgen und die richtige Verbandsart zu wählen. Der ideale Verband ist kostengünstig, in seiner Anwendung simpel und effizient, bildet eine Barriere gegen Traumen und Bakterien, löst das Problem des Wundexsudats und lässt sich ohne Schädigung der heilenden Wunde entfernen und wechseln (Hutchinson and Lawrence 1990). Im Folgenden werden zwei verschiedene Verbandsarten bezüglich ihrer Vor- und Nachteile verglichen.

4.4.1 Der trockene bzw. einfache Verband

Weit verbreitet in der Wundbehandlung sind nach wie vor Verbände mit trockenen Wundauflagen wie Gaze und simpler Kompression durch elastische Binden o.Ä.. Die Wundaufgabe soll Wundsekrete aufsaugen und lässt Luft an die Wunde. Sie soll somit ein trockenes Wundmilieu schaffen (Ubbink, Vermeulen et al. 2008). Sterile Gaze ist eine kostengünstige und unkomplizierte Wahl für das Abdecken der Wunde und den Schutz vor Infektionen (Korting, Schöllmann et al. 2010). In Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass Wunden unter trockenen Verbänden verstärkte Gewebsschädigungen, Hautnekrosen und Narbenbildung aufweisen (Vogt 1995). Weiterhin wird diese konventionelle Form der Wundversorgung als schmerzhaft für den Patienten beurteilt. Ursächlich dafür sind häufig nötige Verbandswechsel und verstärkte Krustenbildung, sodass es an der Oberfläche immer wieder zu schmerzhaften Einrissen kommen kann (Ubbink, Vermeulen et al. 2008). Um die Wundversorgung und das kosmetische Ergebnis zu optimieren, wurde in den letzten Jahrzehnten verstärkt an neuen Formen der Wundversorgung geforscht.

4.4.2. Der Semi-/Okklusivverband

Bereits ab den 1950er Jahren wurde an neuen Strategien geforscht, mit denen sich die Wundheilung mit Hilfe des richtigen Verbandes verbessern lassen könnte. Die Idee der Wundokklusion, durch die die Wunde vor externen Einflüssen geschützt und ein feuchtes Wundmilieu geschaffen wird, wurde vielfach untersucht (Ubbink, Vermeulen et al. 2008). In den 1960er Jahren zeigte Winter erstmals, dass feucht oder nass gehaltene Wunden schneller und besser heilen als jene unter den meistangewendeten trockenen Gaze-Verbänden. Er beobachtete in seiner Arbeit die Vermeidung von Schorfbildung sowie eine um die Hälfte verkürzte Reepithelisierungszeit im Vergleich zu trocken verbundenen Wunden (Winter 1962). In weiteren Studien konnte die kürzere Heilungsdauer ebenfalls bestätigt werden (Vogt 1995) (Beam 2007). 1975 wurde Polyurethanfolie erstmals als Verband entdeckt, wodurch die Wundbehandlung um ein Vielfaches einfacher wurde. Vorteile eines Folienverbandes sind die kostengünstige und einfache Handhabbarkeit sowie die Transparenz des Verbandes, wodurch die Wundsituation gut überwacht werden kann (Dornseifer 2009). Nun als bessere Option zu vorherigen Verbandstechniken anerkannt, wurde stark an der Ausarbeitung der Semiokklusiv- und Okklusiv-Verbände (SOV/OV) geforscht und verschiedene neue Materialien wurden entwickelt (Uraloğlu 2014) (Kilinç 2001, Kazanavičius, Cepas et al. 2017). Ein systematischer Vergleich der Materialien wurde beispielsweise von Chaby et al. in einer Metaanalyse veröffentlicht. Verbände mit Hydrokolloid, Hydrogel, Polyurethan, Hydrofiber oder Alginat wurden ebenso geprüft wie Paraffin Gaze- und Schaum-Verbände. Auch auf spezielle Beschichtungen wie Silber, Holzkohle oder Hyaluronsäure wird in der Analyse eingegangen. Diese sollen die Wundheilung noch weiter verbessern. Verglichen wurden die Verbandmaterialien hinsichtlich der allgemeinen Vorteile von SOV/OV, auf die folgend genauer eingegangen werden soll. Gezeigt wurde eine signifikant bessere Heilung chronischer Wunden unter Hydrokolloidverbänden und eine Verkleinerung der Wundfläche durch Behandlung mit Alginat. Vor allem zeigt die Studie aber die Vielfältigkeit der Materialien auf (Chaby, Senet et al. 2007). Sicherlich wird es in diesem Bereich weiterhin stetig neue Entwicklungen geben. Allen SOV/OV gemein ist aber das geschaffene feuchte Milieu in der Wundregion, dessen Vorteile mehrfach bewiesen wurden. Zunächst konnte basierend auf Winters Erkenntnissen die schnellere Reepithelisierung unter

SOV/OV nachgewiesen werden (Uraloğlu 2014) (Eaglstein 1984). Weiterhin wird durch das feuchte Milieu die Inflammationsphase verkürzt, die Zellteilung und -differenzierung angetrieben, die Kollagenmetabolismus ebenso wie die Neovaskularisation beschleunigt (Läuchli, Hafner et al. 2013) (Hutchinson and Lawrence 1990). Durch die Ansammlung von blutig-serösem Sekret unter dem Verband entsteht eine Art Puffer gegen Traumata von außen, sodass die Schmerzen durch Manipulation an der Wunde deutlich geringer sind (Dornseifer 2009). Auch die Schmerzen durch den bei trockenen Verbänden häufig nötigen Verbandswechsel können durch SOV/OV reduziert werden. Sie müssen meist im Heilungsverlauf nicht gewechselt werden, wodurch die Manipulation an der Wunde und damit sowohl der pflegerische Aufwand als auch die Infektionsrate und Schmerzskala reduziert werden können (Dornseifer 2009) (Läuchli, Hafner et al. 2013).

Hutchinson et al. untersuchten die Annahme, dass bei der Wundbehandlung mit SOV/OV durch vermehrte Bakterienproliferation im feuchten Milieu eine erhöhte Infektionsgefahr bestünde. In der Studie konnte dies jedoch widerlegt werden. Der OV bietet eine Schutzbarriere gegen externe Erreger und schließt die natürliche Hautflora unter sich ein. Diese trägt unter anderem zur Aktivierung des Komplementsystems bei. Dadurch lassen sich die unter OV verminderten Infektionsraten und die optimalen Bedingungen für das nicht spezifische Abwehrsystem erklären (Hutchinson and Lawrence 1990) (Korting, Schöllmann et al. 2010). Die verminderte Schorfbildung und Hautnekrose im feuchten Wundmilieu sowie die schnellere Epithelialisierung, die durch gesteigerte Zellmigration und in der Wundflüssigkeit konstant vorhandenen Wachstumsfaktoren begünstigt wird, führen auch zu schöneren kosmetischen Ergebnissen und verminderter Narbenbildung (Atiyeh 2003) (O'Shaughnessy 2009) (Korting, Schöllmann et al. 2010).

Ursächlich für alle genannten Vorteile der Wundokklusion ist zum einen die durch den vollständigen Verschluss der Wunde gegebene Schutzbarriere, durch die wie erwähnt Infektionen und Schmerzen durch Manipulation an der Wunde verringert werden können. Zum anderen spielt aber auch die sich unter dem SOV/OV ansammelnde Wundflüssigkeit eine wichtige Rolle. In ihr konnten erhöhte Werte an Wachstumsfaktoren wie PDGF und EGF, aber auch an Immunmodulatoren wie Interleukine oder TNF- α nachgewiesen werden. Durch sie wird die Zellteilung und -interaktion gefördert, wodurch wiederum die Wundheilung und Gewebsneubildung

vorangetrieben werden. Alle für die Wundheilung nötigen Faktoren und Zellen sind im Wundsekret in konzentrierter Form vorhanden. Dies trägt gemeinsam mit der fehlenden Schorfbildung und der dadurch erleichterten Epithelialisierung insgesamt zu einer schnelleren Regeneration der Haut bei (Grayson 1993) (Ono, Gunji et al. 1995). Ein Nachteil bei der Ansammlung von Wundflüssigkeit können ungewollte Leckagen sein, durch die das Sekret in unkontrollierten Mengen entweichen kann. Dies führt zu unterschiedlichen Problemen: Zum ersten ist dies eine unangenehme Situation für den Patienten, zweitens verliert der OV seine Eigenschaft als Schutzbarriere gegen exogene Keime und auch das feuchte Wundmilieu bleibt nicht mehr in gleicher Form erhalten. Abhilfe schaffen kann hier die Verwendung von SOV, die durch ihre gezielten Leckagen in Form von Perforationen ein gewisses kontrolliertes Entweichen der Wundflüssigkeit zulassen (Dornseifer 2009).

Okklusivverbände können also zusammenfassend in ihrer Vielfältigkeit als die ideale konservative Therapieform für chronische und akute Wunden angesehen werden. Durch eine vielfältige Materialauswahl kann für jede Wunde der geeignete Verband gefunden und somit die Wundheilung bestens optimiert werden.

4.5 Zielsetzung und Hypothese der Studie

Der SOV oder OV wurde schon in vielen Studien als ideale Wundversorgung deklariert (Dornseifer 2009) (Kilinç 2001). Durch die beschleunigte Reepithelialisierung, Neovaskularisierung, Zellmigration sowie durch geringere Schmerzskalen, Infektionsraten und Narbenbildung scheint Okklusion bei allen Wunden die am besten geeignete Therapieoption zu sein. Jedoch gibt es, wie anfangs am Beispiel von diabetischen Wunden erläutert, komplexe Wundsituationen, in denen die Heilung beeinträchtigt ist und die Therapie eventuell abgewandelt werden muss. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch chronische Wunden, zum Beispiel Ulzera der unteren Extremität, wie sie bei Diabetes-Patienten oft vorkommen, unter Okklusion schneller heilen als unter konventionellen Verbänden (Eaglstein 1984).

In dieser Studie soll deshalb auf die Unterschiede in der Wundheilung eingegangen werden, die sich durch die Erkrankung Diabetes mellitus zu gesunden Patienten ergeben. Es soll die Frage geklärt werden, ob die Beeinträchtigung in der allgemeinen

Wundheilung bei Diabetikern trotz optimaler Versorgung mit SOV/OV weiterhin, und wenn ja an welchen Faktoren, bemerkbar ist. Gemessen werden in vitro Effekte auf die Zellmigration, Angiogenese, metabolische Zellaktivität und Zellstress. Hierzu erfolgt die Analyse von Wundsekreten und Blutseren als Kontrolle von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus. Wundsekrete von Spalthautentnahmestellen bieten hier die ideale Grundlage, da die bei der SHT entstehenden Hebestellen wie bereits erwähnt, sehr gut vergleichbare Wunden mit ähnlichen Eigenschaften darstellen.

5 Methodik und Materialien

5.1 Studiendesign und Ablauf

Nach erfolgter Prüfung und Zulassung durch die Ethikkommission der Technischen Universität München wurden im Rahmen der Studie mit der Projektnummer 379/17 insgesamt 32 Wundflüssigkeitsproben von Patienten nach erfolgter Spalthauttransplantation in der Klinik für Handchirurgie und Plastische Chirurgie des Klinikums Rechts der Isar und in der Klinik für Plastische Chirurgie, Handchirurgie und Verbrennungsmedizin des Klinikums Bogenhausen gesammelt. Ausschlusskriterien waren eine vorliegende Schwangerschaft und ein Alter unter 18 Jahren. Aus 22 verwendbaren Proben (beurteilt nach jeweils abgenommenen Wundsekretmengen und nach Ausschluss einer bakteriellen Kontamination) wurden zwei Patientengruppen gebildet. Eine Gruppe mit der Nebendiagnose Diabetes mellitus und einem durchschnittlichen Patientenalter von $62 \pm 11,2$ Jahren und einer Geschlechterverteilung Männer zu Frauen von 8:3, die andere Gruppe als Kontrolle ohne Diabetes mellitus Erkrankung mit einem Durchschnittsalter von $57,2 \pm 19,4$ und einer Geschlechterverteilung von 6:5.

Es erfolgte noch im Operationssaal eine sterile Wundversorgung der Spalthautentnahmestellen am rechten oder linken ventro-medialen oder ventro-lateralen Oberschenkel mittels Okklusivverband (OV: Opsite, Smith&Nephew iv3000, VAC-Folie). Die Probenentnahme erfolgte am dritten postoperativen Tag. Hierfür wurde die Folie des OV mit einer dünnen Kanüle (Sterican® Größe 18, G 26x1, Durchmesser 0,45 x 25 mm, Fa. B. Braun, Deutschland) perforiert und die Flüssigkeit mittels 5ml Spritze (Injekt®, Fa. B. Braun, Deutschland) abgezogen. Anschließend erfolgte je nach Wundsituation eine weitere Wundbehandlung mit OV und Kompressen oder ein Ablösen der Folie, vorsichtigem Säubern der Wunde und Versorgung mit trockenen Verbänden. Parallel erfolgte bei jedem Patienten die Abnahme eines Blutserumröhrchens zur Kontrolle.

5.2 Aufarbeitung der Proben

Unmittelbar nach der Abnahme wurden die Proben im Labor aufbereitet. Das Blutserum wurde dort für fünf Minuten bei 20000 Umdrehungen zentrifugiert (Zentrifuge Hettich Rotanta 460R, 300g). Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und in 1-3 1ml Portionen in Eppendorf-Gefäße (Eppendorf GmbH Deutschland) überführt. Die Wundsekretproben wurden je nach Menge aus der Spritze in Eppendorf-Gefäße umgefüllt und anschließend ebenfalls für fünf Minuten bei 20000 Umdrehungen zentrifugiert. Die Überstände wurden folgend portioniert und in neue Gefäße pipettiert. Alle Proben (Wundsekret und Blutserum) wurden bis zum Start der Versuchsreihen bei -80°C tiefgefroren.

5.3 Vorbereitung der Zelllinien und Proben

Vor dem Beginn der Versuchsreihen wurden beide Zellreihen (HS-27, HUVEC) in DMEM mit hohem Glucoseanteil (Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose, Biochrom) mit 10% FCS (Fetales Kälberserum) eingesät. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit DMEM mit 5% FCS versehen. Die Patientenproben wurden alle 1:20 mit dem jeweils für den Versuch passenden Medium verdünnt, sodass die Endkonzentration 5% betrug.

Die Analyse der Proben erfolgte in zwei Testreihen (V1 und V2). In V1 wurden je Gruppe 5 Proben getestet, in V2 je 6 Proben. In beiden Durchläufen wurde stets das Wundsekret gemeinsam mit dem jeweils abgenommenen Blutserum als Kontrolle untersucht.

5.4 Testverfahren

5.4.1 Scratch-Assay

Der Scratch-Assay bietet eine effektive und kostengünstige in vitro Simulation der Wundheilung in vivo (Liang 2007). Durch mikroskopische Aufnahmen einer

konfluenten Zellschicht mit artifiziellem Spalt zu verschiedenen Zeitpunkten kann die Zellmigration mit Wiederherstellung der Zell-Zell-Kontakte beobachtet werden (Liang 2007).

Die Durchführung des Assays kann auf verschiedene Arten gestaltet werden. Zur Erschaffung der Zelloffnung kann die vorher eingesäte Zellschicht mechanisch mit Hilfe von Pipettenspitzen oder Skalpell durchtrennt werden. Diese Methode ist allerdings nicht immer einheitlich reproduzierbar, da die Breite des „Scratches“ zu sehr von verschiedenen Faktoren, wie dem verwendeten Material oder der individuellen Druckkraft beim Durchtrennen, abhängig ist. Eine weitaus schonendere Methode mit geringerem – ungewolltem - Schaden an der Zellschicht und besserer Reproduzierbarkeit bietet der Einsatz von Zellkammer-Einsätzen. In diesem Fall wird von vornherein eine Lücke in der Zellschicht geschaffen und der Einsatz nach Anwachsen der Zellen entfernt (Jonkman 2014). In der hier beschriebenen durchgeführten Studie wurde deshalb diese Methode angewandt.

Unter sterilen Bedingungen wurde pro Vertiefung einer 24-Well-Platte ein Zwei-Kammer-Einsatz (ibidi, Planegg, culture inserts 2 well) platziert. Nach Trypsinierung (Trypsin EDTA Solution, Biochrom) und Zellzählung im Casy-Counter (Casy TT, Omni Life Science Deutschland) wurden Fibroblasten der Linie HS-27 in DMEM high Glucose mit 5% FCS als Medium in die Kammern pipettiert. Die Zellzahl betrug dabei 5000 Zellen/Vertiefung im ersten Durchlauf und 10000 Zellen/Vertiefung im Zweiten. Pipettiert wurden 70µl pro Vertiefung. Anschließend wurden die Zellen bei 37° inkubiert. Die Änderung der Zellzahl wurde aufgrund fehlender Zellkonfluenz im ersten Durchlauf vorgenommen. Nach Kontrolle der Zell-Konfluenz wurden die Kammern entfernt und die Zellen mit je 500µl PBS gewaschen. Hinzugegeben wurden nun die jeweiligen Proben in DMEM high Glucose mit 5%FCS als Medium. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung der Wundsekrete und Blutseren jedes Patienten. Als positive und negative Referenz kam DMEM mit 10%FCS sowie DMEM ohne FCS zum Einsatz.

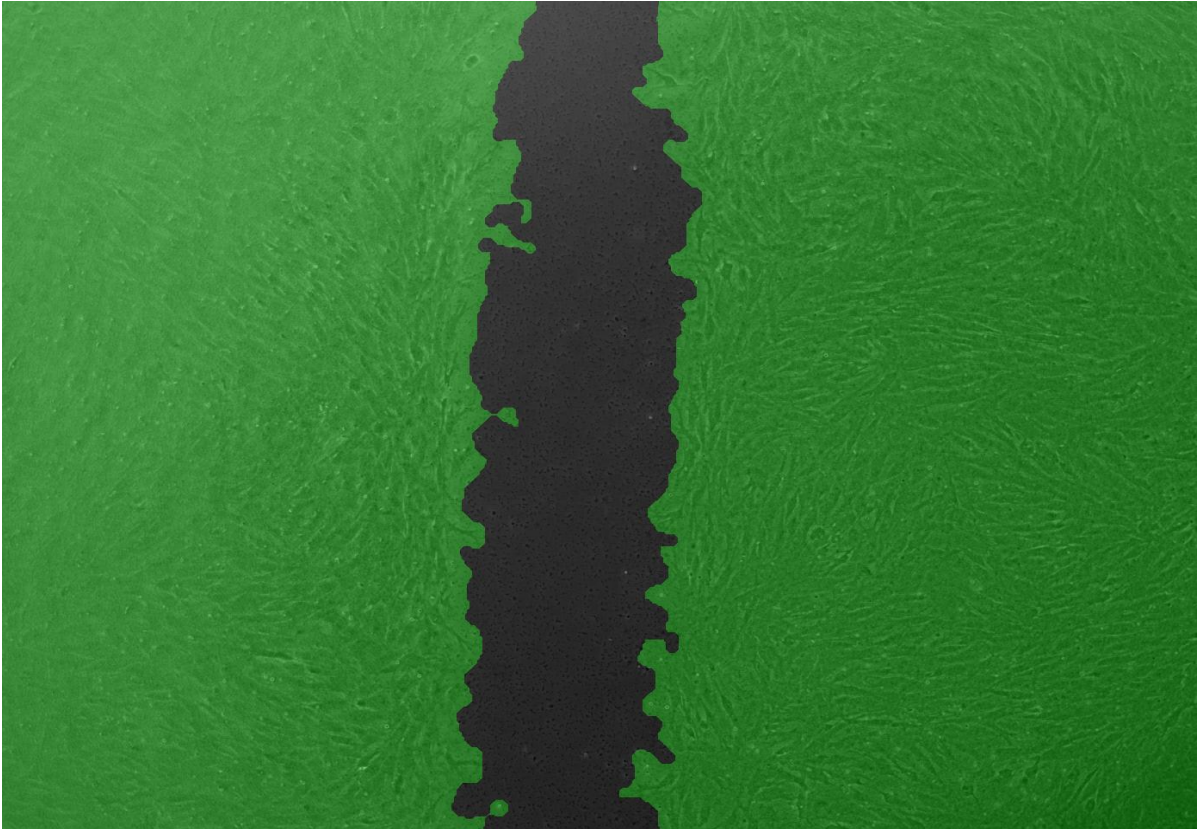


Abbildung 5 Scratch Fläche bei geringer Zellmigration

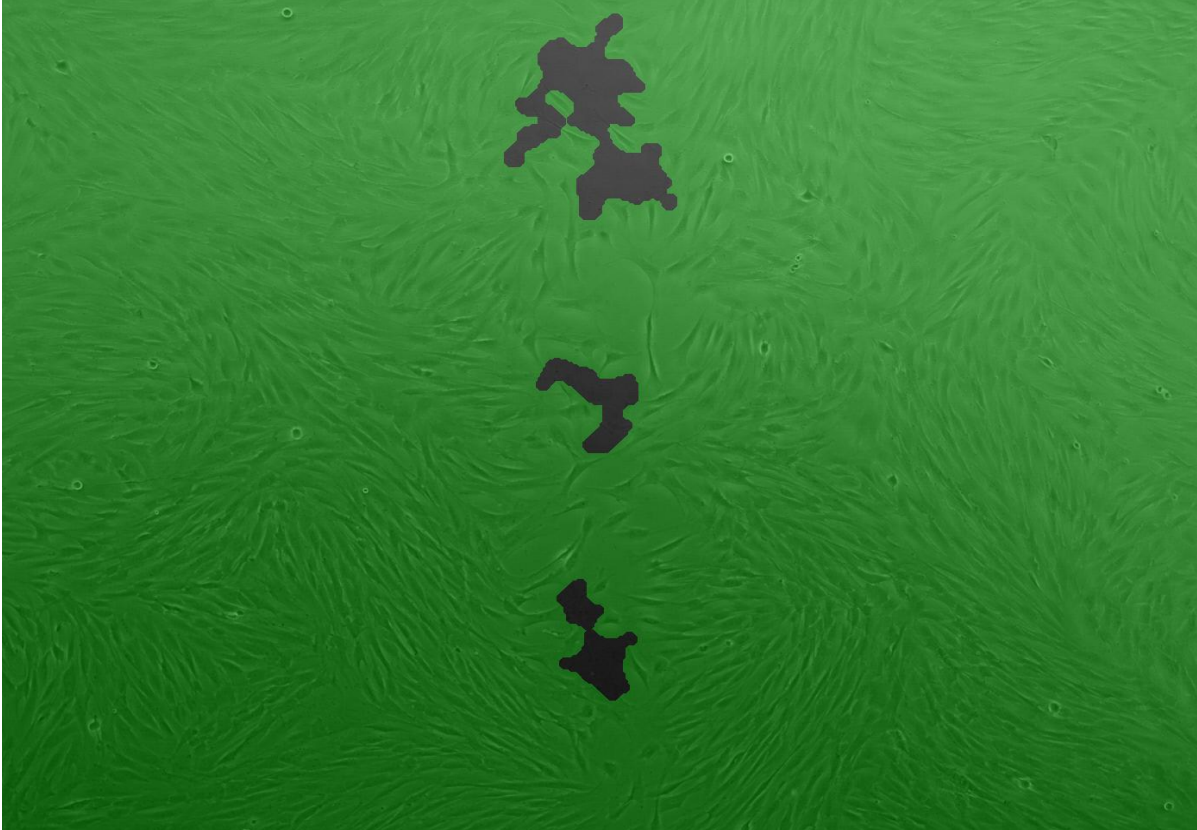


Abbildung 6 Scratch Fläche mit starker Zellmigration und beinahe vollständigem Spaltverschluss nach 10 Stunden Inkubation

In der ersten Versuchsreihe wurde die Zellen nach 24 Stunden mit 3,7% Formaldehyd (Otto Fischer GmbH&Co, Saarbrücken) fixiert und folgend nach Giemsa (Stammlösung Firma Roth, Karlsruhe) gefärbt. Abschließend erfolgte die Aufnahme der Bilder. Diese ließen allerdings eine fast vollständige Zellkonfluenz im Scratch erkennen und wurden deshalb nicht ausgewertet. In der zweiten Versuchsreihe wurden die Bilder bereits nach 10 Stunden ohne Fixierung aufgenommen. (Mikroskop Avio Observer®, Zeiss Oberkochen; Fotos mit Axiovision Software, Zeiss) Die Ausmessung und Auswertung der Bilder erfolgte durch die Software Wimasis (Wimasis Image Analysis®, Onimagin Technologies SCA, Córdoba, Spanien)

5.4.2 Tube-Formation-Assay

Zur Beobachtung der Angiogenese in vitro wurde ein Tube-Formation-Assay durchgeführt. Grundlage des Assays bildet der durch Hypoxie induzierte gesteigerte Sauerstoffmetabolismus in sich erneuerndem Gewebe (beispielsweise bei der Wundheilung). Die Aktivierung Hypoxie-Induzierbarer-Faktoren (HIFs) hat die Stimulation von Wachstumsfaktoren (VEGF, PDGF, EPO) zur Folge, wodurch die Bildung neuer Blutgefäße in Gang gebracht wird. Als ersten Schritt der Neovaskularisierung lässt sich die Zellteilung und anschließende Zellmigration beobachten, wobei die Anordnung um ein zentrales Lumen (Tube Formation) erfolgt (Endler 2013).

Vorbereitend für den Angiogenese-Assay wurde am Vorabend Matrigel (Corning Incorporated, USA) aufgetaut und Angiogenese-Platten (Ibidi 1µl Angiogenese-Slides) sowie Pipettenspitzen vorgekühlt.

In jede Vertiefung der Angiogenese-Platte wurden unter Verwendung eines Kühlblocks als Unterlage 10µl Matrigel pipettiert. Anschließend wurden die Platten für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden die Endothelzellen (HUVEC promocell®, Nr.420z0115.2) trypsiniert und im Casy Counter (Casy TT®, Omni Life Sciences, Germany) gezählt. Vorbereitet wurde eine Zellsuspension mit 400000 Zellen/ml in RPMI-Medium (Biochrom, Germany) in Versuchsreihe 1 und dieselbe Zellzahl in AIMV-Medium (Gibco®, Thermo-Fischer Scientific, Germany) in Versuchsreihe 2. Die Wundsekrete und Blutseren wurden 1:10 im jeweiligen Medium verdünnt. Als

Kontrollen dienten RPMI, RPMI mit 10%FCS, AIMV sowie ECGM2 (Endothelial Growth Medium, promocell®, Germany, Heidelberg). Die erste Versuchsreihe wurde aufgrund mangelnder Tube-Bildung im RPMI-Medium verworfen. Deshalb erfolgte im zweiten Durchlauf der Wechsel auf AIMV-Medium.

Nach einer Stunde wurden je 25µl Zellsuspension und 25µl der verdünnten Proben auf das Matrigel pipettiert, sodass die Proben eine Endkonzentration von 1:20 aufwiesen.

Die Angiogenese-Platten wurden anschließend nach drei und sechs Stunden Inkubationszeit mikroskopisch kontrolliert. Nach sechs Stunden wurden je Vertiefung 25µl abpipettiert und mit 25µl Calcein (Calcein AM ®, Thermo-Fischer Scientific, Germany) in PBS (1:4000) ersetzt. Hierdurch erfolgte eine grüne Fluoreszenzfärbung der Zellen. Den letzten Schritt des Versuchs stellten nach zweiminütiger Inkubation die Fotos in 50facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Avio Observer, Carl Zeiss Jena GmbH, Germany) dar. Auch hier erfolgte die Auswertung mit der Software Wimasis®.

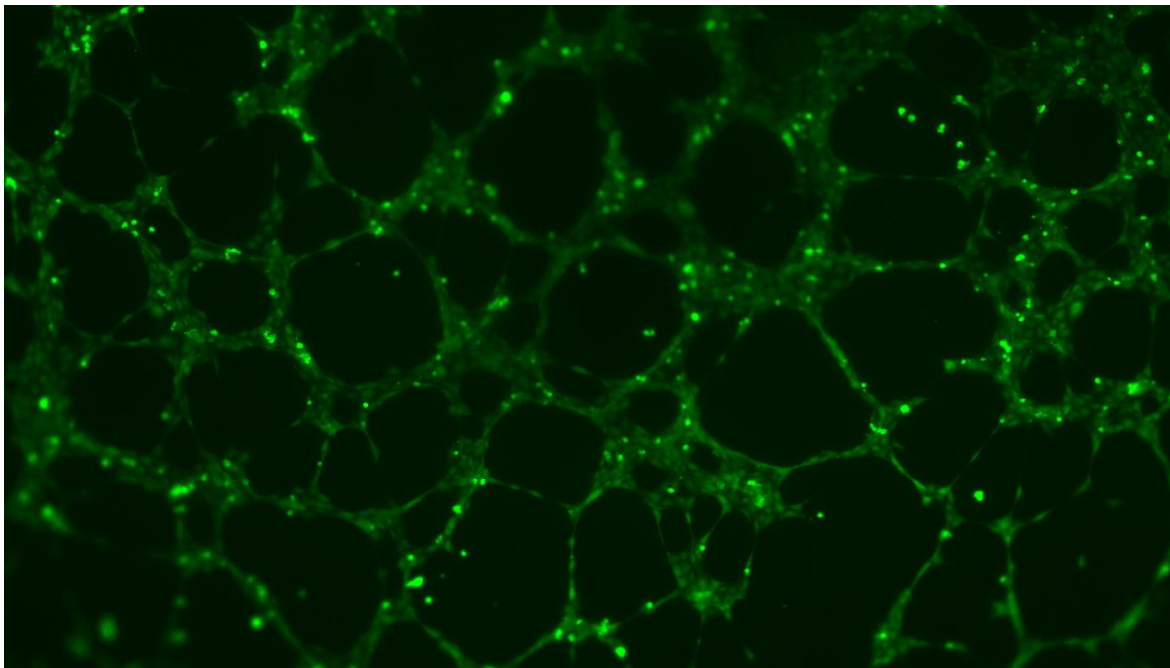


Abbildung 7 Vernetzung der Endothelzellen mit Netz- und Tubebildung unter dem Fluoreszenzmikroskop

5.4.3 Alamarblue-Assay

Grundlage des Alamarblue-Assays ist der Einsatz des Farbstoffes Resazurin (blau), dessen Reduktion durch mitochondriale Enzyme zu Resorufin (rot) für einen Farbumschlag sorgt. Resorufin zeigt eine stark fluoreszierende und somit messbare Emission und kann als Maß für die metabolische Situation und Viabilität der Zellen angesehen werden (Zachari 2013).

Für den Alamarblue-Assay erfolgte die Einsaat von Fibroblasten der Linie HS-27 in DMEM mit 5%FCS in eine 96-Well-Platte. In Versuchsreihe 1 betrug die Zellzahl 4000/Vertiefung, in Versuchsreihe 2 die Hälfte (2000/Vertiefung). Pipettiert wurden jeweils 200µl Zellsuspension. Bis zum Folgetag wuchsen die Zellen im Inkubator an. Aufgrund zu hoher Zellkonfluenz im ersten Durchlauf wurde die Zellzahl für die zweite Versuchsreihe halbiert. Dasselbe gilt für die Zellzählung im Casy-Counter.

Die Patientenproben wurden wie auch bei allen anderen Versuchen 1:20 in DMEM mit 5% FCS verdünnt. Als Positivkontrolle dienten HS27-Fibroblasten in DMEM mit 10% FCS, als Negativkontrolle in reinem DMEM. Als Leerkontrolle wurde DMEM mit 5% FCS ohne Zelleinsaat verwendet.

Das Medium wurde von den Zellen entfernt, diese wurden mit PBS gewaschen und anschließend je Vertiefung mit 200 µl der Patientenproben oder Kontrollen versehen.

Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurden 100µl aus jeder Vertiefung in eine neue 96-Well-Platte überführt. Diese Platte wurde bei 4°C gelagert und diente später dem LDH-Assay, der im Folgenden noch beschrieben wird. Für das weitere Verfahren des Alamarblue-Assays (Sigma-Aldrich, Germany) erfolgte ein Absaugen des Mediums, einmaliges Waschen mit PBS, ein Medienwechsel und anschließendes Zugabe von jeweils 10µl Alamarbluereagenz. Nach einer und nach zwei Stunden wurde die Emission im Mithras Reader (LB 940 Berthold Technologys, Germany) bei Ex560nm und Em590nm gemessen und die Daten mit dem Programm MicroWin 2000® (Reader Mithras, Berthold Technologys, Germany) erfasst.

5.4.4 LDH-Messung

Die Laktatdehydrogenase ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das bei Schädigung der Plasmamembran freigesetzt wird (Chan 2013). Das LDH-Level kann somit repräsentativ für die zytotoxische Aktivität angesehen werden (Decker 1988). Der LDH-Assay beruht auf der Umwandlung von Laktat in Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase unter Reduktion eines NAD (Nikotinamid Adenin Dinukleotid) zu NADH+H im ersten Schritt und der Reduktion von Tetrazoliumchlorid (blasses Gelb/farblos) zu Formazanchlorid (rot) unter Oxidation des NADH+H zurück zu NAD. Diese Reaktion kann über den damit verbundenen Farbumschlag spektrografisch gemessen werden (Chan 2013).

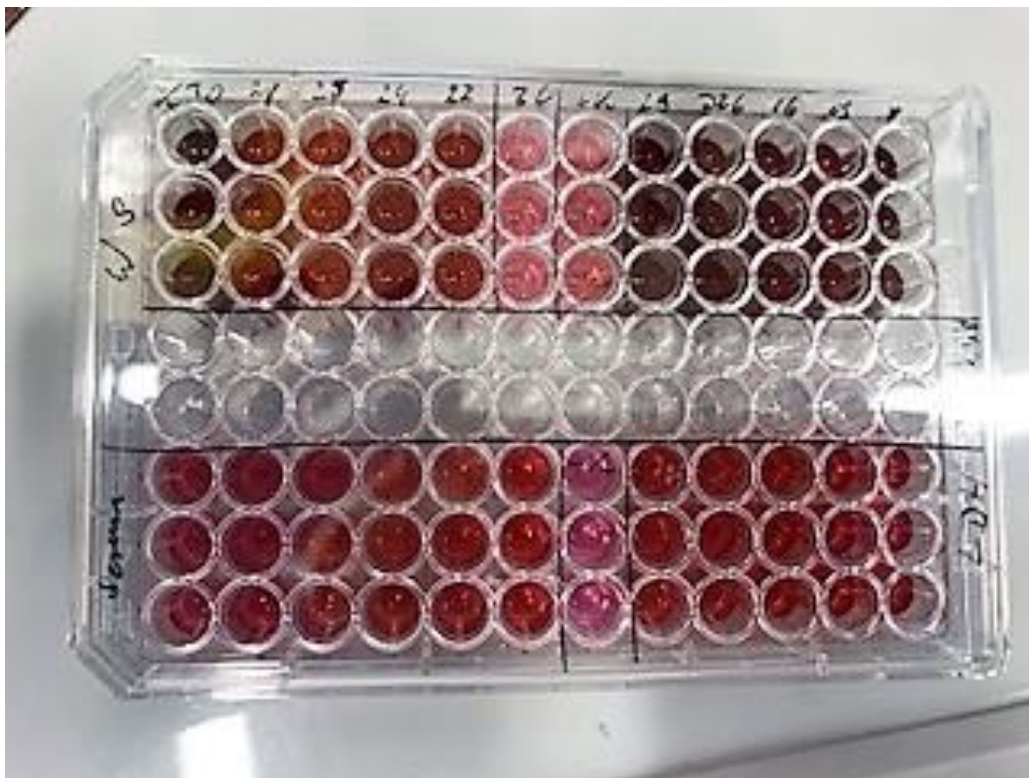


Abbildung 8 Farbumschlag beim LDH-Assay durch Formazan

Für den Versuch wurden die Farbstofflösung sowie der Katalysator (Cytotoxicity Detection Kit® (Dyesolution und Catalyst) von Roche) nach Herstellerangaben aufgetaut und der Katalysator zusätzlich mit 1ml Reinstwasser (Labor-interne

Herstellung) versetzt. Direkt vor Gebrauch wurden 2,5µl des Katalysators mit 112,5µl der Farbstofflösung gemischt und je Vertiefung 100µl dieser Lösung in die im Zuge des Alamarblue-Assays angefertigte 96-Well-Platte gegeben.

Die Platte inkubierte für dreißig Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Ablauf der Zeit wurde die Formazan-Emission im Reader-Mithras (LB 940 Berthold Technologys, Germany) bei 490nm gemessen.

5.4.5 Zellzählung im Casy Counter

Einen Überblick über die Zellzahl und Zellviabilität gibt die Zählung der einzelnen Proben im Casy Counter. In 24-Well-Platten wurden je Vertiefung 10000 (Versuchsreihe 1) beziehungsweise 5000 (Versuchsreihe 2) HS27-FB in DMEM mit 5% FCS eingesät und bis zum Folgetag inkubiert.

Das Medium wurde von den angewachsenen Zellen abpipettiert, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit den Wundsekreten und Blutseren in einer 1:20 Verdünnung in DMEM mit 5% FCS oder den Kontrollen (DMEM mit 10%FCS, reines DMEM) versehen. Die Platten wurden für sieben Tage bei 37°C inkubiert.

Nach einer Woche erfolgte die Abnahme der Medien, zweimaliges Waschen mit PBS und das Ablösen der Zellen mit Trypsin (Trypsin EDTA Solution®, Biochrom, Germany). Der Vorgang wurde durch Zugabe von PBS mit 10%FCS gestoppt. Das Volumen pro Vertiefung betrug nun 500µl. Davon wurden 200µl in 10ml Casyton (CASYton®, Omni Life Science, Bremen) verdünnt und die darin enthaltenen Zellen im Casy Counter gezählt.

5.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels T-Tests und gepaarter T-Tests. Daraus errechnete p-Werte wurden auf einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ geprüft. Aufgrund der unterschiedlichen Durchführung in den beiden Versuchsreihen bezüglich der

verwendeten Materialien und Zellzahlen pro Well wurden die Ergebnisse der Positivkontrolle der einzelnen Assays auf ein 100% Niveau gesetzt und allen weiteren Resultaten dadurch ein Prozentrang zugeteilt, sodass eine Vergleichbarkeit der beiden Versuchsreihen gewährleistet werden konnte.

6 Resultate

6.1 Wundsekret- und Blutproben

Insgesamt wurden für die Studie 31 Proben von okklusiv verbundenen Spalthautentnahmestellen gewonnen, davon 12 von Patienten mit Diabetes mellitus, die restlichen 19 Proben wurden der Kontrollgruppe ohne der Nebendiagnose Diabetes mellitus zugeordnet. Nach Prüfung der erforderlichen Mengen für beide Testreihen schieden einige Proben aufgrund zu geringer Wundsekretmengen aus. Ursächlich hierfür waren entweder Undichtigkeiten am OV oder eine Wunde mit zu kleiner Fläche um ausreichend Sekret zu produzieren. Weitere Proben mussten wegen Kontamination verworfen werden. Analysiert wurden 22 verwertbare Proben. Die Wundflüssigkeitsmengen betragen zwischen 170µl und 29.000µl mit einem Median von 1000µl. Die Mengen der Blutseren betragen mindestens 1.600µl bis maximal 3.300µl mit einem Median von 2.000µl.

6.2 Einfluss von Wundflüssigkeit von Diabetikern und Nicht-Diabetikern auf Fibroblasten (HS-27)

6.2.1 Einflüsse auf die Zellmigration (Scratch-Assay)

Die erste Versuchsreihe des Scratch-Assays konnte nach 24 Stunden nicht mehr ausgewertet werden, da bereits die gesamte Scratch-Fläche mit Zellen besiedelt war. In der zweiten Versuchsreihe erfolgte die Messung deshalb bereits nach 10 Stunden. Die Auswertung des Scratch-Assays erfolgte zum einen über die Messung der noch freien Fläche des ursprünglichen Scratches (scratch area), zum anderen über die Messung der bereits von Zellen bewachsenen Fläche (cell covered area). Beide Werte zeigen eine signifikante, stark erhöhte in-vitro Zellmigration der HS-27 Fibroblasten unter Einfluss der diabetischen Wundsekrete im Vergleich zu den Wundsekreten der Kontrollgruppe (scratch area $p=0,0006$, cell covered area $p=0,0006$). Signifikant erhöht ist auch die Zellmigration der Wundsekrete insgesamt im Vergleich zu den Blutseren ($p=0,0002$).

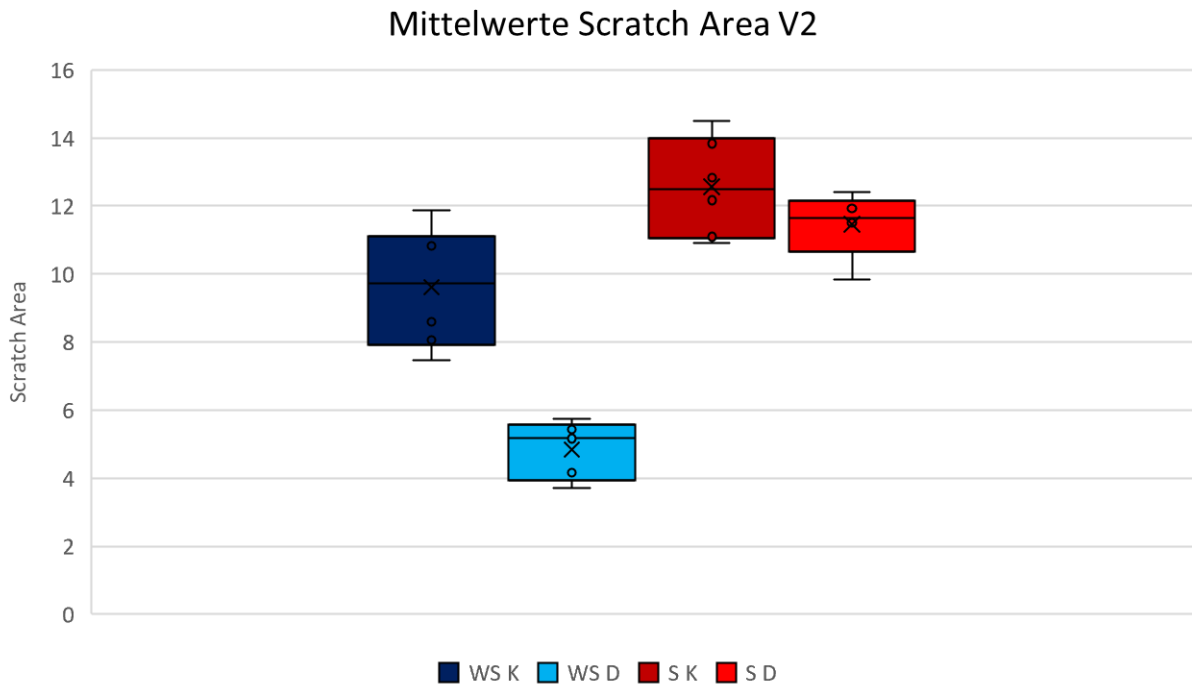


Abbildung 9 Mittelwertverteilung der verbleibenden Scratch Flächen der beiden Versuchsgruppen (K=Kontrollgruppe, D=Diabetiker) unter Einwirkung von Wundflüssigkeit (WS) oder Blutserum (S) ± Standardabweichung

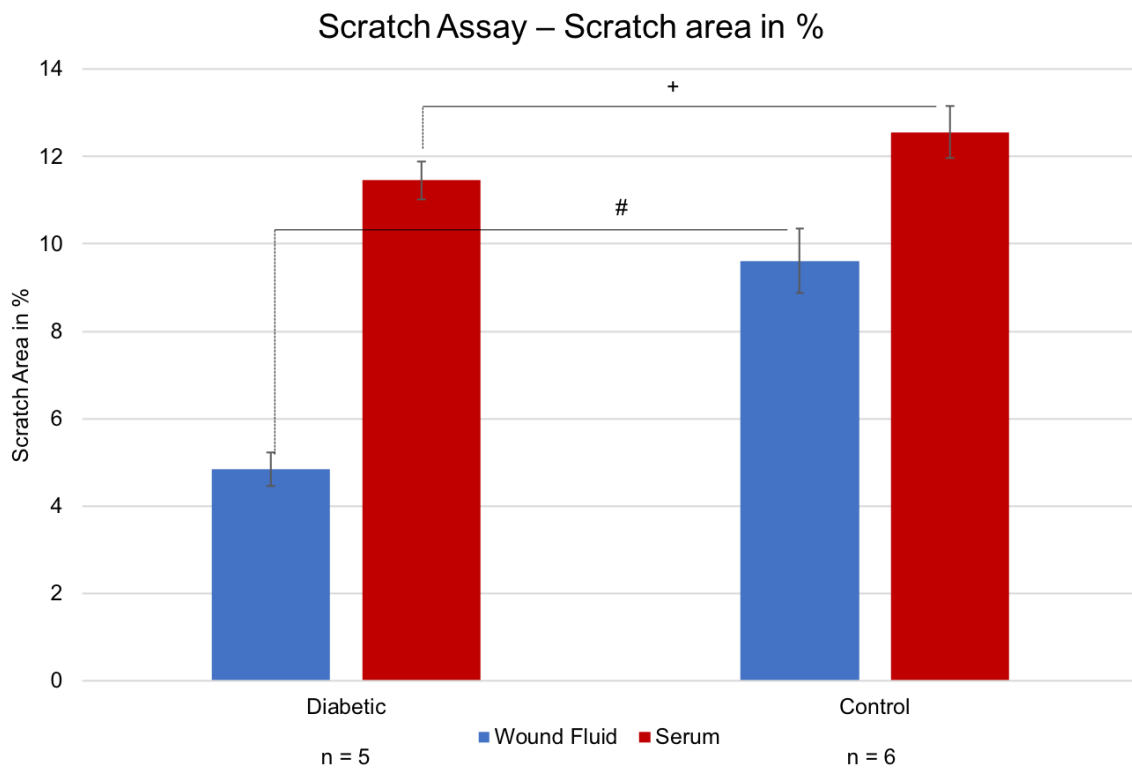


Abbildung 10 Restliche Scratch-Fläche nach 10 stündiger Migration von HS-27 Fibroblasten unter Einwirkung von diabetischen und nicht diabetischen Wundsekreten sowie den jeweils zugehörigen Blutseren.

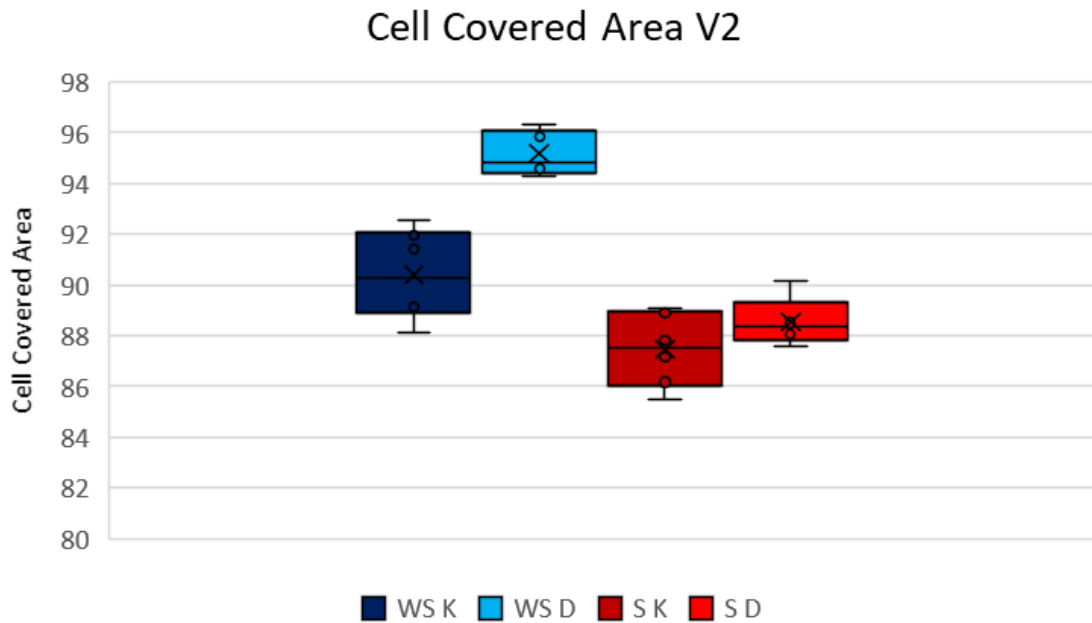


Abbildung 11 Mittelwertverteilung der mit Zellen bedeckten Fläche der beiden Versuchsgruppen (K=Kontrollgruppe, D=Diabetiker) unter Einwirkung von Wundflüssigkeit (WS) oder Blutserum (S) ± Standardabweichung

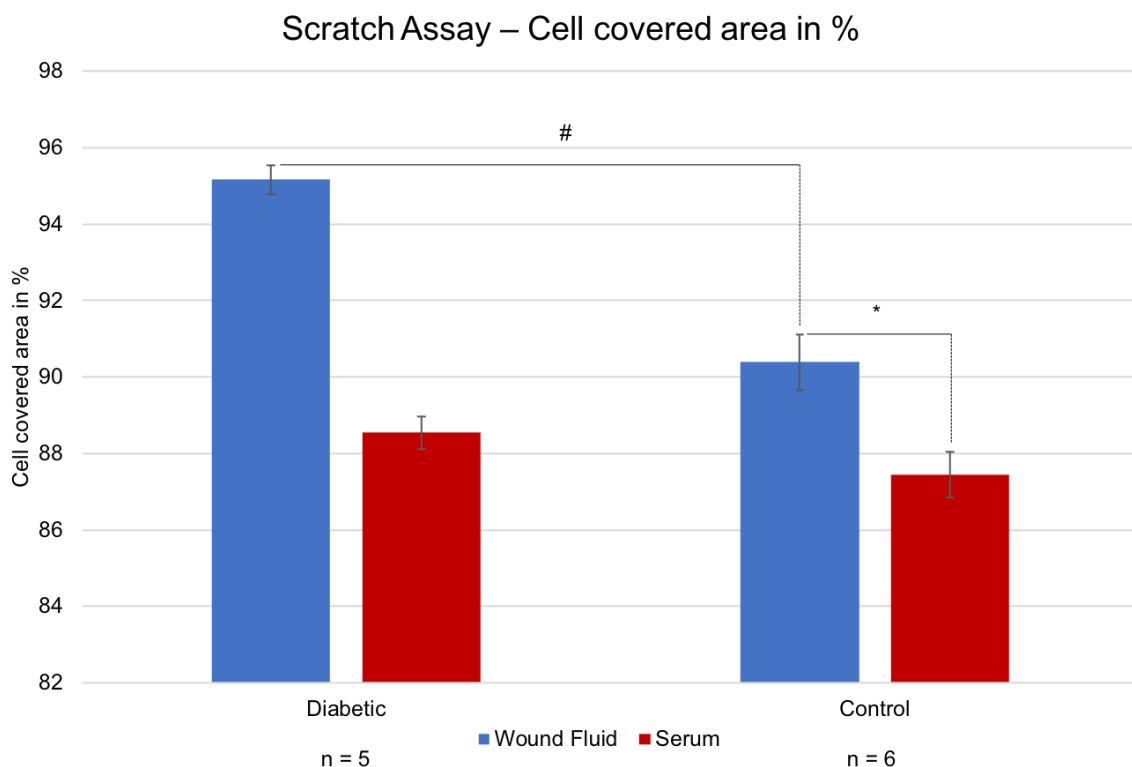


Abbildung 12 Mit Zellen bedeckte Fläche nach 10 stündiger Migration von HS-27 Fibroblasten unter Einwirkung von diabetischen und nicht diabetischen Wundsekreten sowie den jeweils zugehörigen Blutseren

6.2.2 Einflüsse auf den Zellmetabolismus (Alamarblue-Assay)

Bei der Auswertung des Alamarblue-Assays konnten in keiner der beiden Versuchsreihen signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Der Zellmetabolismus wies keine deutlichen Unterschiede zwischen den Wundsekreten der Diabetiker und den Wundsekreten der Kontrollgruppe auf ($p=0,099$). Es ließ sich lediglich ein Trend feststellen, der einen geringeren Metabolismus der HS-27 Fibroblasten unter Einfluss des diabetischen Wundsekrets erkennen ließ.

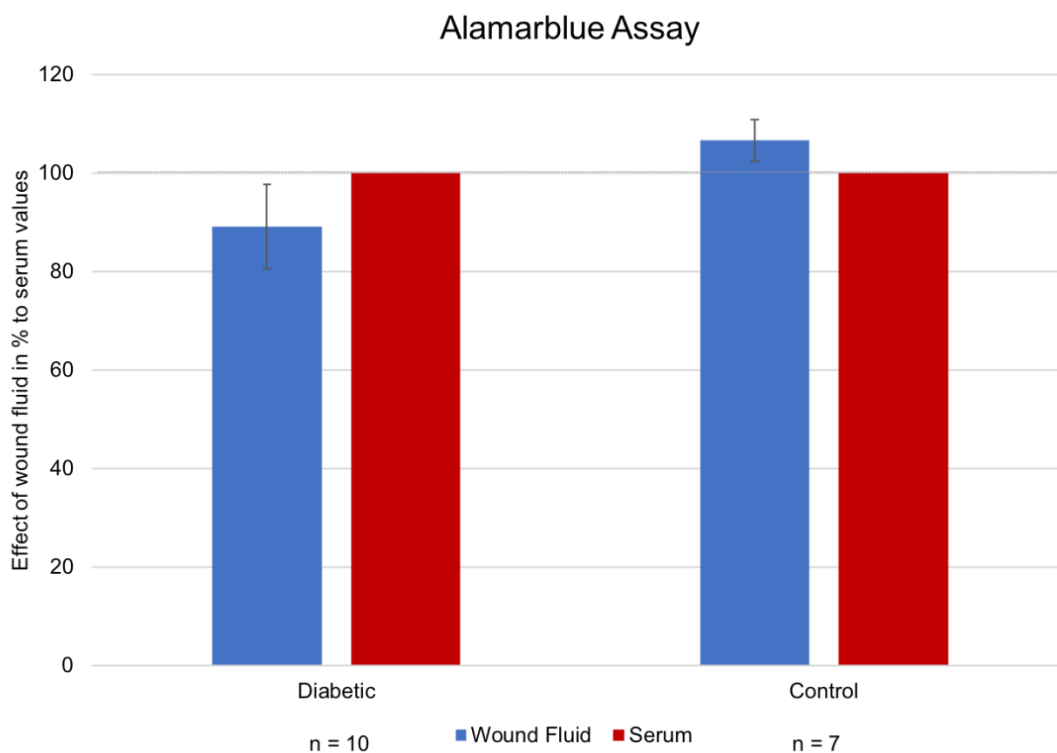


Abbildung 13 Mittelwerte der gemessenen Emission \pm Standardabweichung nach 3 Tagen Inkubationszeit. Gezeigt werden die Wundsekrete beider Gruppen im Vergleich zu den zugehörigen Blutseren. Diese wurden auf ein 100% Niveau gesetzt.

6.2.3 Einflüsse auf die Zytotoxizität (LDH-Assay)

Die Messung der LDH-Emission der Fibroblasten unter Einfluss der Wundsekrete wies in der Diabetiker Gruppe auf eine erhöhte Zytotoxizität hin, jedoch ließen sich keine

signifikanten Unterschiede zwischen der Diabetiker-Gruppe und der Kontrolle finden ($p=0,83$). Die Wundsekrete beider Gruppen verglichen mit den Blutseren beider Gruppen wiesen in beiden Versuchsreihen eine signifikant erhöhte LDH-Emission und somit eine erhöhte Zytotoxizität auf (V1 $p=0,0000009$, V2 $p=0,000003$).

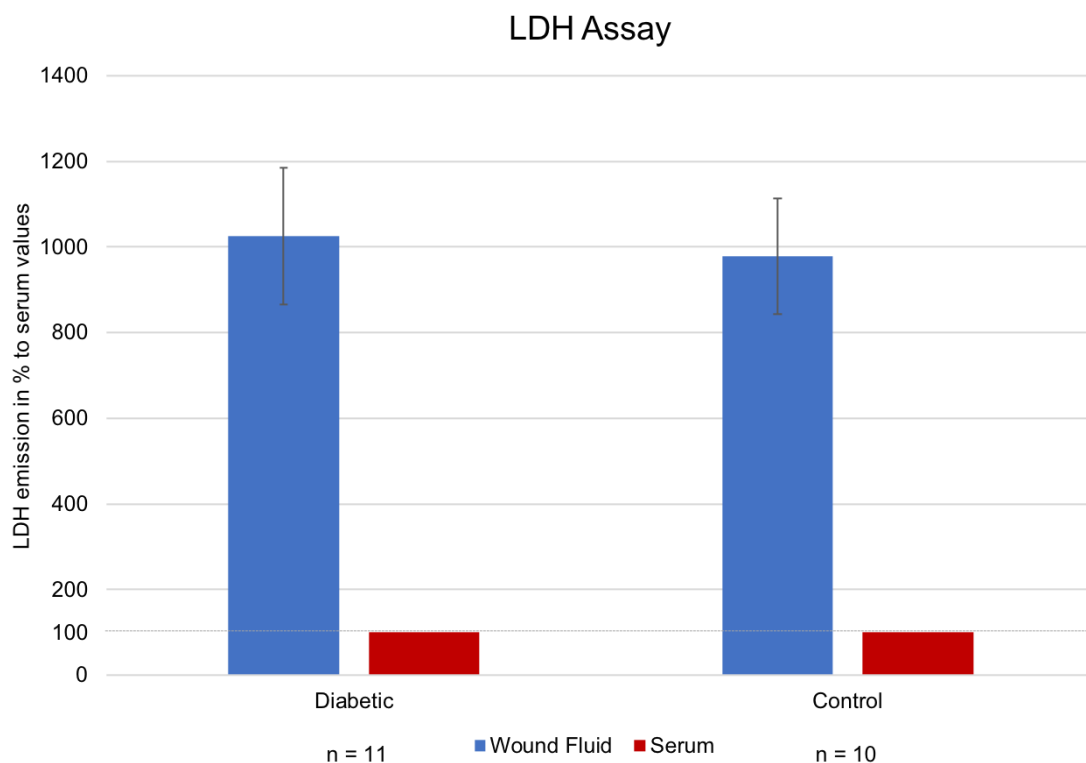


Abbildung 14 Zytotoxizität der Fibroblasten beider Gruppen (Diabetiker links, Kontrolle rechts) verglichen mit den jeweiligen Blutseren, die auf ein 100% Niveau gesetzt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung

6.2.4 Einflüsse auf die Zellzahl und Zellviabilität (Casy-Counter)

Die Ergebnisse des Casy-Counters konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Wundsekrete von Diabetes- und Kontroll-Patienten liefern, weder die Zellzahl betreffend ($p=0,24$) noch bezüglich der Viabilität der Zellen ($p=0,76$).

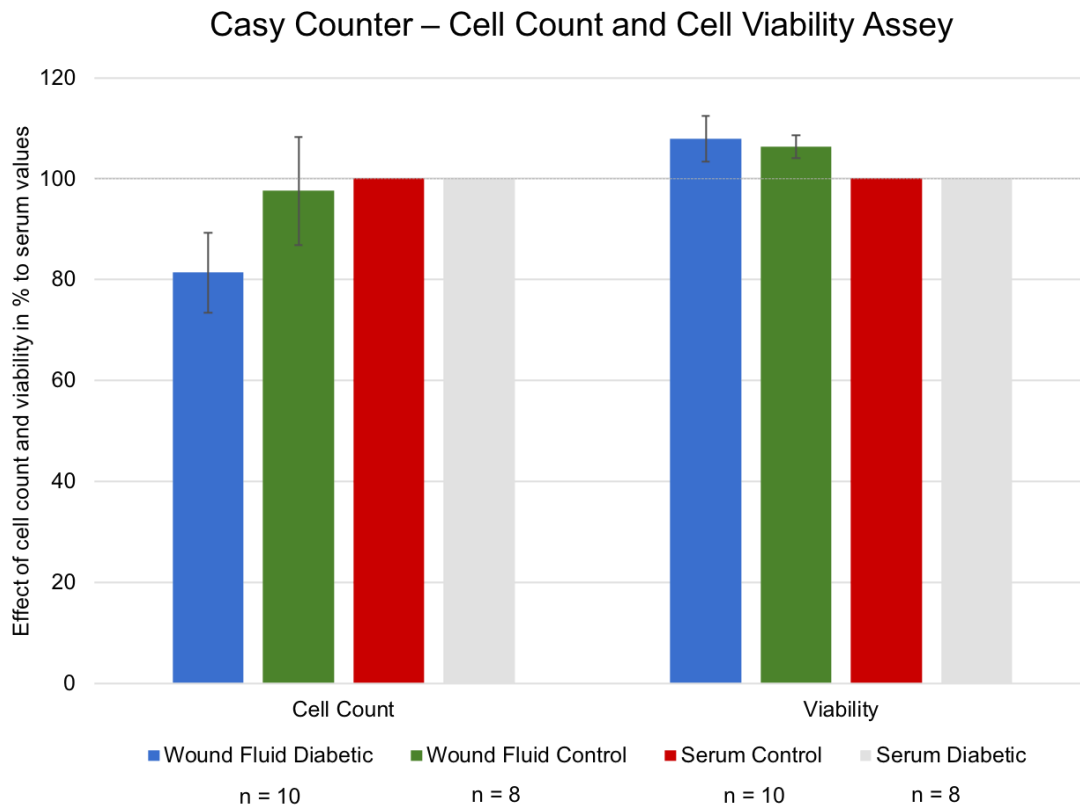


Abbildung 15 Darstellung der Zellzahlen und Zellviabilität nach 7 tägiger Inkubationszeit mit diabetischem Wundsekret und Wundsekret der Kontrollgruppe verglichen mit den auf ein 100%-Niveau gesetzten Blutseren ± Standardabweichung

6.3 Einfluss von Wundflüssigkeit von Diabetikern und Nicht-Diabetikern auf Endothelzellen (HUVEC) und die Neoangiogenese

Die erste Versuchsreihe des Angiogenese-Assays zur Untersuchung der Gefäßneubildung und Zellformatierung von Endothelzellen (HUVEC) unter Einfluss der Wundsekrete beider Gruppen wurde unter Verwendung von RPMI-Medium durchgeführt. Dies führte allerdings zu fehlender Tube-Bildung bei allen Proben (auch bei der Positivkontrolle), sodass keine Auswertung dieser Versuchsreihe erfolgen konnte. Im zweiten Durchlauf wurde AIMV als Medium verwendet. Signifikante Unterschiede ließen sich hier lediglich bei der Messung der mittleren Länge der Zellgruppierungen zeigen. Im Vergleich der Wundsekrete beider Gruppen bildeten die Zellen mit den Proben der Diabetiker Gruppe signifikant längere Zellformationen (mean length $p=0,035$). Allgemein bildeten die Endothelzellen längere Ketten, wenn

sie mit Wundsekret in Kontakt standen, als unter dem Einfluss der Blutseren ($p=0,032$). Bei der Zählung der gebildeten Schleifen ließ sich ein Trend feststellen, der eine gesteigerte Schleifenbildung unter Einfluss des diabetischen Wundsekrets im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte (total loops $p=0,062$). Weitere Messwerte wie das allgemeine Wachstum der Endothelzellen ($p=0,094$), die Anzahl der gebildeten Schlaufen ($p=0,34$) sowie der Verzweigungspunkte ($p=0,16$) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wundsekreten beider Gruppen.

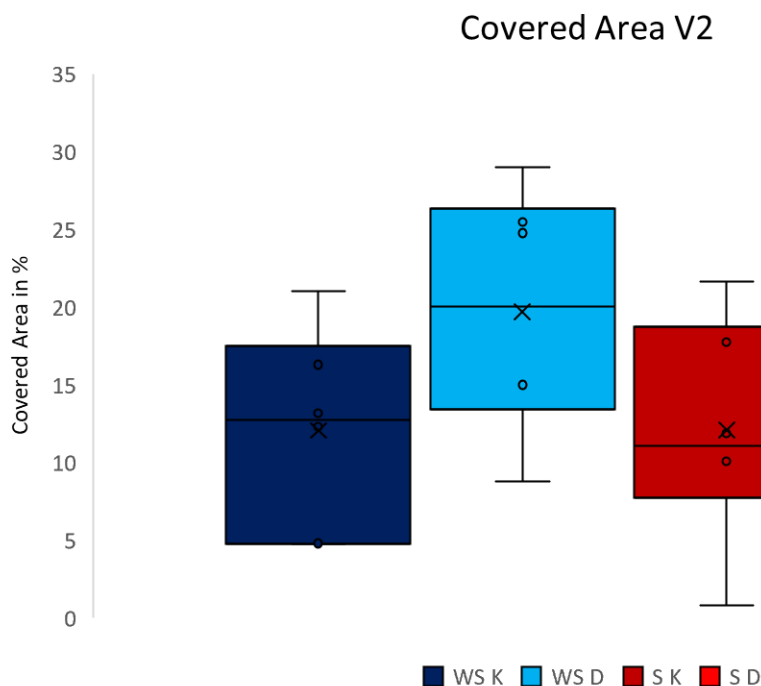


Abbildung 16 Mittelwerte der mit Endothelzellen bedeckten Fläche in % \pm Standardabweichung nach Inkubation mit den Wundsekreten und Blutseren beider Gruppen. Weder beim Vergleich der Wundsekrete miteinander ($p=0,095$), noch beim Vergleich der Wundsekrete mit den Serumproben ($p=0,186$) ergaben sich signifikante Ergebnisse

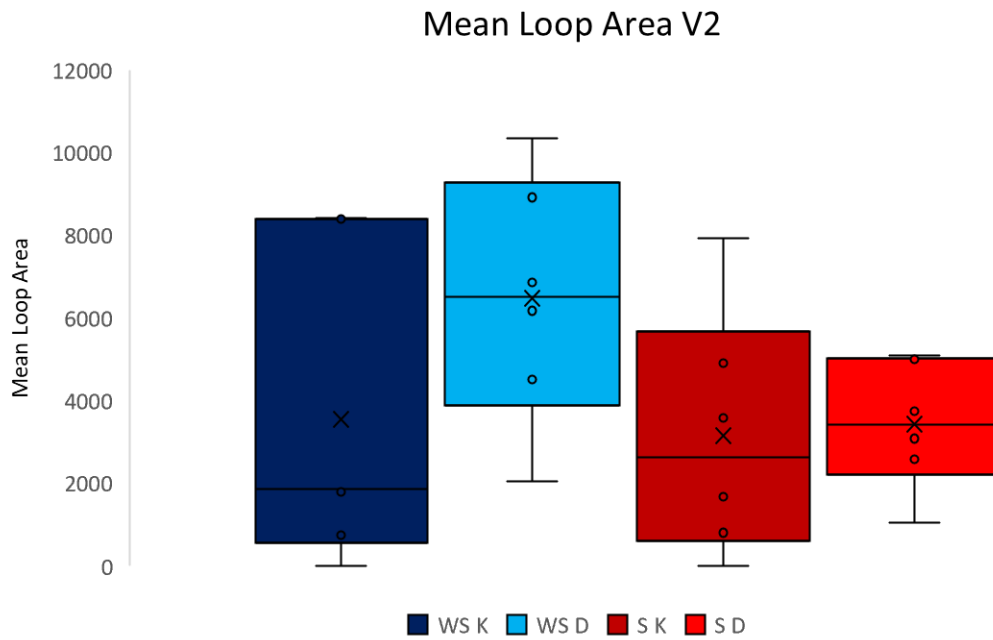


Abbildung 17 Mittelwerte der mittleren Länge der gebildeten Schleifen nach Inkubation mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,173$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Serumproben ($p=0,178$)

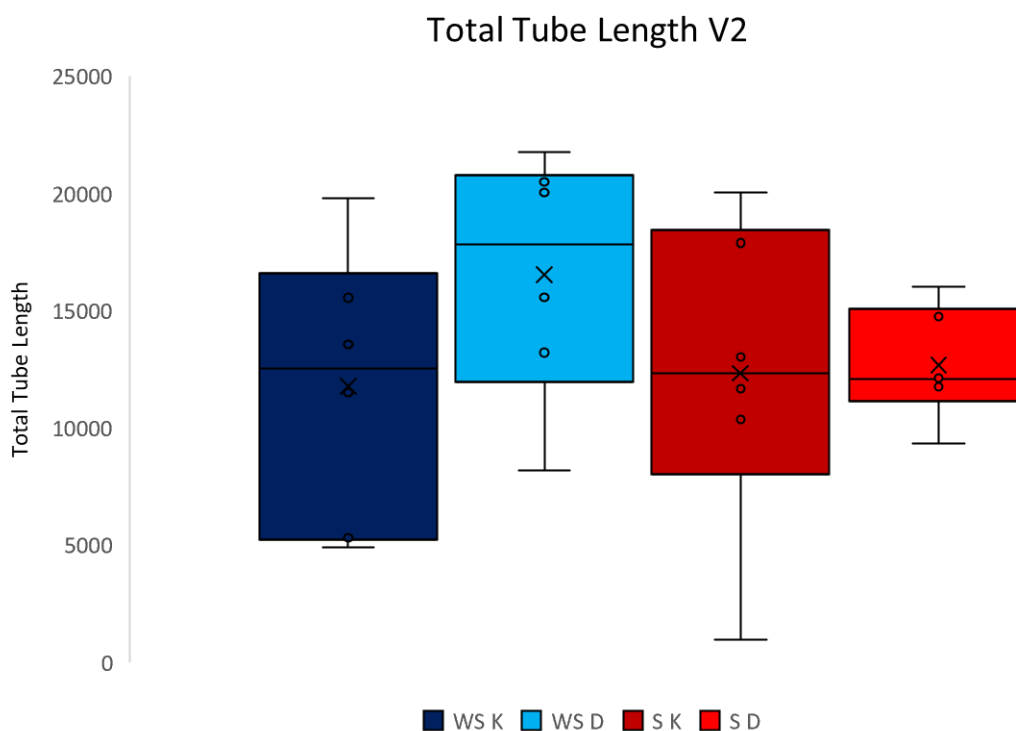


Abbildung 3 Mittelwerte der Länge der gebildeten Röhren nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,168$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,456$).

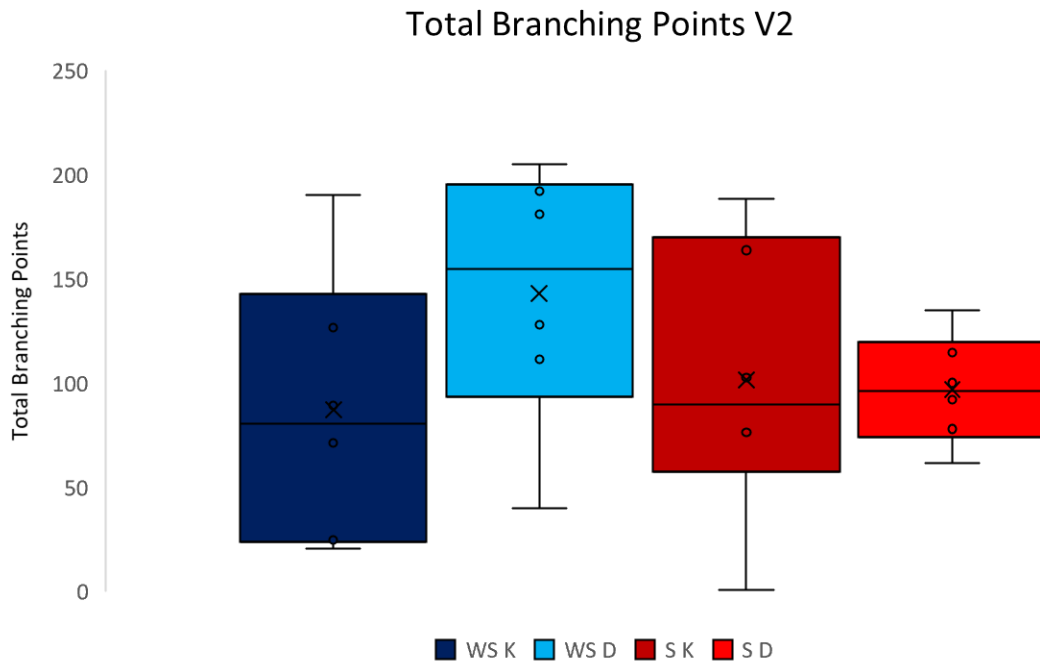


Abbildung 19 Mittelwerte der Anzahl der entstandenen Verzweigungen nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,158$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,515$).

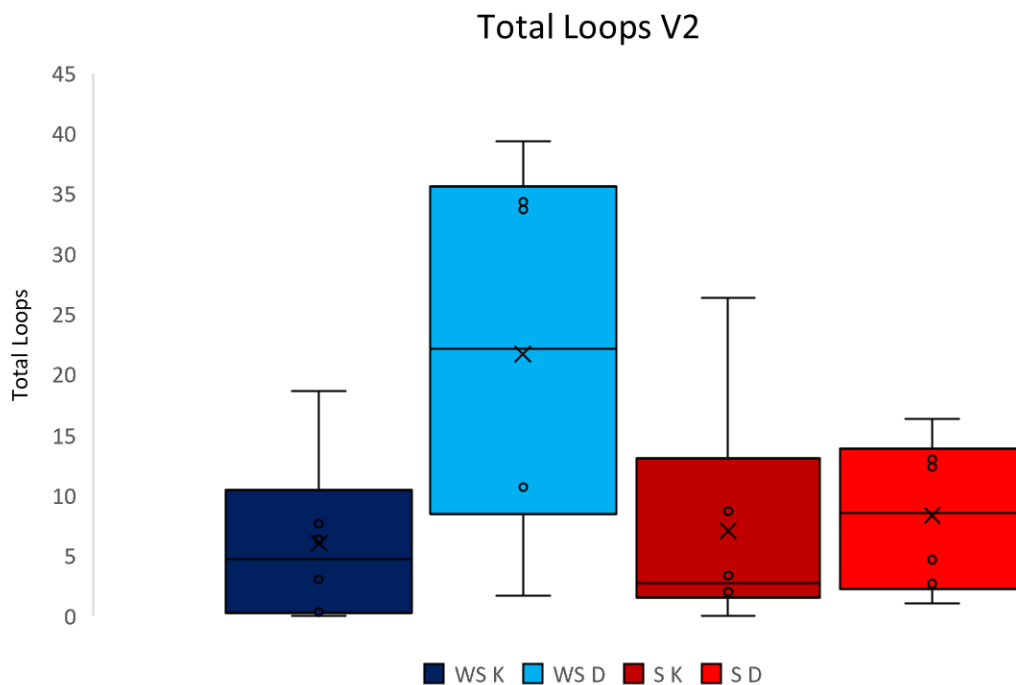


Abbildung 20 Mittelwerte der Anzahl der gebildeten Schlaufen nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,0624$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,208$).

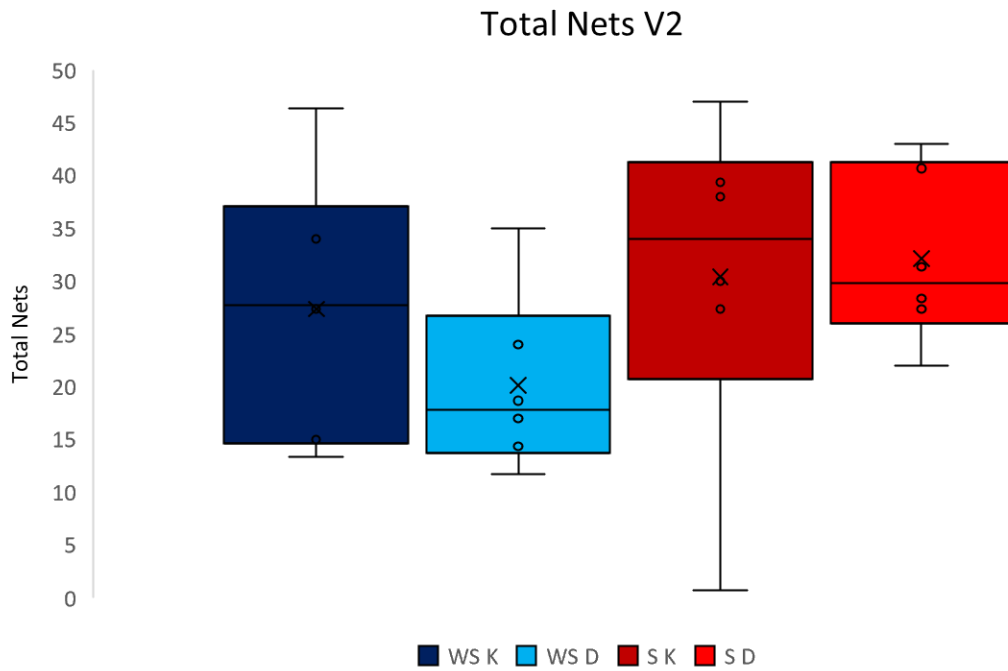


Abbildung 21 Mittelwerte der Anzahl der gebildeten Vernetzungen nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,265$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,123$).

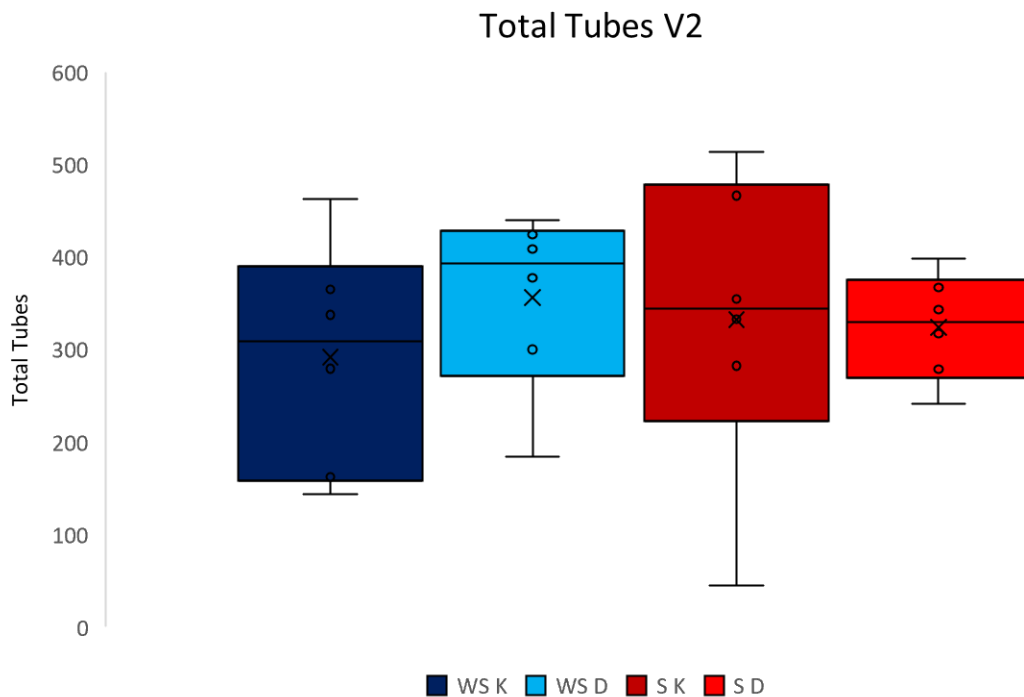


Abbildung 22 Mittelwerte der Anzahl der gebildeten Röhren nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der WS ($p=0,341$) oder im Vergleich der WS mit den Blutseren ($p=0,925$).

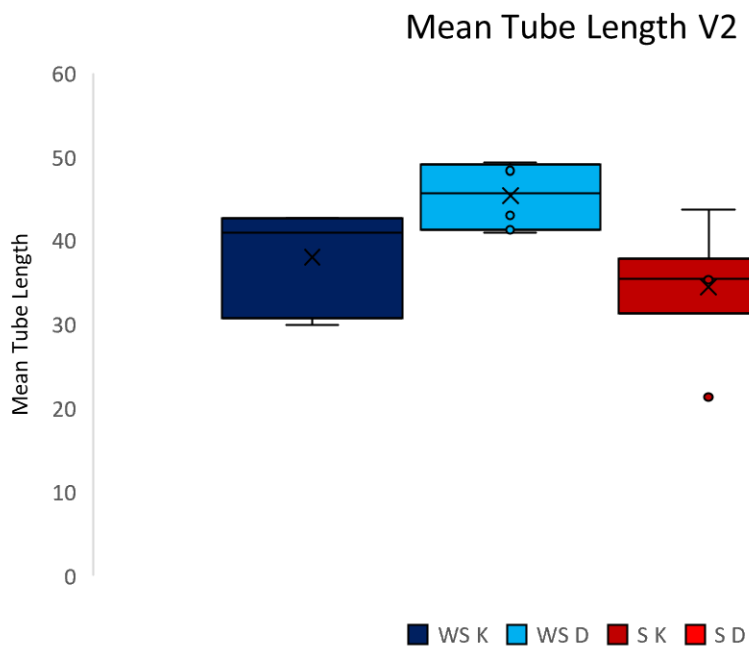


Abbildung 23 Mittelwerte der Mittleren Röhrenlänge nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich signifikante Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete beider Gruppen ($p=0,035$) sowie in Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,032$).

6.4 Zusammenfassung der Einflüsse von diabetischer und nicht-diabetischer Wundflüssigkeit auf Fibroblasten und Endothelzellen

Beim Vergleich der *in vitro* Wundheilung von diabetischen und nicht-diabetischen Wunden unter OV ließen sich einige Trends und signifikante Unterschiede finden. Den am stärksten ausgeprägten Effekt zeigte die Zellmigration im Scratch Assay. Die Fibroblasten, die mit den Wundsekreten der Diabetiker inkubiert wurden, wiesen eine stark erhöhte Migrationsrate im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe auf. Allgemein zeigt sich hier auch der positive Effekt des okklusiven Wundsekrets im Vergleich zum reinen Blutserum, da die Zellen beider Gruppen unter dem Einfluss der Wundflüssigkeit deutlich schneller migrierten. Der Angiogenese-Assays zeigte ähnliche Ergebnisse, bei dem die Endothelzellen unter dem Einfluss des Wundsekrets der Diabetikergruppe signifikant längere Schlaufen bildeten und sich ein Trend zu vermehrter Schleifenbildung feststellen ließ. Auch hier ist der positive Effekt des Wundsekrets im Vergleich zum Blutserum allgemein durch die signifikant erhöhte

mittlere Schlaufenlänge zu erkennen. Ein weiterer Trend zeigte sich im Zellmetabolismus der Fibroblasten, der unter Einfluss des diabetischen Wundsekrets höher ist als bei der Kontrollgruppe. Weitere Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.

7 Diskussion

Okklusivverbände und das dadurch geschaffene feuchte Wundmilieu sind schon lange Gegenstand der Forschung. Inzwischen ist nachgewiesen worden, dass sich durch die Wundflüssigkeit die Heilung von Wunden deutlich verbessern lässt. Positive Effekte lassen sich bezüglich der Reepithelialisierung, der Neoangiogenese, der Wundinfektionen und nicht zuletzt der Schmerzintensität der Patienten zeigen (Alvarez 1983) (Eaglstein 1984) (Dyson 1992) (Wiechula 2003) (siehe Kap. 4.4.2). Die Versorgung von Wunden bei Patienten mit Diabetes mellitus gestaltet sich hingegen oft schwierig und stellt das medizinische Personal vor große Herausforderungen und multiple Probleme. Verzögerte Heilungsverläufe, mögliche Chronifizierung der Wunden und hohe Infektionsraten bis hin zur Amputation sind einige davon (Blakytyn and Jude 2006) (Falanga 2005) (siehe Kap. 4.2.3).

Diese Studie untersucht zum ersten Mal explizit das Verhalten von Fibroblasten (HS-27) und Endothelzellen (HUVEC) unter dem Einfluss von diabetischer Wundflüssigkeit. Mittels in vitro Analyse sollte der bereits bekannte positive Effekt von okklusiven Verbänden auch beim Einsatz bei diabetischen Wunden aufgezeigt werden. Es konnten erste Ansätze und Inspirationen für weitere Studien zur Wundheilung bei Diabetes mellitus geschaffen werden. Die vorliegende in-vitro Analyse kann die heilungsfördernden Effekte des feuchten Wundmilieus auch bei diabetischen Wunden nachweisen und so die Basis für zukünftige (in-vivo) Studien bilden.

7.1 Diskussion von Material und Methoden

Die Wahl der für die Probensammlung geeigneten Wunden fiel auf mit okklusiven Folienverbänden versorgte Spalthautentnahmestellen. Diese bieten ideale Bedingungen zur Probensammlung der Wundflüssigkeit. Zum einen stellt der Oberschenkel eine ebene und wenig bewegte Oberfläche dar, wodurch es selten zu Undichtigkeiten am Verband und somit zum vorzeitigen Wundsekretverlust kommt. Es konnte dadurch bei nahezu allen Probanden genug Material für eine Laboranalyse gewonnen werden. Zum anderen lassen sich die durch die

Spalthautentnahmen entstehenden Wunden gut vergleichen und weisen sehr ähnliche Charakteristika auf, wodurch der Ablauf und die Dauer der Wundheilung bei allen Probanden vergleichbar sind (siehe Kapitel 4.3).

Als Vergleich zum Wundsekret diente eine bei jedem Patienten entnommene Blutserumprobe. Bei der Entstehung von Wunden kommt es zu einer Verletzung der Gefäßkapillaren, wodurch Blut in die Wundregion gelangt. Dieses transportiert die für die Heilung benötigten Zellen und Faktoren zur Wunde und sorgt für den Abfluss schädigender Metabolite. Somit simuliert die *in vitro* Analyse der Blutserumprobe die physiologischen Bedingungen im Wundbett.

Die beiden Zelllinien wurden ebenfalls nach Betrachtung der physiologischen Wundheilungsbedingungen ausgewählt. Sowohl Fibroblasten als auch Endothelzellen sind maßgeblich an der Wundheilung beteiligt. Sie migrieren vor allem in der Granulations- und Proliferationsphase in die Wundregion und sorgen für den Verschluss der Wundoberfläche sowie die Neubildung von Gefäßen (siehe Kap. 4.1.2). Hier ist anzumerken, dass *in-vitro* Analysen im Allgemeinen eine geringere Aussagekraft haben als *in-vivo* Modelle. Der Einfluss auf spezielle Zelllinien lässt sich so jedoch gut untersuchen und es werden Bedingungen geschaffen, die eine gute Vergleichbarkeit der Testgruppen und einzelnen Proben untereinander ermöglichen.

Deshalb sollte in dieser Studie unter anderem der Einfluss der Wundflüssigkeit auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Zellen (HS-27 Fibroblasten) *in-vitro* getestet werden. Die Zellzählung im Casy Counter sorgt hier für einen ersten Überblick über die Zellzahl und Viabilität nach Inkubation mit den jeweiligen Blutseren und Wundsekreten. Der Scratch Assay liefert genauere Informationen über das Migrationsverhalten der Fibroblasten unter dem Einfluss der Wundflüssigkeiten und Blutseren. Der Zellmetabolismus sowie die Zytotoxizität wurden durch Alamarblue- und LDH- Assay untersucht. Hierfür konnten dieselben Well-Platten verwendet werden, was zum einen Probenmaterial für weitere Tests spart und zum anderen gute Voraussetzungen für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bietet.

Die *in vitro* Neoangiogenese durch Endothelzellen konnte im Tube-Formation-Assay simuliert und anhand vielfältiger Parameter ausgewertet werden.

Mit einer Altersverteilung von $62 \pm 11,2$ Jahren in der DM Gruppe und von $57,2 \pm 19,4$ in der Kontrollgruppe ließen sich die Patientenkollektive gut vergleichen, sodass gravierende Altersunterschiede als Störfaktoren nicht zu nennen sind.

Probleme ergaben sich lediglich bei der Sammlung der Proben für die Diabetes-Gruppe, da hier das Patientenkollektiv - Diabetes mellitus mit Spalthauttransplantation - deutlich kleiner war als das der Kontrollgruppe, und bei der die SHT als alleinstehendes Kriterium innerhalb der Altersgrenzen relevant war. So dauerte es einige Zeit, bis genügend Proben für beide Versuchsgruppen gesammelt werden konnten. Einige Proben mussten wegen zu geringer Wundflüssigkeitsmengen (Leckagen am Verband, kleine Spalthauthebestelle) oder Probenkontamination ausgeschlossen werden (10 von 32 insgesamt), was die Anzahl der diabetischen Proben weiter verringerte. Schlussendlich wurden pro Gruppe jeweils 11 Proben analysiert. Eventuell könnte eine zu geringe Probenzahl verantwortlich für verfälschte oder nicht signifikante Ergebnisse sein. Da jedoch einige Versuche im Rahmen dieser Studie deutliche Signifikanzen ergaben, lassen sich die Resultate gut bewerten und können wichtige Anstöße für weitere Analysen und das zukünftige Wissen über die Heilung und Therapie diabetischer Wunden liefern.

7.2 Potentieller Einfluss der Wundflüssigkeit auf Fibroblasten diabetischer Wunden

Fibroblasten sind als Hauptbestandteil des menschlichen Bindegewebes wesentlich an den Reepithelialisierungsvorgängen der Wundheilung beteiligt (Werner, Krieg et al. 2007). Ihre Migration und Proliferation sind maßgebend für die erfolgreiche Deckung von defekter Haut. Durch Sekretion extrazellulärer Matrix und wichtiger Faktoren sind sie für die weitere Wundheilung unabdingbar (Singer and Clark 1999) (Pricolo, Caldwell et al. 1990). Die Untersuchungen in dieser Studie zielen auf des Verhalten der Fibroblasten unter dem Einfluss von Wundflüssigkeit bei DM Patienten ab.

7.2.1 Einfluss auf die Fibroblastenmigration im Scratch-Assay

Mithilfe des Scratch Assays wurde das Migrationsverhalten der HS-27 Fibroblasten analysiert. Allgemein lässt sich in dieser Studie in beiden Gruppen bezüglich der Migration der Fibroblasten ein positiver Effekt des OV auf die Wundheilung zeigen. Im Vergleich der Wundsekrete zum Blutserum ergaben sich signifikant gesteigerte Migrationsraten (siehe Kap. 6.2.1). Diese Ergebnisse können die bisherigen Erkenntnisse vieler bereits durchgeführter Studien bestätigen und reihen sich somit in die Beweiskette ein, dass okklusiv verbundene Wunden schnellere Heilungsverläufe zeigen (Alvarez 1983) (Eaglstein 1984) (Field and Kerstein 1994).

Des Weiteren zeigte sich in der Diabetes-Gruppe eine schnellere Zellmigration im Scratch Assay im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Kap. 6.2.1). Dies könnte ein Hinweis auf den auch bei Diabetikern bestehenden positiven Einfluss der OV auf die Wundheilung sein. Zu erklären ist jedoch die schnellere Migrationsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe, die im Widerspruch zur bisherigen Studienlage zur Beeinträchtigung der Wundheilung bei Diabetikern steht. In einer Studie von Velandar et al. wurde die Auswirkung von Diabetes mellitus auf die Wundheilung am Schweinemodell untersucht. Die den Tieren zugefügten Wunden wurden mit okklusiven Kammern und somit einem feuchten Wundmilieu behandelt. Es wurden drei Gruppen unterschieden: Eine Kontrollgruppe, eine Gruppe mit induziertem DM und eine, deren Wundflüssigkeit mithilfe einer Glucoselösung künstlich in einen hyperglykämischen Zustand versetzt wurde. Die Reepithelialisierung der DM Gruppe verlief wie erwartet signifikant langsamer als die der Kontrollgruppe. Interessant ist jedoch, dass unter Einfluss des hyperglykämischen Wundsekrets der dritten Gruppe eine tendenziell schnellere Deckung der Wundfläche beobachtet wurde als bei der Kontrollgruppe. Die Hyperglykämie scheint also einen steigernden Einfluss auf die Migration und Proliferation der Zellen zu haben und könnte eine Begründung für die Ergebnisse unserer Studie liefern. Die weiteren Störfaktoren, die durch DM verursacht werden und die Wundheilung verzögern sind sowohl in unserer in vitro Analyse als auch in der hyperglykämischen Gruppe der Studie von Velandar et al. ausgeschaltet (Velandar, Theopold et al. 2008).

Einige wenige andere Studien konnten ebenfalls eine schnellere Reepithelialisierung bei Diabetes im Vergleich zu Kontrollen nachweisen. So zum Beispiel in einer Studie

von Park et al.. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede bei diabetischen Mäusen, deren Wunden mit okklusiven Verbänden und zusätzlicher Hinzugabe von Polyethylenglykol (PEG), welches den Transport zellstimulierender Faktoren fördert, behandelt wurden (Park, Teixeira et al. 2014). Die lokal gesteigerte Konzentration von Wachstumsfaktoren scheint also ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Heilung diabetischer Wunden zu haben.

Ein weiterer Ansatz zu Erklärung der vorliegenden Studienergebnisse könnte in der Sauerstoffkonzentration unter OV liegen. Wie bei der Neoangiogenese (siehe folgendes Kap. 7.3) könnte auch hier die Hypoxie unter OV eine wichtige Rolle spielen. So zeigte eine Studie von O'Toole et al. eine gesteigerte Keratinozytenmigration im Scratch Assay unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur Normoxie (O'Toole, Marinkovich et al. 1997). Dieser Effekt scheint auch bei Fibroblasten ausgelöst werden. Die geringen Sauerstoffkonzentrationen unter Semi-/OV könnten also ursächlich für die verbesserte Wundheilung sein, gelten jedoch für die Kontrollgruppe wie für die Diabetes-Gruppe und erklären somit nicht vollständig die geringere Scratch-Fläche bei diabetischen Proben.

Es lassen sich zusammenfassend einige Erklärungsansätze für das scheinbar paradoxe Verhalten der Fibroblasten unter dem Einfluss des diabetischen Wundsekrets finden. Auch wenn die Ursache für die schnellere Zellmigration in der DM Gruppe nicht vollständig aufgeklärt werden kann, so lässt sich doch sagen, dass das feuchte Wundmilieu auch auf diabetische Wunden einen positiven Einfluss hat und der positive Effekt von OV auf die an der Wundheilung maßgeblich beteiligten Fibroblasten allgemein erneut aufgezeigt werden konnte.

7.2.2 Einfluss auf die Fibroblastenviabilität und den Zellmetabolismus

Die Assays zur Untersuchung der Zellzahl, der Zellviabilität (Casy Counter, siehe Kap. 6.2.4) und des Zellmetabolismus (Alamarblue-Assay, siehe Kap. 6.2.2) konnten in dieser Studie keine signifikanten Ergebnisse liefern. Hier scheint der Einfluss auf die Fibroblasten durch diabetische und nicht diabetische Wundflüssigkeit äquivalent zu sein, was wiederum dafürspricht, dass diabetische Wunden gleichermaßen von OV profitieren wie die der Kontrollgruppe. Die weitere Studienlage speziell zur

Untersuchung des Verhaltens von Fibroblasten unter OV bei DM bezüglich ihrer Viabilität und ihres Metabolismus ist wenig erforscht, sodass sich hier keine wesentlichen Referenzen finden oder Parallelen ziehen lassen.

7.2.3 Einfluss auf die Zytotoxizität

Die Zytotoxizität unter dem Einfluss der Blutseren und Wundsekrete wurde mittels LDH-Assay untersucht. Im Vergleich der beiden Gruppen untereinander ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Ein Vor- oder Nachteil der Diabetiker im Vergleich zur Kontrollgruppe lässt sich also nicht feststellen.

Die Wundsekrete beider Gruppen zeigen jedoch eine deutlich toxischere Wirkung auf die Fibroblasten als die gegenüberstehenden Blutseren, sodass die LDH Emission durch die Wundflüssigkeit signifikant höher war (siehe Kap. 6.2.3). Auch frühere Studien zeigten bereits diesen Effekt auf den Zellmetabolismus. Die LDH Konzentration in der Wundflüssigkeit scheint sich gegensätzlich zum Sauerstoffgehalt zu verhalten und ist deshalb deutlich höher als in Blutserumproben, die der physiologischen Normoxie entsprechend besser mit Sauerstoff versorgt sind. Durch die Hypoxie im Wundgebiet entstehen anaerobe Stoffwechselbedingungen, sodass LDH und Laktat gleichermaßen ansteigen. Es wird vermutet, dass durch diese Stoffwechsellaage Fibroblasten stimuliert werden und somit die Wundheilung gefördert wird (Hunt, Conolly et al. 1978) (Lim, Zederfeldt et al. 1969).

7.3 Potentieller Einfluss der Wundflüssigkeit auf Endothelzellen und die Neoangiogenese diabetischer Wunden

Die in dieser Studie in vitro simulierte Neoangiogenese durch Endothelzellen zeigte unter dem Einfluss der DM Wundflüssigkeit eine vermehrte Schleifenbildung im Vergleich zur Kontrolle (siehe Kap. 6.3.). Dieses Ergebnis scheint im Widerspruch zu vielen bisherigen Studien zu stehen, in denen diabetische Wunden eine stark beeinträchtigte Neoangiogenese aufwiesen (Dinh and Veves 2005) (Seitz, Schurmann et al. 2010). Die Ursache für die mangelhafte und langsamere Bildung neuer Gefäße stellt vor allem der Mangel an Makrophagen und somit an

proangiogenetischen Faktoren wie VEGF dar (Okonkwo and DiPietro 2017). Durch die topische Behandlung von diabetischen Wunden mit VEGF konnte dieser Effekt ausgeglichen und die Wundheilung deutlich verbessert werden (Galiano, Tepper et al. 2004). Auch die Hinzugabe von PDGF, welcher unter anderem die Zellmigration und Zellaktivierung während der Wundheilung fördert, verbessert die Heilung diabetischer Wunden. In topischer Therapieform konnte die Anwendung des Wachstumsfaktors bei chronischen Wunden etabliert werden und verbessert nachweislich die Wundheilung (Niezgoda, Van Gils et al. 2005) (Baltzis, Eleftheriadou et al. 2014). Hier könnte eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse unserer Studie anknüpfen, da die für die Neoangiogenese sowie die weiteren Schritte der Wundheilung nötigen Zellen und Faktoren in der Wundflüssigkeit in größerer Zahl vorhanden sind und direkten Einfluss auf die Heilung und Angiogenese nehmen können (Grayson 1993). Es löst jedoch nicht gänzlich die Frage, wie es zu der im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigerten Neoangiogenese bei den diabetischen Proben kommen konnte.

Ein weiterer Ansatz, diese Frage zu klären, könnten vergleichbare Vorgänge wie bei der diabetischen Retinopathie sein. Hier kommt es durch die Manifestation der diabetischen Mikroangiopathie zu vermehrter Gefäßneubildung. Diese retinalen Gefäße weisen jedoch zahlreiche Leckagen auf und sorgen durch ihre Dysfunktionalität für eine zunehmende Hypoxie im retinalen Gewebe. Diese steigert wiederum die Bildung neuer Gefäße, um einer bevorstehenden Ischämie durch Minderperfusion entgegen zu steuern (Patz 1982) (Patz 1980). Durch Okklusion von Wunden entstehen auch hier hypoxische Bedingungen unter dem Verband (Chang, Wind et al. 1996). Diese könnten gemeinsam mit dem erhöhten Glucosespiegel ebenfalls zur gesteigerten Neoangiogenese beitragen. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass durch Hypoxie die Aktivierung der Endothelzellen gefördert wird (Tandara and Mustoe 2004). Ebenso wird die Ausschüttung des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1 α initiiert, wodurch wiederum vermehrt VEGF sezerniert und somit die Neoangiogenese gefördert wird (Liu, Marti et al. 2008). Die geringen Sauerstoffkonzentrationen tragen also wesentlich zum Anstoß zur Gefäßneubildung im Rahmen der Wundheilungskaskade bei (Chen, Yang et al. 2005). Ob diese Gefäße qualitativ ausreichend für eine suffiziente Blutversorgung sind, lässt sich in einer in vitro Analyse allerdings nur schwer nachweisen. Hier kann

lediglich die Quantität der Gefäßschlaufen und -verzweigungen beurteilt werden. Welche Mechanismen genau für die gesteigerte Neoangiogenese verantwortlich sind und von welcher Qualität die gebildeten Gefäße sind, sollte Inhalt zukünftiger Studien sein und durch in-vivo Analysen erforscht werden.

7.4 Ausblick

Die Vorteile des OV bestehend in schnelleren Heilungsraten, geringeren Infektionszahlen, niedrigeren Schmerzniveaus und ästhetisch ansprechenderen Ergebnissen im Vergleich zu herkömmlichen trockenen Verbänden und sind in der bestehenden Literatur vielfach beschrieben (Alvarez 1983) (Winter 1965) (Dornseifer 2009). Die positiven Auswirkungen des feuchten Wundmilieus auf Fibroblasten und Endothelzellen, zwei wichtige Zellreihen im Ablauf der Wundheilungskaskade, konnten erneut gezeigt werden. Die erschwerten Bedingungen in Bezug auf die Wundheilung bei Patienten mit Diabetes mellitus stellen die medizinische Wissenschaft jedoch seit langem vor große Probleme (Martin 2002, Baltzis, Eleftheriadou et al. 2014). Dieser Herausforderung gilt es sich auch in Zukunft mit größtem Nachdruck zu stellen, um unter anderem mit der Wahl des optimalen Verbandmaterials das für den Patienten und das medizinische Personal ideale Ergebnis zu erzielen. Moderne Wundversorgung unter Erhaltung eines feuchten Wundmilieus findet bereits Anwendung in der Versorgung diabetischer Wunden, wie beispielsweise beim diabetischen Fuß. Grenzen sind hier vor allem durch Infektionen im Wundgebiet gegeben und die Auswahl des Verbandes muss in jedem Fall individuell unter Abwägung aller Vor- und Nachteile für den jeweiligen Patienten getroffen werden (Hilton, Williams et al. 2004). Neben rein okklusiven Verbänden kommen auch hydrokolloide Materialien zum Einsatz und konnten gute Ergebnisse erzielen (Cuschieri, Deboz et al. 2013).

Der Forschungsansatz, die bereits bekannten positiven Effekte eines feuchten Wundmilieus auch für die Behandlung diabetischer Wunden zu nutzen wurde somit bereits verfolgt. Wie in der vorliegenden Studie deutlich wird, kann der Einfluss von OV auf die in vitro Wundheilung diabetischer Patienten gezeigt werden. Dennoch werden auch einige Fragen nach den Ursachen und Hintergründen für die, wie oben

beschrieben, teilweise paradoxen Ergebnisse der DM Gruppe im Vergleich zur Kontrolle aufgeworfen. Diese gilt es in zukünftigen Studien sowohl in vitro als auch in vivo zu analysieren und zu untersuchen, um die bereits gewonnenen Erkenntnisse über die Heilung diabetischer Wunden durch Einsatz moderner Wundauflagen zu vertiefen und diese dann in der Folge im klinischen Alltag zu etablieren.

8 Schlussfolgerungen

In dieser Studie konnten die bereits mehrfach gezeigten positiven Effekte der Wundflüssigkeit, die sich unter okklusiven Verbänden sammelt, auf die Wundheilung aufgezeigt werden. Weiterhin lässt sich feststellen, dass okklusive Verbände auch bei diabetischen Wunden regenerative Effekte bewirken bzw. diese ggf. stimulieren können und somit die Wundheilung beschleunigen. Unsere Studie zeigt einen Effekt diabetischer Wundsekrete unter Okklusivverbänden auf die Neoangiogenese durch Endothelzellen sowie die Migration und Proliferation von Fibroblasten. Beide Zelllinien sind wesentlich an der Wund- und Narbenheilung beteiligt und sind v.a. essenziell in der proliferativen Phase der Wundheilung. Zu diskutieren und in weiteren Studien zu erforschen sind die Hintergründe für die bei Diabetikern gesteigerten Effekte bezüglich der Zellmigration und Neoangiogenese. Mögliche Hintergründe könnte der erhöhte Zuckergehalt sein, der den Zellen genügend Grundlage zur Teilung und Migration bietet. Ähnliche Prozesse wie bei der diabetischen Retinopathie könnten ebenfalls beteiligt sein. Auch hier kommt es zur gesteigerten Neoangiogenese, jedoch sind die gebildeten Gefäße durch zahlreiche Leckagen und stark verwinkelte Bauweise weniger funktionstüchtig und führen zu einer Einschränkung der Sehleistung. Zu zeigen wäre also, von welcher Qualität die bei den diabetischen Patienten entstehenden Gefäße sind und ob es sich dabei wirklich um eine bessere und zügigere Wundheilung handelt.

9 Literaturverzeichnis

Alvarez, O. M., Mertz, P.M., Eaglestein, W.H. (1983). "The effect of occlusive dressings on collagen synthesis and re-epithelialization in superficial wounds." *Clinics in dermatology* **2**(3): 107-111.

Amadeu, T. P., A. S. Braune, L. C. Porto, A. Desmouliere and A. M. Costa (2004). "Fibrillin-1 and elastin are differentially expressed in hypertrophic scars and keloids." *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **12**(2): 169-174.

Atiyeh, B. S., Amm, C.A., El Musa, K.A. (2003). "Improved scar quality following primary and secondary healing of cutaneous wounds." *Aesthetic Plastic Surgery* **27**(5): 411-417.

Atiyeh, B. S., El-Musa, K.A., Dham, R. (2003). "Scar Quality and Physiologic Barrier Function Restoration After Moist and Moist-Exposed Dressings of Partial-Thickness Wounds " *Dermatological Surgery*: 14-20.

Baltzis, D., I. Eleftheriadou and A. Veves (2014). "Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights." *Advances in Therapy* **31**(8): 817-836.

Beam, J. W. (2007). "Management of Superficial to Partial-Thickness Wounds." *Journal of Athletic Training* **42**(3): 422-424.

Beer, H. D., Longaker, M.T., Werner, S. (1997). "Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing." *Journal of Investigative Dermatology* **109**(2): 132-138.

Blakytyn, R. and E. Jude (2006). "The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes." *Diabetic Medicine* **23**(6): 594-608.

Boniakowski, A. E., A. S. Kimball, B. N. Jacobs, S. L. Kunkel and K. A. Gallagher (2017). "Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing." *Journal of Immunology* **199**(1): 17-24.

Brem, H. and M. Tomic-Canic (2007). "Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes." *Journal of Clinical Investigation* **117**(5): 1219-1222.

Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." *Nature* **414**: 813–820.

Bundesärztekammer (BÄK), K. B. K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2014). *Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. Version 4. 2013, zuletzt geändert: November 2014.*; DOI: 10.6101/AZQ/000213.

Chaby, G., P. Senet, M. Vaneau and et al. (2007). "Dressings for acute and chronic wounds: A systematic review." *Archives of Dermatology* **143**(10): 1297-1304.

Chan, F. K., Moriwaki, K., De Rosa M.J. (2013). "Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity." *Methods in Molecular Biology* **979**: 65-70.

Chang, H., S. Wind and M. D. Kerstein (1996). "Moist wound healing." *Dermatology Nursing* **8**(3): 174-176, 204.

- Chen, C. P., Y. C. Yang, T. H. Su, C. Y. Chen and J. D. Aplin (2005). "Hypoxia and transforming growth factor-beta 1 act independently to increase extracellular matrix production by placental fibroblasts." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90**(2): 1083-1090.
- Cohen, B. E., R. G. Geronemus, D. H. McDaniel and J. A. Brauer (2017). "The Role of Elastic Fibers in Scar Formation and Treatment." *Dermatologic Surgery* **43**: S19-S24.
- Cuschieri, L., J. Debosz, P. Miiller and M. Celis (2013). "Autolytic debridement of a large, necrotic, fully occluded foot ulcer using a hydrocolloid dressing in a diabetic patient." *Advanced Skin & Wound Care* **26**(7): 300-304.
- Decker, T., Lohmann-Matthes M.L. (1988). "A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity." *Journal of Immunological Methods* **115**(1): 61-69.
- Dinh, T. and A. Veves (2005). "Microcirculation of the diabetic foot." *Current Pharmaceutical Design* **11**(18): 2301-2309.
- Dornseifer, U., Fichter, A.M., Herter, F., Sturtz, G., Ninkovic, M. (2009). "The Ideal Split-Thickness Skin Graft Donor Site Dressing." *Annals of Plastic Surgery* **63**(2): 198-200.
- Duscher, D., Michael Januszyk, M., Maan, Z.N., Whittam, A.J., Hu, M.S., Walmsley, G.G., Dong, Y., Khong, S.M., Longaker, M.T., Gurtner, G.C. (2017). "Comparison of the Hydroxylase Inhibitor DMOG and the Iron Chelator Deferoxamine in Diabetic and Aged Wound Healing." *Plastic and Reconstructive Surgery* **139**(3): 695-706.
- Dyson, M., Young, S.R., Hart, J., Lynch, J.A., Lang, S. (1992). "Comparison of the effects of moist and dry conditions on the process of angiogenesis during dermal repair." *Journal of Investigative Dermatology* **99**(6): 729-733.
- Eaglstein, W. H. (1984). "Effect of occlusive dressings on wound healing." *Clinics in Dermatology* **2**(3): 107-111.
- Endler, A., Chen, L., Li, Q., Uchida, K., Hashimoto, T., Lu, L., Xu, G.T., Shibasaki, F. (2013). "Int6/eIF3e silenced HIF2 α stabilization enhances migration and tube formation of HUVECs via IL-6 and IL-8 signaling." *Cytokine* **62**(1): 115-122.
- Falanga, V. (2005). "Wound healing and its impairment in the diabetic foot." *The Lancet* **366**(9498): 1736-1743.
- Field, F. K. and M. D. Kerstein (1994). "Overview of wound healing in a moist environment." *The American Journal of Surgery* **167**(1a): 2s-6s.
- Galiano, R. D., O. M. Tepper, C. R. Pelo, K. A. Bhatt, M. Callaghan, N. Bastidas, S. Bunting, H. G. Steinmetz and G. C. Gurtner (2004). "Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells." *The American Journal of Pathology* **164**(6): 1935-1947.
- Grayson, L. S., Hansbrough, J.F, Zapata-Sirvent, R.L, Dore, C.A, Morgan, J.L, Nicolson, M.A (1993). "Quantitation of cytokine levels in skin graft donor site wound fluid." *Burns* **19**(5): 401-405.

- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T. (2008). "Wound Repair and Regeneration." *Nature* **453**: 314-321.
- Han, S. K., T. H. Yoon, J. B. Kim and W. K. Kim (2007). "Dermis graft for wound coverage." *Plastic and Reconstructive Surgery* **120**(1): 166-172.
- Herold, G. (2016). *Innere Medizin*. Köln, Herold, G.
- Herskovitz, I., O. B. Hughes, F. Macquhae, A. Rakosi and R. Kirsner (2016). "Epidermal skin grafting." *International Wound Journal* **13 Suppl 3**: 52-56.
- Hilton, J. R., D. T. Williams, B. Beuker, D. R. Miller and K. G. Harding (2004). "Wound dressings in diabetic foot disease." *Clinical Infectious Diseases* **39 Suppl 2**: S100-103.
- Hunt, T. K., W. B. Conolly, S. B. Aronson and P. Goldstein (1978). "Anaerobic metabolism and wound healing: an hypothesis for the initiation and cessation of collagen synthesis in wounds." *The American Journal of Surgery* **135**(3): 328-332.
- Hutchinson, J. J. and J. C. Lawrence (1990). "Wound infection under occlusive dressings." *Journal of Hospital Infection* **17**(2): 83-94.
- Jonkman, J. E., Cathcart, J.A., Xu, F., Bartolini, M.E., Amon, J.E., Stevens, K.M., Colarusso, P. (2014). "An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy." *Cell Adhesion&Migration* **8**(5): 440-451.
- Kazanavičius, M., A. Cepas, V. Kolaityte, R. Simoliuniene and R. Rimdeika (2017). "The use of modern dressings in managing split-thickness skin graft donor sites: a single-centre randomised controlled trial." *Journal of Wound Care* **26**(6): 281-291.
- Kiliñç, H., Sensöz, O., Ozdemir, R., Unlü, R.E., Baran, C. (2001). "Which dressing for split-thickness skin graft donor sites?" *Annals of Plastic Surgery* **46**(4): 409-414.
- Korting, H. C., C. Schöllmann and R. J. White (2010). "Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **25**(2): 130-137.
- Läuchli, S., J. Hafner, S. Ostheeren, D. Mayer, M. J. Barysch and L. E. French (2013). "Management of Split-Thickness Skin Graft Donor Sites: A Randomized Controlled Trial of Calcium Alginate versus Polyurethane Film Dressing." *Dermatology* **227**(4): 361-366.
- Liang, C. C., Park, A.Y., Guan, J.L. (2007). "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." *Nature Protocols* **2**(2): 329-333.
- Lim, R. C., Jr., B. Zederfeldt and D. H. Lewis (1969). "Metabolic and blood flow changes in healing wounds: a measurement of microcirculatory development." *Bibliotheca Anatomica* **10**: 328-333.
- Liu, L., G. P. Marti, X. Wei, X. Zhang, H. Zhang, Y. V. Liu, M. Nastai, G. L. Semenza and J. W. Harmon (2008). "Age-dependent impairment of HIF-1alpha expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells." *Journal of Cell Physiology* **217**(2): 319-327.
- Martin, A., Komada, M.R., Sane, D.C. (2002). "Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus." *Medicinal Research Reviews* **23**(2): 117-145.

- Müller, W. (2000). "Spalthaut- und Vollhautplastiken." *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie* **4**(1): S314-S321.
- Murray, J. C. (1994). "Keloids and hypertrophic scars." *Clinics in Dermatology* **12**(1): 27-37.
- Niessen, F. B., P. H. Spauwen, P. H. Robinson, V. Fidler and M. Kon (1998). "The use of silicone occlusive sheeting (Sil-K) and silicone occlusive gel (Epiderm) in the prevention of hypertrophic scar formation." *Plastic and Reconstructive Surgery* **102**(6): 1962-1972.
- Niezgoda, J. A., C. C. Van Gils, R. G. Frykberg and J. P. Hodde (2005). "Randomized clinical trial comparing OASIS Wound Matrix to Regranex Gel for diabetic ulcers." *Advanced Skin & Wound Care* **18**(5 Pt 1): 258-266.
- O'Shaughnessy, K. D., De La Garza, M., Roy, N.K., Mustoe, T.A. (2009). "Homeostasis of the epidermal barrier layer: A theory of how occlusion reduces hypertrophic scarring." *Wound Repair and Regeneration* **17**(5): 700-708.
- O'Toole, E. A., M. P. Marinkovich, C. L. Peavey, M. R. Amieva, H. Furthmayr, T. A. Mustoe and D. T. Woodley (1997). "Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue." *The Journal of Clinical Investigation* **100**(11): 2881-2891.
- Okonkwo, U. A. and L. A. DiPietro (2017). "Diabetes and Wound Angiogenesis." *International Journal of Molecular Sciences* **18**(7).
- Ono, I., H. Gunji, J.-Z. Zhang, K. Maruyama and F. Kaneko (1995). "Studies on cytokines related to wound healing in donor site wound fluid." *Journal of Dermatological Science* **10**(3): 241-245.
- Park, S. A., L. B. C. Teixeira, V. K. Raghunathan, J. Covert, R. R. Dubielzig, R. R. Isseroff, M. Schurr, N. L. Abbott, J. McNulty and C. J. Murphy (2014). "Full-thickness splinted skin wound healing models in db/db and heterozygous mice: Implications for wound healing impairment." *Wound Repair and Regeneration* **22**(3): 368-380.
- Patz, A. (1980). "Studies on retinal neovascularization. Friedenwald Lecture." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **19**(10): 1133-1138.
- Patz, A. (1982). "Clinical and experimental studies on retinal neovascularization. XXXIX Edward Jackson Memorial Lecture." *The American Journal of Ophthalmology* **94**(6): 715-743.
- Pricolo, V. E., M. D. Caldwell, B. Mastrofrancesco and C. D. Mills (1990). "Modulatory activities of wound fluid on fibroblast proliferation and collagen synthesis." *Journal of Surgical Research* **48**(6): 534-538.
- Schubert, H. M., M. Brandstetter, F. Ensaf, H. Kohlosy and A. H. Schwabegger (2012). "Spalthauttransplantation zur Weichteildefektdeckung." *Operative Orthopädie und Traumatologie* **24**(4): 432-438.
- Seitz, O., C. Schurmann, N. Hermes, E. Müller, J. Pfeilschifter, S. Frank and I. Goren (2010). "Wound healing in mice with high-fat diet- or ob gene-induced diabetes-obesity syndromes: a comparative study." *Experimental Diabetes Research* **2010**: 476969.
- Singer, A. J. and R. A. F. Clark (1999). "Cutaneous Wound Healing." *New England Journal of Medicine* **341**(10): 738-746.

- Skouge, J. W. (1987). "Techniques for split-thickness skin grafting." *The Journal of dermatologic surgery and oncology* **13**(8): 841-849.
- Son, D. and A. Harijan (2014). "Overview of surgical scar prevention and management." *Journal of Korean Medical Science* **29**(6): 751-757.
- Tandara, A. A. and T. A. Mustoe (2004). "Oxygen in wound healing--more than a nutrient." *World Journal of Surgery* **28**(3): 294-300.
- Tellechea, A., E. C. Leal, A. Kafanas, M. E. Auster, S. Kuchibhotla, Y. Ostrovsky, F. Tecilazich, D. Baltzis, Y. Zheng, E. Carvalho, J. M. Zabolotny, Z. Weng, A. Petra, A. Patel, S. Panagiotidou, L. Pradhan-Nabzdyk, T. C. Theoharides and A. Veves (2016). "Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes." *Diabetes* **65**(7): 2006-2019.
- Thangarajah, H., Vial, I.N., Grogan, R.H., Yao, D., Shi, Y., Januszyk, M., Galiano, R.D., Chang, E.I., Galvez, M.G., Glotzbach, J.P., Wong, V.W., Brownlee, M., Gurtner, G.C. (2010). "HIF-1 α dysfunction in diabetes." *Cell Cycle* **9**(1): 75-79.
- Tsuji, T. and M. Sawabe (1987). "Elastic fibers in scar tissue: scanning and transmission electron microscopic studies." *Journal of Cutaneous Pathology* **14**(2): 106-113.
- Ubbink, D. T., H. Vermeulen, A. Goossens, R. B. Kelner, S. M. Schreuder and M. J. Lubbers (2008). "Occlusive vs gauze dressings for local wound care in surgical patients: A randomized clinical trial." *Archives of Surgery* **143**(10): 950-955.
- Uralođlu, M., Livaođlu, M., Agdođan, Ö., Mungan, S., Alhan, E., Karaçal, N. (2014). "An evaluation of five different dressing materials on split-thickness skin graft donor site and full-thickness cutaneous wounds: an experimental study." *International Wound Journal* **11**(1): 85-92.
- Velander, P., C. Theopold, T. Hirsch, O. Bleiziffer, B. Zuhaili, M. Fossum, D. Hoeller, R. Gheerardyn, M. Chen, S. Visovatti, H. Svensson, F. Yao and E. Eriksson (2008). "Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia." *Wound Repair and Regeneration* **16**(2): 288-293.
- Vindenes, H. (1999). "Skin transplantation." *Tidsskr Nor Laegeforen* **119**(27): 4050-4053.
- Vogt, P. M. (2011). *Praxis der Plastischen Chirurgie*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, Springer Verlag. **9783540375715**.
- Vogt, P. M., Andree, C.; Breuing, K., Liu, P.Y., Slama, J. Helo, G., Eriksson, E. (1995). "Dry, Moist and Wet Skin Repair." *Annals of Plastic Surgery* **34**(5): 493-499.
- Walmsley, G., Maan, Z., Wong, Victor W., Duscher, D., Hu, M.S., Zielins, E.R., Wearda, T., Muhonen, E., McArdle, A., Tevlin, R., Atashroo, D.A., Senarath-Yapa, Kshemendra, Lorenz, H.P., Gurtner, G.C., Longaker, M.T. (2015). "Scarless Wound Healing: Chasing the Holy Grail " *Plastic and Reconstructive Surgery* **135**(3).
- Werner, S., T. Krieg and H. Smola (2007). "Keratinocyte-Fibroblast Interactions in Wound Healing." *Journal of Investigative Dermatology* **127**(5): 998-1008.
- Wiechula, R. (2003). "The use of moist wound-healing dressings in the management of split-thickness skin graft donor sites: a systematic review." *International Journal of Nursing Practice* **9**(2): S9-S17.

Winter, G. D. (1962). "Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig." *Nature* **193**: 293-294.

Winter, G. D. (1965). "A note on wound healing under dressings with special reference to perforated-film dressings." *The Journal of Investigative Dermatology* **45**(4): 299-302.

Witte, M. B. and A. Barbul (1997). "General principles of wound healing." *Surgical Clinics of North America* **77**(3): 509-528.

Yang, S. W., Z. J. Geng, K. Ma, X. Y. Sun and X. B. Fu (2016). "Comparison of the histological morphology between normal skin and scar tissue." *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]* **36**(2): 265-269.

Zachari, M. A., Chondrou, P.S., Pouliliou, S.E., Mitrakas, A.G., Abatzoglou, I., Zois, C.E., Koukourakis, M.I. (2013). "Evaluation of the alamarblue assay for adherent cell irradiation experiments." *Dose-Response* **12**(2): 246-258.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (Falanga 2005, Wound healing and its impairment in the diabetic foot, The Lancet, Vol 366, Seite 1737) Überblick über den Ablauf der Physiologischen Wundheilung, ihre Phasen und die daran beteiligten Faktoren

Abbildung 2 (Witte and Barbul 1997, General principles of wound healing, Surgical Clinics of North America, Vol. 77, Seite 512) Darstellung der an der Wundheilung hauptsächlich beteiligten Zellen.

Abbildung 3 Algorithmus zur Diagnose des Typ II DM aus den aktuellen Leitlinien (Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. Version 4. 2013, zuletzt geändert: November 2014)

Abbildung 4 (Brem and Tomic-Canic 2007: Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes, Journal of Clinical Investigation, Vol. 117, Seite 1221) Wundheilung bei Diabetes mellitus (rechts) im Vergleich zur physiologischen Wundheilung (links)

Abbildung 5 Scratch Fläche bei geringer Zellmigration

Abbildung 6 Scratch Fläche mit starker Zellmigration und beinahe vollständigem Spaltverschluss nach 10 Stunden Inkubation

Abbildung 7 Vernetzung der Endothelzellen mit Netz- und Tubebildung unter dem Fluoreszenzmikroskop

Abbildung 8 Farbumschlag beim LDH-Assay durch Formazan

Abbildung 9 Mittelwertverteilung der verbleibenden Scratch Fläche der beiden Versuchsgruppen (K=Kontrollgruppe, D=Diabetiker) unter Einwirkung von Wundflüssigkeit (WS) oder Blutserum (S) \pm Standardabweichung

Abbildung 10 Restliche Scratch-Fläche nach 10 stündiger Migration von HS-27 Fibroblasten unter Einwirkung von diabetischen und nicht diabetischen Wundsekreten sowie den jeweils zugehörigen Blutsera.

Abbildung 11 Mittelwertverteilung der mit Zellen bedeckten Fläche der beiden Versuchsgruppen (K=Kontrollgruppe, D=Diabetiker) unter Einwirkung von Wundflüssigkeit (WS) oder Blutserum (S) \pm Standardabweichung

Abbildung 12 Mit Zellen bedeckte Fläche nach 10 stündiger Migration von HS-27 Fibroblasten unter Einwirkung von diabetischen und nicht diabetischen Wundsekreten sowie den jeweils zugehörigen Blutseren

Abbildung 13 Mittelwerte der gemessenen Emission \pm Standardabweichung nach 3 Tagen Inkubationszeit. Gezeigt werden die Wundsekrete beider Gruppen im Vergleich zu den zugehörigen Blutseren. Diese wurden auf ein 100% Niveau gesetzt.

Abbildung 14 Zytotoxizität der Fibroblasten beider Gruppen (Diabetiker links, Kontrolle rechts) verglichen mit den jeweiligen Blutsera, die auf ein 100% Niveau gesetzt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung

Abbildung 15 Darstellung der Zellzahlen und Zellviabilität nach 7 tägiger Inkubationszeit mit diabetischem Wundsekret und Wundsekret der Kontrollgruppe verglichen mit den auf ein 100%-Niveau gesetzten Blutsera \pm Standardabweichung

Abbildung 16 Mittelwerte der mit Endothelzellen bedeckten Fläche in % \pm Standardabweichung nach Inkubation mit den Wundsekreten und Blutsera beider Gruppen. Weder beim Vergleich der Wundsekrete miteinander ($p=0,095$), noch beim Vergleich der Wundsekrete mit den Serumproben ($p=0,186$) ergaben sich signifikante Ergebnisse

Abbildung 17 Mittelwerte der mittleren Länge der gebildeten Schleifen nach Inkubation mit den Blutsera und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,173$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Serumproben ($p=0,178$)

Abbildung 18 Mittelwerte der Länge der gebildeten Röhren nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,168$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,456$).

Abbildung 19 Mittelwerte der Anzahl der entstandenen Verzweigungen nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,158$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,515$).

Abbildung 20 Mittelwerte der Anzahl der gebildeten Schlaufen nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,0624$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,208$).

Abbildung 21 Mittelwerte der Anzahl der gebildeten Vernetzungen nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,265$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,123$).

Abbildung 22 Mittelwerte der Anzahl der gebildeten Röhren nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete ($p=0,341$) oder im Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,925$).

Abbildung 23 Mittelwerte der Mittleren Röhrenlänge nach Inkubation der Endothelzellen mit den Blutseren und Wundsekreten beider Gruppen \pm Standardabweichung. Es zeigten sich signifikante Ergebnisse im Vergleich der Wundsekrete beider Gruppen ($p=0,035$) sowie in Vergleich der Wundsekrete mit den Blutseren ($p=0,032$).

11 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. H.G. Machens und meinem Mentor Dr.Dr. M. Cerny, die diese Arbeit ermöglicht haben und mich während des gesamten Prozesses unterstützt haben. Mit Ratschlägen und Hilfestellungen zur Durchführung und Vollendung meiner Dissertation standen sie mir stets zur Seite.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Ursula Hopfner, die mich tatkräftig bei der Arbeit im Labor unterstützte und mit mir als Neuling stets ausdauernde Geduld bewies.

Allen voran danke ich meinen Eltern, ohne die das Studium der Humanmedizin und somit diese Arbeit gar nicht erst möglich gewesen wären. Ihrer Unterstützung und ihrem moralischen, seelischen und nicht zuletzt materiellem Beistand verdanke ich meine gesamte Ausbildung und vieles mehr.