

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch

**Histologische und funktionelle Charakterisierung von
primären Keratinozytenkulturen aus dem Läsionsgebiet
schwerstverbrannter Patienten**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig – Maximilians – Universität zu München

vorgelegt von

Gerd Gauglitz

aus Tübingen

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. E. Faist

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Ruzicka

Prof. Dr. H. Bartels

Priv. Doz. Dr. A. Frick

Mitbetreuung d. d. promovierten Mitarbeiter:

Dr. rer. biol. hum. S. Zedler

Dekan:

Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

28. 06. 2007

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	4
2.1	Einführung	4
2.2	Anatomie und Physiologie der Haut	5
2.2.1	Anatomie der Haut	5
2.2.2	Weitere Zellen der Haut	8
2.2.2.1	Melanozyten	8
2.2.2.2	Langerhans-Zellen und dermale dendritische Zellen	9
2.2.2.3	Merkelzellen	9
2.2.2.4	Mastzellen	10
2.3	Pathophysiologie der Verbrennungswunde	10
2.3.1	Tiefengrade der Verbrennungswunde	11
2.3.2	Verbrennungsausdehnung	13
2.4	Immunologische Reaktionen nach thermischem Trauma	13
2.4.1	Das Immunsystem	14
2.4.2	Das Gleichgewicht des Immunsystems	15
2.4.3	Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)	15
2.4.4	Zellen des Immunsystems	16
2.4.5	Skin Associated Lymphoid Tissue (SALT)	16
2.5	Die Wundheilung	17
2.6	Therapeutisches Vorgehen bei Verbrennungsverletzungen	20
2.6.1	Operatives Vorgehen nach großflächigen Verbrennungen	20
2.7	Zytokinexpression der epidermalen Keratinozyten	22
3	Fragestellungen	23
4	Material und Methoden	24
4.1	Geräte und Material	24
4.1.1	Anzucht der Keratinozyten	24
4.1.2	Anfärben der Zellen mittels der Avidin-Biotin-Methode	24
4.1.3	Anfärben der Zellen mittels der Hämalaun-Eosin-Methode (HE-Färbung)	25
4.1.4	Messen mit dem Bio-Plex-System	25

4.1.5	Messen von TGF-beta nach dem ELISA-Prinzip	26
4.2	Krankengut und klinische Auswahlkriterien	26
4.3	Auswahl der Patienten	27
4.4	Dokumentation	27
4.5	Demographische Daten	27
4.6	Statistik	28
4.7	Methodik	29
4.7.1	Gewinnung und Kultivierung der Keratinozyten	29
4.7.1.1	Abnahme der Spalthaut	29
4.7.1.2	Transport bzw. Aufbewahrung der Spalthaut	29
4.7.1.3	Protokoll zur Kultivierung der Keratinozyten	30
4.7.1.4	Einfrieren der Keratinozyten	32
4.7.2	Kontrollgruppe: Hautmaterial aus Mammareduktionen	33
4.7.3	Anfärben der Zellen eines Sheets	33
4.7.3.1	Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)	33
4.7.3.2	Hämalaun-Eosin-(HE-)Färbung	34
4.7.3.3	Protokoll zur Herstellung der Zytozentrifugenpräparate	34
4.7.3.4	Protokoll der immunhistochemischen Färbung mit der ABC-Methode und AEC als Substrat	35
4.7.3.5	Protokoll der Hämalaun-Eosin-(HE-)Färbung	36
4.7.4	Das Prinzip des Bio-Plex Immunoassay System	36
4.7.4.1	Procedere des Bio-Plex Immunoassay Systems	37
4.7.5	TGF-beta1 Bestimmung	38
5	Ergebnisse	38
5.1	Färbungen	38
5.1.1	Allgemeines	38
5.1.2	Vergleichende Histologie der Keratinozytenkulturen mittels HE-Färbung	39
5.1.3	Immunhistochemische Färbung mit KL-1 nach der ABC-Methode	39
5.1.4	Immunhistochemische Färbung mit MNF-116 nach der ABC-Methode	40
5.1.5	Immunhistochemische Färbung mit Vim 3 B4 nach der ABC-Methode	40
5.1.6	Immunhistochemische Färbung mit DCN 46 nach der ABC-Methode	41
5.1.7	Immunhistochemische Färbung mit 1F11 nach der ABC-Methode	41
5.1.8	Immunhistochemische Färbung mit T-200 nach der ABC-Methode	42
5.1.9	Immunhistochemische Färbung mit MOPC-21 nach der ABC-Methode	42
5.2	Messungen der Zytokine und Wachstumsfaktoren in den Überständen der Keratinozytenkulturen	42
5.2.1	Allgemeines	42
5.2.2	Interleukin-1-alpha	43
5.2.3	Interleukin-1-Rezeptorantagonist	45

5.2.4	Interleukin-1-beta	47
5.2.5	Interleukin-2	49
5.2.6	Interleukin-4	51
5.2.7	Interleukin-6	53
5.2.8	Interleukin-8	54
5.2.9	Interleukin-10	55
5.2.10	Interferon gamma (INF- γ)	57
5.2.11	Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)	59
5.2.12	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	61
5.2.13	Transforming Growth Factor beta (TGF- β)	63
5.2.14	Fibroblast Growth factor basic (FGF-basic)	65
5.2.15	Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)	67
5.2.16	Granulocyte-Macrophage Stimulating Growth Factor (GM-CSF)	69
6	Diskussion	71
6.1	Keratinocytenkultivierung	71
6.2	Immunhistochemische Färbungen	72
6.3	Zytokine und Wachstumsfaktoren	73
6.4	Systemische Auswirkungen der von Keratinocyten sezernierten Mediatoren	80
6.5	Der Einfluss der Kryokonservierung von Keratinocyten transplantaten auf die in vitro Mediatorensynthese	81
6.6	Schlussfolgerungen/Ausblick	82
7	Zusammenfassung	83
8	Abkürzungen	85
9	Literaturverzeichnis	85
10	Danksagung	99
11	Lebenslauf	100

2 Einleitung

2.1 Einführung

Ausgedehnte und tiefe Verbrennungen zählen zu den schwersten Verletzungen des Menschen. Durch den Funktionsverlust der Haut als Schutzhülle, Speicherorgan und Wärmeregulator ist der Körper allen äußeren Einflüssen ausgeliefert und sämtliche Organe können sekundär geschädigt werden. Besonders häufige Verbrennungsarten sind Strahlung, Explosionen, elektrothermische Schädigung, Verletzungen durch Chemikalien und vor allem durch heiße Flüssigkeiten oder Feuereinwirkung.

Die Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Verbrennungsmedizin gibt an, dass in Deutschland pro Jahr etwa 1500 Verbrennungspatienten eine intensivmedizinische Behandlung benötigen. Häufigste Ursachen bei Verbrennungen sind mit 60–75% Haushalts- bzw. Freizeitunfälle und in 20–30% Arbeitsunfälle (Deitch, 1990; Jauch et al., 1994; Zellweger, 1995; Pallua et al., 2006). Alle anderen Ursachen sind selten, haben aber eine hohe Letalität (Sterblichkeit). So verlaufen Hochspannungsunfälle zu 30% und Blitzschlagunfälle zu 50% tödlich. Kinder als Unfallopfer nehmen mit 30–40% einen auffallend hohen Anteil bei den thermischen Verletzungen ein. In den ersten vier Lebensjahren sind Verbrennungen oder Verbrühungen die zweithäufigste, bei älteren Kindern die dritthäufigste Ursache von unfallbedingten Todesfällen (Pallua et al., 2006). Ebenso häufen sich Brandverletzungen im hohen Alter. Die Letalität ist bei Kindern und bei älteren Patienten über 60 Jahre höher als in anderen Altersgruppen.

Für die hohe Sterblichkeit unter Verbrennungspatienten sind diverse Faktoren verantwortlich. Die unmittelbare Todesursache in der Folge einer schweren Brandverletzung ist in 75% der Fälle eine schwere Sepsis. Dass sich die Prognose von Patienten mit schweren Verbrennungen in den letzten Jahren deutlich verbessert hat, liegt zum einen in der Optimierung der intensivmedizinischen Therapie und Pflege, aber auch maßgeblich an den Fortschritten in der Erforschung von immunologischen Alterationen nach thermischem Trauma und den zugrundeliegenden Pathomechanismen (Alexander 1990). Die Bedeutung und Wirkmechanismen der beteiligten Mediatoren, zu denen Interleukine, andere Zytokine und Wachstumsfaktoren gehören, sind, gerade im Hinblick auf neue Therapieoptionen für schwer verbrannte Patienten, Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. So wurde festgestellt, dass allogene Keratinozytentransplantate zur Deckung von thermischen Wunden die Heilung derselben beschleunigen, ohne später noch nachweisbar zu sein (Brain et al., 1989; Yanaga et al., 2001). Dieser Effekt scheint auf der Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu beruhen (Mühlbauer et al., 1995; Nunez-Gutierrez et al., 1996; Rivas-Torres et al., 1996; Brychta et al., 2001). Durch Kryokonservierung stehen diese allogenen Hauttransplantate dem schwerstverbrannten Patienten in Form von Hautbanken zur temporären Defektdeckung je-

derzeit zur Verfügung, bis eine endgültige Wunddeckung mit autologer Haut erfolgen kann (Pallua et al., 2006).

2.2 Anatomie und Physiologie der Haut

2.2.1 Anatomie der Haut

Die Haut bildet die äußere Körperoberfläche, die beim Neugeborenen zwischen 0,2 und 0,3 m² und beim Erwachsenen 1,5 bis 2 m² misst. Die Haut stellt damit das größte und zugleich schwerste Einzelorgan des menschlichen Körpers dar. Temperatur-, Salz- und Wasserhaushalt werden über die Haut geregelt. Zudem beherbergt sie Sinnesorgane und spielt eine tragende Rolle bei zahlreichen immunologischen Prozessen. Anatomisch und funktionell lassen sich zwei Hautschichten unterscheiden.

Die oberflächliche, epidermale Schicht (Epidermis) leitet sich entwicklungsgeschichtlich aus dem Ektoderm ab. Sie lässt sich in eine basale und eine suprabasale Schicht unterteilen. Die Keratinozyten der Basalzellschicht haben Kontakt zur Basalmembran. In dieser Schicht sind die teilungsfähigen Zellen angesiedelt. Durch die Teilung dieser Zellen entsteht eine Zellschicht (Stratum germinativum entspricht Stratum basale und spinosum), welche die erste Lage der suprabasalen Zellen darstellt. Es folgen dann mehrere Zellschichten (Stratum granulosum, lucidum und corneum, siehe Abbildung 1), die nicht mehr teilungsfähig sind und im Wesentlichen eine Schutzfunktion einnehmen (Hornschicht). Mit dem Aufstieg in höhere Zellschichten beginnt der Differenzierungsprozess, und die Zusammensetzung der exprimierten Zytokeratine ändert sich. Die Zytokeratine K 5 und K 14 werden in Zellkultur schon in der basalen Schicht exprimiert. Seltener kann man die differenzierungsspezifischen Zytokeratine K 1/ K2 und K 10 in der basalen Schicht beobachten (Eichner et al., 1984). Dieses Phänomen ist bei zunehmender Dicke besonders ausgeprägt (Boukamp, 1988; Fritsch, 2004). Die Zytokeratine K6, K16 und K17 sind suprabasale Marker und werden von hyperproliferierenden Keratinozyten nach Trauma exprimiert (Mazzalupo et al., 2003). Die Zeit, die ein Keratinozyt benötigt, um vom Stratum basale ins Stratum granulosum zu gelangen (meist als "epidermal cell renewal time" oder "epidermal turnover time" bezeichnet), beträgt beim Menschen 26-42 Tage.

Die Keratinozyten der Epidermis stellen eine sich kontinuierlich erneuernde Zellpopulation dar, in der sich Mitose, terminale Differenzierung und Zellverlust einander die Waage halten. Die einzelnen Schichten der Epidermis (siehe unten) stehen daher in einem Fließgleichgewicht. Die Fähigkeit zur Mitose ist unter physiologischen Bedingungen den Zellen der Basalschicht vorbehalten. Die epidermale Proliferation reagiert jedoch auf jegliche traumatische, thermische, chemische oder entzündliche Reize mit Anstieg der Mitoseaktivität. Bestes Beispiel dafür ist die Wundheilung (siehe unten). Kleinste Verletzungen der Epidermis rufen nach einer etwa 24-stündigen Latenzperiode

eine vehemente synchronisierte Mitosewelle der Basalzellschicht hervor. Die Steigerung der Proliferation ist demnach ein empfindliches Instrument, mit dem die Epidermis auf den ständigen Flux mechanischer und anderer Reize aus der Umwelt reagiert und die Homöostase der Epidermis garantiert. Zahlreiche Glieder der Zytokinkaskade sind imstande, bei Aktivierung oder Schädigung der Keratinozyten direkt oder indirekt deren Wachstum positiv oder auch negativ zu beeinflussen. Potente Wachstumsfaktoren mit auto- und parakriner Wirkung sind u.a. die Interleukine IL-1, IL-6, sowie Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor alpha (TGF- α), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Keratinocyte Growth Factor (KGF); wachstumshemmend dagegen wirkt z.B. Tumour Necrosis Factor alpha (TNF- α) (Abbildung 8) (Fritsch, 2004).

Das **Stratum basale** besteht aus kubischen bis hochprismatischen Zellen, die über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden sind. Sie sind reich an sauren (besonders K 14), sowie basischen und neutralen (besonders K 5) Keratinen, die zu lockeren Bündeln zusammengelagert sind. Im **Stratum spinosum** haben die Keratinozyten eine polygonale Morphologie. Sie besitzen Zytoplasmaausläufer, über die sie durch Desmosomen mit Nachbarzellen verknüpft sind. In diese Zytoplasmaausläufer ziehen Keratine hinein, kreuzen die Interzellularspalten dabei aber nicht. Hier werden insbesondere die Keratine K 1 (basisch) und K 10 (sauer) exprimiert, die sich zu sogenannten Tonofibrillen (Heterodimere) zusammenlagern. Diese integrieren sich in das schon existierende Netzwerk aus K 5 und K 14 (Kartasova, 1993). Das Stratum spinosum stabilisiert die Haut und hält mechanischer Beanspruchung besonders gut stand, deshalb ist diese Schicht an Hand- und Fußflächen besonders ausgeprägt. Das **Stratum granulosum** besteht zumeist aus nur wenigen Schichten, in denen die Zellen stark abgeflacht sind und schon stark verdichtete Filamente sowie membranumschlossene Granula aufweisen. Diese Granula werden in den Interzellularraum abgegeben und tragen im Wesentlichen zur Abdichtung bei. Ein **Stratum lucidum** ist nur in einer dicken Epidermis nachweisbar. Es handelt sich um eine Übergangsschicht, in der Zellorganellen lysosomal degradiert und Zellkerne pyknotisch werden. Das **Stratum corneum** bildet die letzte Schicht der Epidermis (Abbildung 1). Seine Dicke variiert anspruchsbedingt außerordentlich stark.

Die verschiedenen Hautanhangsgebilde, wie Nägel und Drüsen leiten sich von der Epidermis ab.

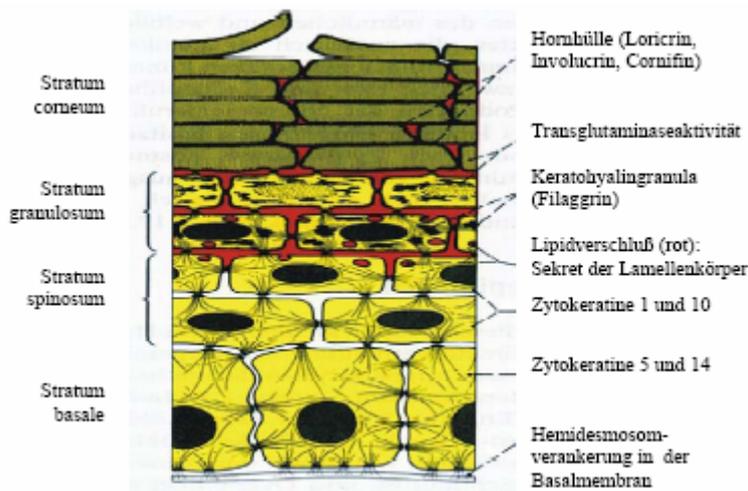


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Epidermis, (Benninghoff, 1994)

Die Dermis ist verantwortlich für die Elastizität und mechanische Integrität der Haut. Die dermale Matrix besteht aus Kollagen (Typ I und IV), Glykosaminoglykanen, Elastin und verschiedenen Matrixproteinen. An zellulären Bestandteilen finden sich hier vorwiegend Fibroblasten (Produktionsort des Kollagens) und Mastzellen (Fritsch, 2004). Die Dermis wird in zwei Schichten, das Stratum papillare und das Stratum reticulare, unterteilt. Im Stratum papillare entspringen aus dem subpapillären Gefäßnetz Blutkapillaren, zudem finden sich Nervenfasern (Abbildung 2). Das Stratum reticulare ist zellarm, ihm sind eher die mechanischen Eigenschaften der Haut zuzuschreiben.

Die Dicke der Haut variiert je nach Körperregion sehr, so findet man besonders an der Hohlhand und der Fußsohle eine sehr ausgeprägte Epidermis.

Im Oberflächenrelief der Haut sieht man eine feine Felderung, welche regionale Unterschiede aufweist. Anteilsmäßig ist der größte Teil der Körperoberfläche mit Felderhaut bedeckt, nur an der Hohlhand, der Fußsohle, der Fingerbeeren und an den Zehenballen sind die rhombischen Felder der Felderhaut durch Leisten (Leistenhaut) ersetzt; Haare und Talgdrüsen fehlen hier. Diese regionalen Unterschiede im Aufbau der Haut haben eine entscheidende Bedeutung für die Regeneration der Epidermis im Verletzungsfall und damit auch für die Behandlung der Verbrennungen in diesen Körperregionen. In der Felderhaut regeneriert die Epidermis aus Keratinozyten, die tief in den Hautanhangsgebilden lokalisiert sind. Die Leistenhaut regeneriert aus Keratinozytenstammzellen, die in den tiefen epidermalen Furchen der Leisten zu finden sind (Rennekampff, 2002). Ein Verschluss durch Kontraktur und Epithelisierung von den Wundrändern her ist nur bei kleinen Defekten möglich und gelingt nicht mehr ab einer Größe von einigen cm^2 (Przybilski et al., 2004).

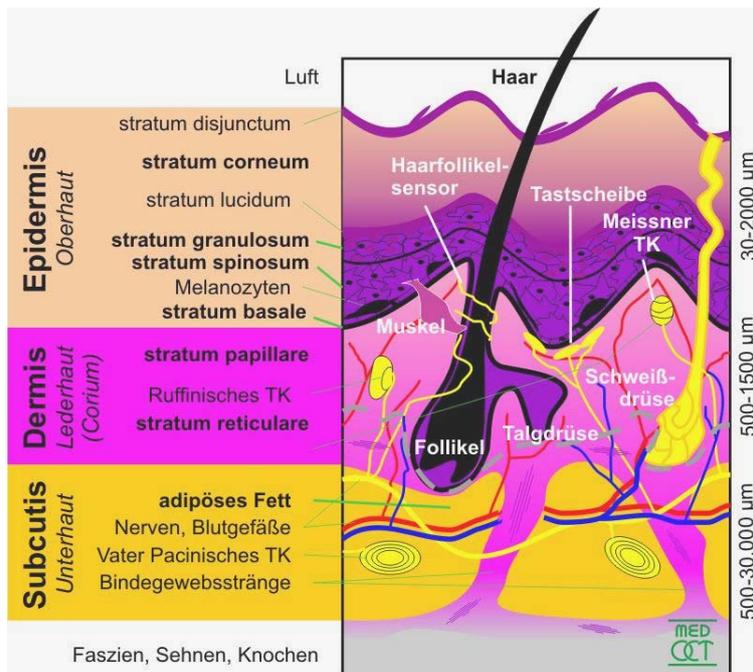


Abbildung 2: Aufbau der Haut (MedOCT-group, 2005)

2.2.2 Weitere Zellen der Haut

Die Epidermis besteht zu etwa 90% aus Keratinozyten, die ihr Gerüst repräsentieren. Die restlichen 10% bilden Melanozyten, epidermale Langerhans-Zellen und Merkelzellen. In der Dermis finden sich neben Fibroblasten vor allem Mastzellen und dermale dendritische Zellen

2.2.2.1 Melanozyten

Melanozyten sind dendritische Zellen neuroektodermaler Herkunft, die das schwärzliche Pigment Melanin produzieren und damit hauptverantwortlich für die Eigenfarbe der Haut sind. Ihre Dichte schwankt zwischen 1000 und 2000/mm² Hautoberfläche. Am dichtesten stehen sie in belichteten und physiologisch dunkler pigmentierten Regionen (Genitoanalbereich, Areola mammae). Sie sind neuroektodermaler Herkunft, liegen physiologischerweise im Stratum basale der Epidermis bzw. des Haarfollikels, synthetisieren Melanin in Antwort auf physiologische und pathologische Stimuli (insbesondere UV-Licht) und bewirken die Pigmentierung der Haut durch Transfer von Melanosomen in benachbarte Keratinozyten. Melanin ist ein Polymerisationsprodukt der Aminosäure Tyrosin und wirkt als Absorber von Licht und Fänger freier Radikale. Melanozyten vermehren sich langsam und sind wenig mobil. Nach Gewebszerstörung dauert es lange, bis die neugebildete Haut wieder mit Melanozyten besiedelt ist, wobei die meistens erhalten gebliebenen Haarfollikel als Melanozytenreservoir fungieren. Narben sind daher häufig depigmentiert (Fritsch, 2004).

2.2.2.2 Langerhans-Zellen und dermale dendritische Zellen

Langerhans-Zellen (LZ) sind suprabasale Zellen der Epidermis von dendritischer Morphologie, die eine zentrale Rolle im ‚Immunorgan Haut‘ spielen. Sie sind in Hämalaun-Eosin-gefärbten Paraffinschnitten nicht erkennbar. In der menschlichen Epidermis können sie durch immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD1a-Antigene dargestellt werden (ein in der Epidermis nur von LZ exprimiertes Molekül, das zur Gruppe der nicht polymorphen MHC Klasse I-Moleküle gehört).

Langerhanszellen stammen aus dem Knochenmark, sind Klasse II-Antigen tragende Leukozyten, besiedeln die Epidermis im Gegensatz zu den Melanozyten gleichmäßig (ca. 700 Zellen/mm²) und stellen den periphersten Posten des Immunsystems dar. Ihre Vorläuferzellen tragen bereits CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen) als ‚Homing Molekül‘, das ihnen den Weg in die dermalen postkapillären Venolen weist. Über diese verlassen sie die Dermis und werden über das von Keratinozyten produzierte Chemokin CCL20 in die Epidermis gelockt. LZ exprimieren das epitheliale Adhäsionsmolekül E-Cadherin und haften über homophile Interaktionen an den ebenfalls E-Cadherin exprimierenden Keratinozyten der Umgebung. LZ in situ entsprechen immunologisch noch unreifen immunstimulatorischen dendritischen Zellen. Dieser distinkte Zelltyp ist darauf spezialisiert, ruhende T-Lymphozyten zu stimulieren und somit primäre T-Zell-abhängige Immunantworten einzuleiten. LZ spielen daher eine tragende Rolle bei der Kontaktsensibilisierung, der Transplantat-Abstoßungsreaktion und einer Reihe anderer immunologischer Prozesse der Haut. Physikochemische Agentien (UV-Bestrahlung, Photochemotherapie, Kortikosteroide) sowie von Keratinozyten produzierte lösliche Faktoren (Zytokine wie z.B. das nach UV-B-Bestrahlung produzierte IL-10) modulieren die Funktion der LZ (Fritsch, 2004).

‚Dermale Dendritische Zellen (DZ)‘ ähneln den LZ der Epidermis, enthalten jedoch keine LZ spezifischen Granula und exprimieren das für sie charakteristische DC-SIGN (CD 209). Nach Aktivierung durchlaufen auch DZ einen Reifungsprozess, verlassen wie die LZ ihren Ursprungsort, treten in die afferenten Lymphgefäße ein und wandern über diese in die regionären Lymphknoten. Der zweite, davon unabhängige Zelltyp sind die sogenannten ‚Faktor XIIIa positiven Dermalen Dendritischen Zellen‘. Diese sind durch die Expression von Koagulationsfaktor XIIIa (auch als Fibrin-stabilisierender Faktor bekannt) charakterisiert und werden derzeit als spezielle Gewebemakrophagen betrachtet. Sie scheinen eine Rolle in der Pathogenese von Hauttumoren und in der Wundheilung zu spielen (Fritsch, 2004).

2.2.2.3 Merkelzellen

Merkelzellen sind einzeln oder als Aggregate im Stratum basale gelegene neuroendokrine bzw. Sinneszellen (langsam adaptierende Mechanorezeptoren für dynamische, statische und Vibrationsreize). Sie stammen von Keratinozyten-Stammzellen ab und sind über die gesamte Haut und hautnahen Schleimhäute unregelmäßig verteilt (5-100/mm²). Besonders dicht stehen sie an den Akren, Lippen, Gaumen, sowie an lichtexponierten Körperregionen. Lichtmikroskopisch sind sie

kaum erkennbar; ultrastrukturell sind sie durch Tonofilamente (niedermolekulare Zytokeratine-8, -18, -19, -20), Desmosomen und charakteristische sekretorische Granula gekennzeichnet. Sie produzieren Nerve Growth Factor (NGF) und eine Reihe von Peptiden (z.B. Substanz P). Sie spielen vermutlich bei Wachstum, Regeneration, Differenzierung und Entzündung eine Rolle (Fritsch, 2004).

2.2.2.4 Mastzellen

Mastzellen sind ubiquitär im Bindegewebe vorkommende Effektorzellen, die in der Haut besonders in der Nähe von Gefäßen, Nerven und Hautanhangsgebilde angereichert sind und ca. 2-5% der dermalen Zellpopulation betragen. Sie sind immobil, langlebig und von typischer Morphologie (relativ groß, polygonal, mit rundem Kern und mit reichlich charakteristischen zytoplasmatischen Granula). Sie besitzen hochaffine IgE-Rezeptoren in der Zellmembran. Histochemisch lassen sich die Mastzellen durch die Chloracetat-Esterase-Reaktion nachweisen. Die Mastzellen stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark mit enger Verwandtschaft zur Monozyten-Makrophagen-Linie ab. Ihre frühe Reifung wird durch IL-3 und andere Zytokine gefördert und von Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) gehemmt. Sie wandern über die Blutbahn in die Haut und reifen hier unter dem Einfluß von Mediatoren benachbarter Fibroblasten und Keratinozyten. Die Mastzellen produzieren ein reiches Spektrum an Mediatoren. Der für die Mehrzahl der Systemzeichen (Vasodilatation, Pruritus und Kontraktion glatter Muskelfasern u.a.) verantwortliche Mediator ist Histamin. Ausserdem produzieren sie eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 u.a.), die zu verzögerten Entzündungsreaktionen führen. Schließlich nimmt die Mastzelle Einfluß auf die Melanogenese („postinflammatorische Hyperpigmentierung“), Wundheilung, Angiogenese, entzündlicher Bindegewebsumbau und Fibrose (TGF- β).

2.3 Pathophysiologie der Verbrennungswunde

Der Grad der thermischen Gewebeschädigung wird von der Verbrennungstiefe und der Höhe bzw. der Einwirkungsdauer der Temperatur bestimmt. Als Verbrühung bezeichnet man den Kontakt mit heißen oder kochenden Flüssigkeiten. Die intrakutan auftretende Wärme beträgt hierbei per definitionem weniger als 100 °C. Entstehen durch Flammenwirkung (900 °C = mittlere Flammentemperatur) oder direkte Leitung (z.B. Metalle, Chemikalien) weitaus höhere Temperaturen in der Haut, so spricht man in diesem Fall von Verbrennungen. Durch das Einwirken von Hitze kommt es zum kontinuierlichen Wasserverlust. Aufgrund ihrer hohen spezifischen Wärme und geringen thermischen Leitfähigkeit vermag die Haut durch Verdampfen von intra- und extrazellulärem Wasser einer Temperaturerhöhung über 100 °C kurzzeitig entgegenzuwirken. Übersteigt die zugeführte Wärmemenge ein kompensierbares Maß, so kann die Hitze nicht durch die normalen Wärmeaus-

tauschvorgänge, wie Abstrahlung oder Abtransport der Wärme durch das Blut abgeleitet werden. In dieser frühesten Phase der Verbrennung muss davon ausgegangen werden, dass es in der Tiefe der Gewebeschichten zu einem "Nachbrennen" kommt. Dadurch kommt es auch nach Beseitigung der äußeren Wärmeeinwirkung zu anhaltender Gewebeschädigung. Die Folge ist weiterer thermischer Stress (Deitch, 1990; Germann et al., 1993). Um diesen Prozess zu unterbrechen, ist eine initiale physiologische Kühlung unerlässlich, wobei besonders bei großflächigen Verbrennungen bei Kleinkindern und älteren Menschen an die Gefahr der Unterkühlung gedacht werden muss.

Abhängig von der einwirkenden Hitze und der daraus resultierenden intrakutanen Temperatur kommt es zu unterschiedlichen pathophysiologischen Veränderungen der Haut: Das Ausmaß der thermischen Schädigung der Haut wird durch Temperatur und Einwirkzeit dieser Energie bestimmt. Schon Temperaturen von 40-44°C (Rennekampff et al., 2002) können bei längerer Einwirkung zu einer Enzymdysfunktion und Eiweißdegeneration führen. Eine Beeinträchtigung der Na⁺-Pumpe führt zu einer erhöhten intrazellulären Na⁺-Konzentration und damit zu einer Schwellung der Zelle. Übersteigt die einwirkende thermische Energie 44°C, sind die reparativen Möglichkeiten der Zelle nicht mehr gegeben, es kommt zur Nekrose bzw. zur Apoptose. Bei noch höheren Temperaturen (≥ 60°C) kommt es zur Denaturierung der Proteine. Hautareale, welche durch Nekrosen und Denaturierung gekennzeichnet sind, werden als Koagulationszone bezeichnet. Diese ist von einer Stasezone umgeben, die durch eine sehr eingeschränkte Gefäßzirkulation mit vermindertem Blutfluß charakterisiert ist. Der zeitliche Ablauf der Verminderung der Mikrozirkulation ist abhängig von der Stärke der thermischen Schädigung. Die Gefahr der Minderperfusion bis zur Stase ist bis 48 Stunden nach dem Trauma gegeben. Während dieser Zeit sind Noxen, die zu weiterer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation führen, unbedingt zu vermeiden. Ursache der Vasokonstriktion in der Stasezone sind Thromboxane, die aus Thrombozyten freigesetzt werden (Zhi-yang et al., 1992).

2.3.1 Tiefengrade der Verbrennungswunden

Aufgrund der pathophysiologischen Hautveränderungen lässt sich die Schwere der Verbrennung in drei verschiedene Grade einteilen. Die Grade richten sich nach der Schwere des Gewebeschadens (siehe auch Abbildung 3):

Verbrennungen I° (Temperaturen > 45°C): Bei der leichtesten Erscheinungsform ist die Verbrennung nur auf die Epidermis beschränkt. Es kommt zu Rötung, Schwellung, Spannungsgefühl und Schmerzen. Die Haut fühlt sich dabei weich an und ist leicht geschwollen. Diese Symptome verschwinden nach wenigen Tagen und heilen narbenlos ab (Walcher, 2004).

Verbrennungen II° (Temperaturen > 55°C): Man unterscheidet oberflächliche (IIa) und tiefdermale (IIb) Verbrennungen:

IIa: Hierbei handelt es sich um eine Schädigung der Epidermis. Nach einer anfänglichen Rötung kommt es sofort oder nach Stunden (abhängig von der Intensität der Verbrennung) zur Blasenbil-

ung. Die Blasen sind dabei prall gespannt und mit Flüssigkeit gefüllt. Die Haut über der Blase ist recht stabil. Platzen die Blasen auf, sieht man auf das hellrötliche und nässende Corium. Dieser Wundgrund ist stark infektionsgefährdet, da die Wundflüssigkeit einen idealen Nährboden für Bakterien darstellt. Haarwurzeln, Drüsen und Rezeptoren der Haut bleiben intakt, wodurch starke Schmerzen für den Patienten entstehen. Der Heilungsprozeß kann 2 bis 3 Wochen andauern und hinterläßt keine Narben. Allerdings können Pigmentstörungen in den betroffenen Gebieten auftreten (Walcher, 2004).

IIb: Bei tiefdermalen Verbrennungen wird die Dermis mitgeschädigt. Es finden sich Blasenbildung, ein feuchter bis trockener Wundgrund, erhöhte Konsistenz und blasse, weißliche bis gerötete Areale. Des Weiteren kommt es durch Schädigung der Schmerz- und Tastrezeptoren zu einem Sensibilitätsverlust und einer Reduzierung der Schmerzempfindung. Tiefdermale Verbrennungen heilen unter Narbenbildung ab (Walcher, 2004).

Verbrennungen III° (Temperaturen > 55°C) führen zu einer Schädigung aller Hautschichten bis in die Subcutis mit gräulich weißen oder gelblichen wachsartigen Verfärbungen der Haut (koaguliertes Kollagen) mit sichtbaren thrombosierten Blutgefäßen. Haare und Nägel fallen aus, es kommt zu einem vollständigen Verlust der Tast- und Schmerzrezeptoren. Allerdings gehen drittgradige Verbrennungen am Rande nahtlos in zweitgradige Verbrennungen über. Deshalb sind diese Randbereiche sehr schmerzhaft. Das so thermisch geschädigte Gewebe heilt unter Narben- und Keloidbildung ab. Besonders im Bereich von Gelenken kann es zu starken Kontrakturen kommen (Walcher, 2004).

Eine Sonderform der Verbrennung III°, früher auch als Verbrennung IV° bezeichnet, stellt die Verkohlung dar. Hierbei können Muskeln, Sehnen und/oder Knochen beteiligt sein.

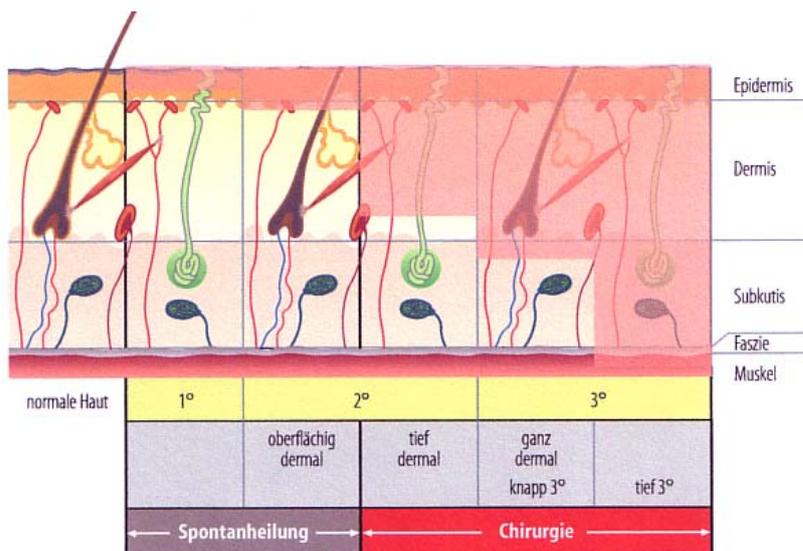


Abbildung 3: Die Verbrennungsgrade (Dirks, 1999)

2.3.2 Verbrennungsausdehnung

Die geschätzte Ausdehnung der verbrannten Körperoberfläche (KOF) dient als Maß zur Ermittlung der erforderlichen Infusionsmenge und ist für die Wahl des Transportmittels und der Zielklinik richtungsweisend. Eine genauere Dokumentation und Abschätzung der Verbrennungen erfolgt später in der Klinik (Demling et al., 1989; Johnson, 1995; Waltman, 1995; siehe Tabelle 1). Nicht nur für die weiterführende Therapie, sondern auch für die Prognose des jeweiligen Patienten sind die Verbrennungstiefe und das Verbrennungsausmaß entscheidend. Durch Fortschritte in Therapie und Pflege hat sich die Prognose von schwerst verbrannten Patienten in den letzten Jahren zwar deutlich verbessert (bei Verbrennungen von 70% KOF Überlebenschancen bis zu 50% (Donnersmarck, 1998)), dennoch sind Patienten mit mehr als 15% verbrannter KOF durch den so genannten Verbrennungsschock bzw. das Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS) letal gefährdet.

Tabelle 1: Klinische Einteilung der Schweregrade von Verbrennungen (American Burn Association, Leuwer, 1999)

Schweregrad	Kriterien (verbrannte KOF)
Leichte Verbrennungen	<ul style="list-style-type: none">• Erstgradige Verbrennungen• < 2% KOF drittgradig• < 15% KOF zweitgradig• bei Kindern < 10% KOF
Mittelgradige Verbrennungen	<ul style="list-style-type: none">• < 10% KOF drittgradig• 15 – 25% KOF zweitgradig• bei Kindern 10 – 20% KOF
Schwere Verbrennungen	<ul style="list-style-type: none">• 10 – 20% KOF drittgradig• 25 – 50% KOF zweitgradig• bei Kindern > 20% KOF• oder mittelgradige Verbrennung + Inhalationstrauma oder zusätzliche Verletzungen oder Schock oder Beteiligung von Händen, Füßen, Gesicht oder Dammregion oder chemische oder elektrische Verbrennungen
Schwerste Verbrennungen	<ul style="list-style-type: none">• 20% KOF drittgradig• 50% KOF zweitgradig

2.4 Immunologische Reaktionen nach thermischem Trauma

Von den systemischen Auswirkungen des Verbrennungstraumas ist in besonderer Weise das Immunsystem betroffen (Allgöwer et al, 1963). Dabei unterliegt die Fähigkeit des schwerverbrannten

Organismus, pathogene Keime zu bekämpfen und die Auswirkung von Infektionen zu verhindern, dynamischen Veränderungen. Initial wird durch das Verbrennungstrauma eine Aktivierung von humoralen und zellulären Abwehrmechanismen ausgelöst. Nach einer zunächst lokal begrenzten Entzündungsreaktion, gekennzeichnet durch Hyperämie und Schwellung, kommt es meist zu einer systemischen Entzündung. Wesentliche immunologische Reaktionen nach thermischem Trauma konnten in den vergangenen Jahren aufgedeckt werden. Somit sind die Mechanismen der Immunalteration heute in weiten Teilen beschrieben (Alexander, 1990). Auch die beteiligten Mediatorsubstanzen, zu denen Interleukine und andere Zytokine gehören, sind in Teilen ihrer Wirkmechanismen bekannt, über welche sie die immunologischen Reaktionen und die Kommunikation zwischen den beteiligten Zellen vermitteln.

2.4.1 Das Immunsystem

Die Immunabwehr des Körpers kann als die Fähigkeit des Organismus verstanden werden, eingedrungene Keime oder Fremdkörper bzw. veränderte körpereigene Zellen zu erkennen und unschädlich zu machen, um somit die Integrität des Organismus aufrecht zu erhalten. Dieses umfangreiche Abwehrsystem wird klassischerweise in die spezifische und unspezifische Abwehr unterteilt (Bauer, 1996). Das angeborene, unspezifische Immunsystem bedient sich bei der Abwehr zellulärer Elemente und löslicher Mediatoren. Zu den ersterwähnten zählen phagozytierende Zellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Monozyten), sowie basophile und eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Leberzellen, die Entzündungsmediatoren sezernieren und natürliche Killerzellen (NK) (Janeway, 1997). NK-Zellen haben die Fähigkeit, erregerinfizierte und maligne Zellen abzutöten.

Die von Makrophagen nach Antigenaufnahme gebildeten O_2 Radikale, Stickstoffmonoxid (NO), proteolytischen Enzyme sowie zytotoxischen Moleküle (z.B. Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)) unterstützen dabei die Desintegration und Eliminierung von Pathogenen und Tumorzellen (Moonis et al., 1992). Zu den molekularen Bestandteilen des unspezifischen Immunsystems gehören außerdem von der Leber gebildete Akute-Phase-Proteine, das Komplementsystem und ein Netzwerk von Zytokinen. Diese Polypeptide vermitteln hormonähnliche Signale, über die die verschiedenen Zellpopulationen des Immunsystems miteinander kommunizieren (s. Kap. 2.8). Die Vorgänge der unspezifischen Immunität werden bei Eintritt von Fremdan antigenen von der Aktivierung des spezifischen Immunsystems begleitet.

Die zellulären Träger des spezifischen Abwehrsystems sind B- und T-Lymphozyten. Sie vermögen über spezifische Rezeptoren und Bindungsstellen fast jede Fremdschubstanz, sogenannte Antigene (sofern sie eine Immunreaktion auslösen) zu erkennen und können diese von körpereigenen Substanzen (Selbstantigene) unterscheiden. Ein einzelner Lymphozyt erkennt und bindet dabei nur ein ganz bestimmtes Antigen. Die Bindung des Antigens an einen Lymphozyten bewirkt dessen Teilung und Vermehrung (Proliferation). Als Ergebnis dieser klonalen Expansion entstehen viele Lymphozyten mit gleicher Antigen spezifität. Das gilt für T- und B- Lymphozyten gleichermaßen, wobei

B-Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Plasmazellen reifen. Die T-Lymphozyten nehmen, je nach funktioneller Subpopulation, koordinierende Aufgaben wahr (T-Helferzellen) oder sind an der Erkennung und Elimination von Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen beteiligt (zytotoxische T-Zellen, ZTL; T-Killerzellen).

Neben der Entstehung von B- und T-Effektorzellen werden bei der akuten Immunantwort auch langlebige Gedächtniszellen ausgebildet. Bei einer erneuten Infektion mit demselben Erreger sind diese Gedächtniszellen für die wirkungsvollere Sekundärantwort zuständig (Janeway, 1997).

2.4.2 Das Gleichgewicht des Immunsystems

Das Aufrechterhalten eines dynamischen Gleichgewichts der Körperfunktionen ist eine grundlegende Fähigkeit des menschlichen Organismus. Diese Homöostase ermöglicht es insbesondere dem Immunsystem, sich den stetig wandelnden Umwelteinflüssen anzupassen. Beispielsweise besteht im gesunden Organismus eine fein ausgewogene Zytokinbalance. Proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und Interferon gamma (IFN- γ) stehen den antiinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel IL-4, IL-10 und TGF- β gegenüber. Die proinflammatorischen Mediatoren haben bei einer Infektion oder einem Gewebetrauma sowohl lokale als auch systemische Effekte. Zu den lokalen Wirkungen gehört zum Beispiel die Vermittlung einer Zellmigration von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten aus der Blutzirkulation in das Entzündungsgebiet. Proinflammatorische Zytokine sind daher in der Lage, eine Entzündungsreaktion zu initiieren und zu verstärken. Antiinflammatorische Zytokine übernehmen im Gegensatz dazu wichtige Aufgaben in der Unterdrückung einer zellvermittelten Immunreaktion und der Induktion einer humoralen, durch Immunglobuline vermittelten Immunantwort. Eine proinflammatorische Verschiebung der Zytokinbalance kann durch die Freisetzung von antiinflammatorischen Peptiden gegenreguliert werden (Miossec, 1995).

2.4.3 Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

Eine Verschiebung des immunologischen Gleichgewichts kann im schwersten Fall zu einem Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) führen. Dieses ist eine systemische Entzündungsreaktion, ausgelöst durch Infektion, schweres Trauma, hypovolämischen Schock oder Verbrennung (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003). Das Systemic Inflammatory Response Syndrome ist heute die Haupttodesursache nach thermischen Traumata. Es ist durch Fieber, Gefäßdilatation, Tachykardie, Tachypnoe und eine Leukozytose gekennzeichnet. Zytokine sind hier sowohl bei der Entstehung als auch zur Begrenzung und Bekämpfung des SIRS ausschlaggebend. Zytokine, die für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems verantwortlich sind, können in hohen Konzentrationen zu Gewebeschäden und sogar zu Organversagen führen. Im peripheren Blut von SIRS-Patienten sind besonders die Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 deutlich erhöht (Blackwell et al., 1996).

2.4.4 Zellen des Immunsystems

Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten CD34+ Stammzellen im Knochenmark ab (siehe Abbildung 4). Sie können entsprechend ihrer Differenzierung in lymphatische und myelomonozytäre Zellreihen unterschieden werden. Aus der lymphatischen Zellreihe gehen T- und B-Zellen sowie eine dritte Population von Lymphozyten, sogenannte „Nullzellen“ oder natürliche Killerzellen, hervor. Monozyten, polymorphkernige Granulozyten, Mastzellen und vermutlich auch dendritische Zellen sind myelomonozytären Ursprungs und spielen zusammen mit Keratinozyten eine wichtige Rolle im ‚Immunorgan Haut‘. Lymphatische und myelomonozytäre Zellen des Immunsystems können heute durch Zelloberflächenantigene unterschieden werden. Einige dieser Membranstrukturen sind spezifisch für Zellen bestimmter Linien oder Differenzierungswege, während die Expression anderer je nach Aktivierungs- oder Differenzierungsgrad derselben Zelle wechselt.

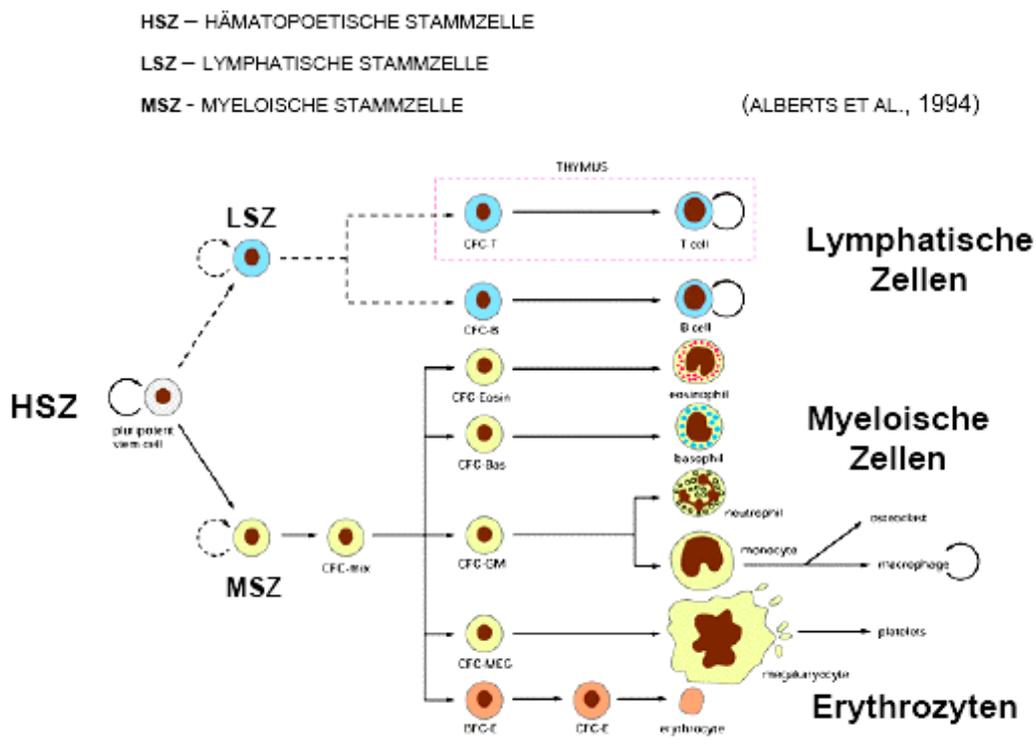


Abbildung 4: Entwicklung der immunkompetenten Zellen aus pluripotenten Vorläuferzellen (Alberts et al., 1994)

2.4.5 Skin Associated Lymphoid Tissue (SALT)

Die Haut wird heute als essentieller Bestandteil des körpereigenen Immunsystems angesehen. Eine Vielzahl von Zellen spielt dort bei der Vermittlung und Amplifizierung von Immunreaktionen zusammen. Zu dem von Streilein (1983) als "hautassoziiertes Lymphoidgewebe" (skin-associated

lymphoid tissue=SALT) beschriebene, spezielle Abwehrsystem der Haut, gehören Keratinozyten, Langerhanszellen und epidermotrope T-Lymphozyten-Populationen, sowie die Haut drainierende Lymph- und Blutgefäße und die regionalen Lymphknoten. Langerhans-Zellen (siehe oben) sind potente Immunzellen, die sich in normaler Epidermis in typischer suprabasaler Lokalisation befinden. Sie stammen aus dem Knochenmark und sind durch ihre dendritische Morphologie und die Ausprägung spezifischer Oberflächenmoleküle (z.B. MHC Klasse I, II oder CD 1a) gekennzeichnet. Ihre Hauptaufgabe ist die Induktion T-Zell-vermittelter Immunantworten vom verzögerten Typ (Typ-IV-Reaktionen) in der Haut (z.B. allergische Kontaktekzeme oder Transplantatabstoßungen).

Darüber hinaus können Langerhans-Zellen aber auch Immunantworten gegen bakterielle, virale oder Tumor-Antigene auslösen. Keratinozyten machen den Hauptteil der Zellen in der Epidermis aus und spielen für die Immunfunktion der Haut eine wichtige Rolle. Auf eine Noxe hin sind Keratinozyten in der Lage, eine große Menge an Zytokinen freizusetzen und eine Immunantwort auszulösen (Kupper, 1990). Ferner können "aktivierte" Keratinozyten MHC-Klasse-II-Antigene und Adhäsionsmoleküle exprimieren (Barker et al., 1999). Sie veranlassen die in der Epidermis situierten Langerhanszellen, sich aus dem Zellverband zu lösen, Antigen aufzunehmen, in die regionalen Lymphknoten zu wandern und dort vorstimulierte, „geprimte“ T-Zellen zu aktivieren. Aufgrund des Epidermotropismus bestimmter Lymphozyten wandern diese daraufhin in kürzester Zeit in die Hautpartie ein, in der die Noxe gesetzt wurde. Die Immunreaktion der Haut wird also durch eigene Zellelemente angestoßen, die zur Antigenerkennung, -aufbereitung und -präsentation fähig sind. Sie arbeiten mit den dazugehörigen Lymphknoten und epidermotropen Effektorzellen, die die Bekämpfung der Noxe im betroffenen Hautareal ausführen (Streilein, 1983), eng zusammen. Dieses spezielle Abwehrsystem wird ergänzt durch andere immunologisch relevante Zellen, die im gesamten Körper an Abwehr- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind und bei Bedarf in die betreffenden Regionen einwandern (Haustein, 1987).

2.5 Die Wundheilung

Die Wundheilung hat den Ersatz des durch Trauma geschädigten Gewebes zum Ziel. Sie ist kein rein lokaler Vorgang, sondern stellt eine komplexe Leistung des Gesamtorganismus dar, dessen Konstitution und Reaktionslage demzufolge Einfluss auf den Ablauf der Wundheilung haben. Für den ungestörten Ablauf der Gewebereparation sind Zytokine und Wachstumsfaktoren von essentieller Bedeutung (Mc Kay, 1991). Für die bestmögliche Wiederherstellung von Funktion und Morphologie des verletzten Gewebes ist ein gut koordiniertes Zusammenspiel einzelner Faktoren unabdingbar. Dieser Regelmechanismus ist bei der sekundären Wundheilung sowie bei Verbrennungen und in chronischen Wunden gestört (Lawrence, 1998; Donnersmarck, 1998).

Wundheilung ist ein dynamischer Prozess, der ein abgestimmtes Zusammenspiel von biochemischen und zellulären Systemen erfordert. Die zeitliche Abfolge reparativer Vorgänge wird klassisch in drei Phasen gegliedert (siehe Abbildung 5): eine exsudative bzw. inflammatorische, eine proliferative und eine regenerative Phase (Knapp et al., 1999). Diese Phasen beinhalten Koagulation, Entzündung, Kollagensynthese, Angiogenese, Epithelialisierung, Kontraktion und Umbau in Narbengewebe (Robson et al., 1990). Im Folgenden wird auf die Rolle der verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokine in der Wundheilung näher eingegangen.

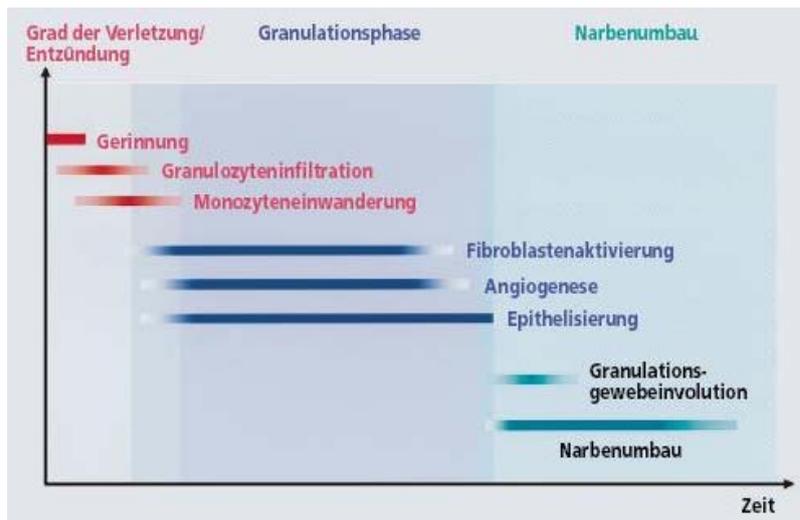


Abbildung 5: Phasen der Wundheilung (Smola et al., 2001)

In der **Entzündungsphase** hat eine Verletzung eine Blutung mit enzymatischer Aktivierung der Gerinnungs-, Komplement- und Kininkaskade zur Folge. Es entsteht ein Netzwerk von Fibrinfasern, Plasmabestandteilen (Fibronectin, Vitronectin) und Thrombozyten. Durch Aggregation und Aktivierung von Thrombozyten, die ein Reservoir von Zytokinen und Wachstumsfaktoren darstellen, werden TGF- β , EGF, FGF, Platelet-Derived-Growth Factor (PDGF) und Insulin-like Growth Factor (IGF) aus den α -Granula freigesetzt (Knighton et al., 1982; Lawrence, 1998). Neutrophile Zellen wandern schon wenige Minuten nach der Verletzung in die Wunde ein. Sie phagozytieren und produzieren proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-6), die zu einer Aktivierung von Fibroblasten und Keratinozyten führen. Voraussetzung für eine intakte Neutrophilenfunktion und eine erfolgreiche Infektabwehr ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Wunde (Knighton et al., 1984). Wachstumsfaktoren stimulieren die Einwanderung von Makrophagen, die als Monozyten aus dem zirkulierenden Blut in die Wunde gelangen. Makrophagen wiederum phagozytieren Bakterien und Gewebetrümmer und sezernieren selbst IGF-I, TGF- α und TGF- β , TNF- α , IL-1, FGF, PDGF und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Köveker, 1999). Makrophagen nehmen eine Schlüsselstellung in dieser Phase der Wundheilung und beim Übergang zu reparativen Vorgängen ein (Leibovich et al, 1975). Insbesondere PDGF und TGF- β begünstigen die mitotische und matrixsynthetisierende Aktivität von Fibroblasten (Debus et al., 2000). Diese erste Phase der Wundheilung geht nach ein bis drei Tagen in die Proliferationsphase über.

In der **Proliferationsphase** stimulieren Wachstumsfaktoren die Wundheilung durch eine Steigerung der Kollagensynthese und -ablagerung, der Angiogenese und der Epithelneubildung (Cohen, 2000). Kollagenneubildung und Neoangiogenese sind eng aneinander geknüpft: die Kollagensynthese erfordert Sauerstoff und Nährstoffe, die Neubildung der Gefäße erfordert extrazelluläre Matrix als Leitstruktur für die gerichtete Gefäßneubildung. Unter den Wachstumsfaktoren ist TGF- β der potenteste Stimulus der Kollagensynthese, da er gleichzeitig die Proteaseaktivität vermindern kann. Weiterhin fördern EGF, FGF und PDGF die Kollagenproduktion (Lawrence, 1998). Fibroblasten beginnen unter der Wirkung von Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten, Makrophagen, Keratinozyten zu proliferieren und kollagenreiche Matrix zu synthetisieren. Es entsteht ein provisorisches Gerüst aus Fibrin, Fibronectin und Hyaluronsäure, das die Grundlage für das neugebildete Granulationsgewebe darstellt. Fibroblasten sezernieren selbst FGF, IGF-I und PDGF. Keratinozyten sezernieren Kollagenasen, VEGF und TGF- β . Neue Gefäße wachsen aus den Kapillaren der Umgebung unter Wirkung von FGF und VEGF ein. Endothelzellen setzen IGF-I, PDGF, FGF und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) frei (Bennett et al., 1993). Diese Phase umfaßt den 4. bis 7. Tag nach der Verletzung.

In der **Regenerationsphase** nehmen Zelldichte und Vaskularisierung ab. Diese Phase wird von PDGF, TGF- β , FGF reguliert. Fibroblasten wandeln sich unter Wirkung von TGF- β und mechanischen Faktoren in Myofibroblasten um, deren Aktivität die Wundkontraktion maßgeblich reguliert. Für die Migration zur Wundoberfläche bilden Keratinozyten in ihrem Zytoplasma periphere Aktinfilamente, intensive Zell-Zell-Kontakte im Verband der Keratinozyten lösen sich (Tonofilamente retrahieren sich, Desmosomen lösen sich auf). Migration und Proliferation der Keratinozyten werden durch lokal freigesetzte Wachstumsfaktoren, wie Epidermal Growth Factor (EGF), TGF- α und Keratinocyte Growth Factor (KGF) und mechanische Effekte („free edge“ effect) beeinflusst (Werner et al., 1994; Nanney et al., 1996). Epidermale Zellen exprimieren Integrinrezeptoren und interagieren mit Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin und Vitronectin, die als Leitstrukturen für Zellwanderungen dienen. Der letzte Schritt der Reepithelisierung ist die Zellreifung mit der Verankerung der Zellen untereinander und mit der wiederhergestellten Basalmembran. Intensive Zell-Zell-Kontakte (z.B. Desmosomen) sind wieder nachweisbar. Der Reparationsprozeß wird mit der Kontraktion der Dermis und der Differenzierung der Keratinozyten abgeschlossen. In der Narbe entwickelt sich eine Balance zwischen Kollagenaufbau und -abbau. Die Reifung der Kollagenfasern durch dreidimensionale Vernetzung wird eingeleitet. Es entsteht mechanisch belastbares Narbengewebe (Hatz et al., 1994). Verläuft die Wundheilung exzessiv, bilden sich hypertrophe Narben und Keloide. Ursache hierfür ist der Verlust von Kontrollmechanismen, die das Gleichgewicht zwischen Wundheilung und Regeneration regulieren (Singer et al., 1992). Eine wichtige Rolle in der Reepithelialisierung spielen Reste von Haarfollikeln und Schweißdrüsen. Sie dienen als Reservoir von basalen Stammzellen. Sind alle Anhangsgebilde zugrundegegangen, werden sie in der Narbe nicht wieder regeneriert, weil die neugebildete Dermis nicht die Fähigkeit zu ihrer Induktion besitzt (Fritsch, 2004).

2.6 Therapeutisches Vorgehen bei Verbrennungspatienten

Um die physiologische Wundheilung zu unterstützen und ausgeprägter Narben- und Keloidbildung vorzubeugen, sollten Verbrennungswunden entsprechend ihren Tiefengraden, Ausdehnung und Lokalisation therapiert werden:

Epidermale und oberflächlich dermale Verbrennungen werden konservativ behandelt. Bei einer epidermalen Verbrennung ist die gesamte Epithelschicht erhalten, die Hautschichten müssen sich nicht regenerieren. So richten sich die unspezifischen Therapiemaßnahmen hier gegen die Symptome der lokalen Entzündungsreaktionen, insbesondere gegen den Schmerz. Lokale Kühlung - möglichst innerhalb von 20 Minuten nach der Verletzung mit ca. 15°C kaltem Wasser etwa 20 Minuten lang durchgeführt - ist zur Linderung der Beschwerden geeignet.

Oberflächlich dermale Verbrennungen hingegen fordern eine gezielte Therapie. Die Hautschichten der Epidermis sind hier weitgehend abgelöst. Basale Epithelzellen sind teilweise erhalten. Die Keratinozyten breiten sich von den basalen Schichten der Hautanhangsgebilde ausgehend aus. Die Wundflächen müssen während dieser Regenerationsphase, die 10-14 Tage andauert, vor Austrocknung und Besiedelung mit Bakterien geschützt werden. Hierzu stehen Brandsalben wie zum Beispiel Flammazinecreme® mit antimikrobiellen Wirkstoffkomponenten und pflegenden Salbengrundsubstanzen zur Verfügung (Pallua et al., 2006).

Tief dermale und drittgradige Verbrennungen stellen eine absolute Operationsindikation dar (Muller et al., 1996). Bei Schwer-Brandverletzten sollte unmittelbar nach deren Aufnahme und nach Beurteilung ihrer Brandwunden mit der operativen Entfernung von nekrotischer Haut begonnen werden. Die Erfahrung hat gezeigt, dass ein verzögerter Beginn der Nekrosenabtragung mit einer erhöhten Morbidität durch Wundinfektionen und damit mit einer signifikant erhöhten Letalität verbunden ist (Pallua et al., 2006).

2.6.1 Operatives Vorgehen nach großflächigen Verbrennungen

Der intensivmedizinische Kenntnisstand gibt mittlerweile auch Patienten Überlebenschancen, die Verbrennungen von über 80%, in Einzelfällen sogar 90% der KOF erlitten haben. Solche Verbrennungen stellen bereits in der primären Rekonstruktionsphase erhebliche therapeutische Anforderungen an den Operateur. So sind bei ausgedehnten tiefdermalen und drittgradigen Verbrennungen der Dermis die vorhandenen Spalthautentnahmestellen limitiert, auch wenn man stark expansive Verfahren anwendet, wie z.B. die Meshgraft-Technik (siehe Abbildung 6) oder die Meekgraft-Technik.

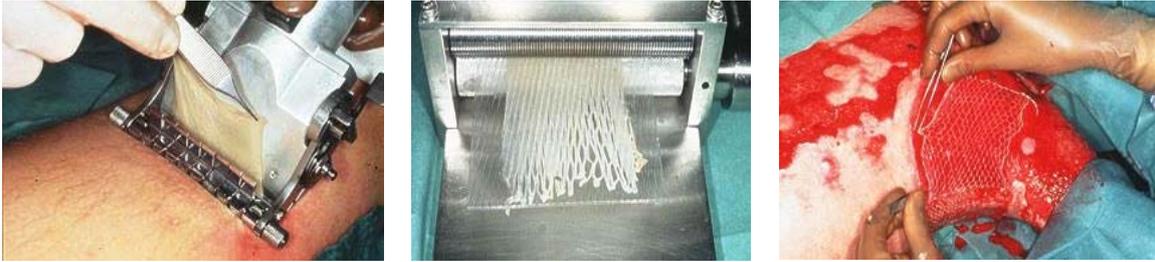


Abbildung 6: von links nach rechts: Entnahme von Spalthaut mit dem Akkudermatom, Expansion der Spalthaut mit der Mesh-Technik, Auflegen der gemeshten Spalthaut auf die Verbrennungswunde

Große Hoffnungen wurden deshalb an die Kultivierung autologer Keratinozyten geknüpft, welche einen primären Wundverschluss ermöglichen können. 1975 veröffentlichten Rheinwald und Green eine Methode zur Serienkultivierung humaner Keratinozyten, die es erstmals gestattete, aus einem kleinen Epidermisstück große Flächen transplantatfähiger Keratinozytenkulturen herzustellen (Mühlbauer, 1995).

Seit 1981 werden so genannte Keratinozytentransplantate zur Behandlung von Brandverletzten eingesetzt (Abbildung 7). Diese Transplantate sind ohne wesentliche Modifikationen auch heute noch Standard und bestehen aus einer mehrlagigen Epithelschicht auf einer Trägergaze (Sheet). Verwendet werden überwiegend autologe Keratinozytentransplantate, allerdings erlangen allogene Keratinozytentransplantate immer mehr Bedeutung. Der Einsatz dieser vorgefertigten, allogenen Keratinozytentransplantate zur Behandlung ausgedehnter Verbrennungen mit limitierten Spenderarealen ist nahe liegend, um die recht lange Zeitspanne bis zur Bereitstellung autologer Keratinozyten (3-4 Wochen) zu umgehen. Einige Verbrennungszentren verwenden für diese allogenen Transplantate Hautmaterial aus Mammareduktionsplastiken, welches nach Kultivierung und Kryokonservierung anschließend dem schwerverbrannten Patienten in Form einer Hautbank zu Verfügung steht. Den Spendern oder Patienten werden ca. 5-10 cm² Vollhaut oder Spalthaut entnommen, die Keratinozyten separiert und dann, wie unter Kap. 4.7.1 beschrieben, kultiviert.

Inzwischen können durch Weiterentwicklung der Originalmethode von Rheinwald und Green aus einer Hautbiopsie mit 3 cm² innerhalb von 3 bis 4 Wochen 1,7 m² Zuchthaut bereitgestellt werden. Dies entspricht fast der gesamten Körperoberfläche eines erwachsenen Menschen (Mühlbauer 1995). Nach etwa einer Woche im Kulturmedium werden die für eine Abstoßungsreaktion relevanten MHC-Klasse-II-Antigene nicht mehr von Keratinozyten exprimiert, ebenso ist die Expression von HLA-Antigen durch den Kultivierungsprozess und die anschließende Kryokonservierung verringert. Eine akute Abstoßungsreaktion nach Applikation allogener Keratinozytensheets wird daher bei klinischem Einsatz im Allgemeinen nicht beobachtet. DNA-spezifische Untersuchungen haben ergeben, dass der Überlebenszeitraum von allogenen Keratinozyten auf Verbrennungswunden lediglich ein bis zwei Wochen beträgt (v. Donnermarck, 1995; Przybilski et al., 2004). Deshalb werden sie als semipermanenter Hautersatz betrachtet, da sie alleine nicht in der Lage sind, einen definitiven Wundverschluss zu bewerkstelligen. Für die begrenzte Überlebensrate von allogenen

Keratinozytentransplantaten auf Verbrennungswunden werden Langerhans-Zellen, Lymphozyten, endotheliale Zellen und Melanozyten verantwortlich gemacht, welche die Expression spezifischer HLA-Antigene des Empfängers auslösen.

Die trotz des raschen Austauschs allogener durch körpereigene Zellen beobachtete, beschleunigte Wundheilung wird auf Zytokine und Wachstumsfaktoren zurückgeführt, die beim Zerfall der allogenen Keratinozytentransplantate freigesetzt werden (Przybilski et al., 2004).

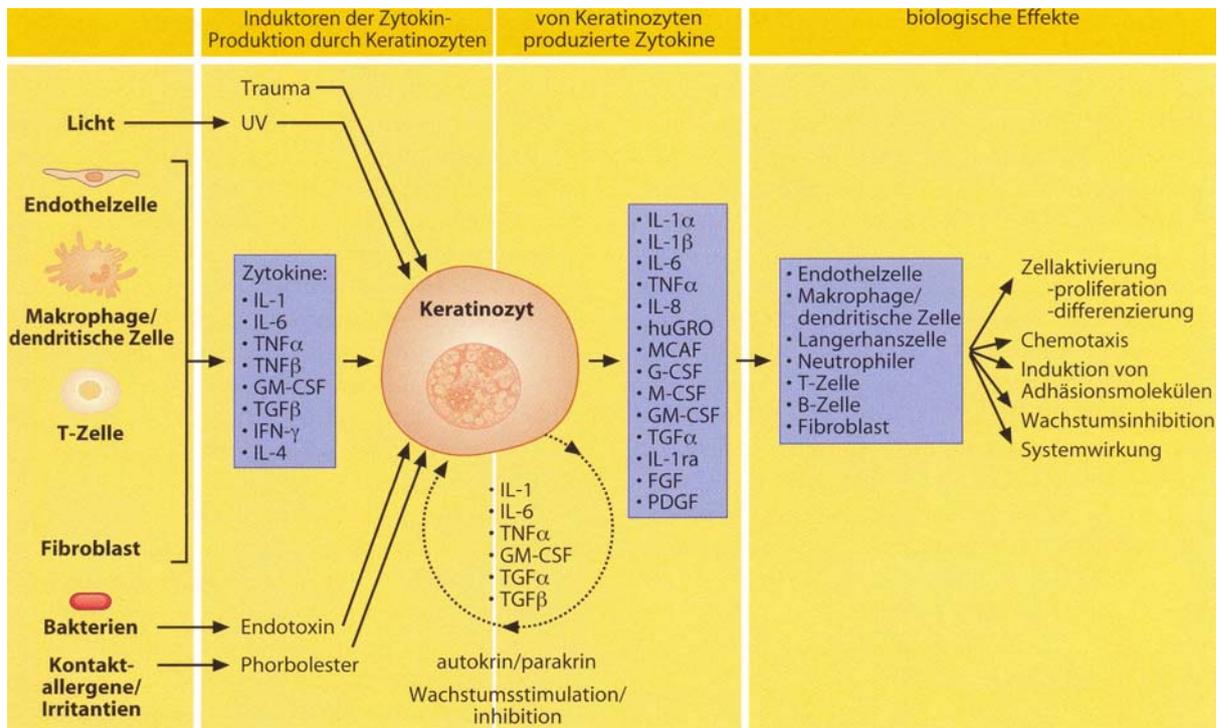


Abbildung 7: Von links nach rechts: Trägerfolie mit autologen Hauttransplantaten, Auflegen eines ‚sheets‘ auf eine tiefdermale Verbrennungswunde, Reepithelialisierung

2.7 Zytokinexpression der epidermalen Keratinozyten

Die Zytokinexpression humaner epidermaler Keratinozyten wurde in der letzten Dekade umfassend untersucht. Bis vor wenigen Jahren sah man die Keratinozyten lediglich als Träger des Rahmengerüsts der Epidermis und als Produzenten von Keratin und Lipiden, den Instrumenten der Barrierefunktion. Heute weiß man, dass Keratinozyten eine Vielzahl biologisch bedeutsamer Moleküle sezernieren, mit denen sie aktiv und wesentlich an vielen, insbesondere entzündlichen und immunologischen Reaktionen mitwirken (Grinnell, 1992). Aktiviert durch bestimmte Stimuli (Inflammation, Wundheilung) ändern Keratinozyten ihren Phänotyp und setzen Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die unter normalen Bedingungen nicht gefunden werden (Mc Kay et al., 1991; Kupper, 1990). Abbildung 8 zeigt eine Übersicht über die von Keratinozyten sezernierten Faktoren und deren autokrine und parakrine Beeinflussung vieler physiologischer und pathologischer Prozesse.

Abbildung 8: Der Diskurs von Keratinozyten und anderen Zellarten mittels Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Leigh et al., 1994)



3 Fragestellungen

Aufgrund der bisher veröffentlichten Studien und der unter Kap. 2.6 beschriebenen therapeutischen Möglichkeiten ergaben sich für die vorliegende Studie folgende Fragestellungen:

- Bestehen histologische Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der kultivierten allogenen Transplantate (KETs) aus Mammareduktionsmaterial und dem untersuchten Patientenmaterial, welches möglichst nahe dem verbrannten Hautareal entnommen wurde?
- Zeigen wundnah gewonnene Keratinozyten funktionelle Veränderungen hinsichtlich des in-vitro Sekretionsmusters ausgewählter Mediatoren im Vergleich zu „gesunden“ Epithelzellen aus Mammareduktionsmaterial?
- Bestehen Unterschiede im Sekretionsverhalten von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zwischen Keratinozytenkulturen von überlebenden Patienten und denen von verstorbenen Patienten?
- Welchen Einfluß hat die Kryokonservierung der allogenen und autologen Keratinozytentransplantate auf die in vitro Mediatorensynthese?

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Material

Zum Anzuchten und Färben der Spalthaut bzw. der Keratinozyten, sowie zum Messen der Keratinozytenüberstände wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

4.1.1 Anzucht der Keratinozyten

Dermatom, *Aesculap, Tuttlingen*

Zellkultur-Flaschen Standard, 75 cm², P 90760, *Biochrom AG Seromed, Berlin*

Brutschrank, *Fa. Heraeus, Hanau*

Grassolind, neutral (Salbenkomresse), *Paul Hartmann AG, Heidenheim*

Beutelsset Haut – Transplantation (zum Einfrieren der Sheets), *Dr. Marx, Medizintechnik, Gauting*

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) w. 3,7 g/l NaHCO₃ w. 1,0 g/l D-Glucose w/o L-Glutamine, *Biochrom AG Seromed, Berlin*

Dulbecco's MEM/HAM's F-12 (1:1) w. Glutamine, *Biochrom AG Seromed, Berlin*; supplementiert mit definierten Mengen an L-Glutamine, NaHCO₃, EGF, FKS (Fötales Kälberserum) Gentamycin, Insulin, Hydrocortison

MEM (Minimal Essential Medium) Earle, w. 20 mM HEPES-Pufferlösung, w/o NaHCO₃, *Biochrom AG Seromed, Berlin*

Dispase (von bacillus polymyxa grade II), *Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*

4.1.2 Anfärben der Zellen mittels der Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Objektträger, Super Frost, *Firma Menzel, Burgdorf*

Deckgläser, *Firma Menzel, Burgdorf*

Kaiser's Gelatine, *Merck KGaA, Darmstadt*

Trypsin, *Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe*

Dispase (von Bacillus polymyxa grade II), *Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*

Phosphate buffered saline (PBS), enthält: Natriumchlorid (160g) *Fluka, Deisenhofen*; Kaliumchlorid (4g) *Fluka, Deisenhofen*; Kaliumhydrogenphosphat (4g) *Merck*, Dinatriumhydrogenphosphat (28,4g) *Merck KGaA, Darmstadt*, gelöst in 20l aqua dest.

D-PBS (-CaCl₂, -MgCl₂), *Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe*

Biotin (Biotin-S conjugated affini pure rabbit antimouse IgG IgM), *Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA*

Streptavidin (Peroxidase conjugated Streptavidin), *Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA*

Avidin/Biotin Blocking Kit, *Vector laboratories, Inc, Burlingame Ca 94010, USA*

ACE-Färbelösung (enthält: 50mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) in 5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst, *Fluka, Deisenhofen*, 200ml Aqua dest., 2ml 100xNatriumacetatstammlösung, 100µl 30%iges H₂O₂)

100xNatriumacetatstammlösung (enthält: 50 ml Aqua dest., 28,7 g Natriumacetat, 9,4 ml Essigsäure, auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen)

4.1.3 Anfärbung der Zellen mittels der Hämalaun-Eosin-Methode (HE-Färbung)

Mayers Hämalaun, *Merck KGaA, Darmstadt*

1%ige Eosinlösung (enthält: 1g Eosin von *Merck KGaA, Darmstadt* in 1l destilliertem Wasser lösen und filtrieren, 10 Tropfen Eisessig zugeben und im Dunkeln lagern, vor Gebrauch 2 Tropfen Eisessig/200ml Lösung zugeben)

Xylol, *Merck KGaA, Darmstadt*

4.1.4 Messen mit dem Bio-Plex-System

Bio-Plex-Protein-Array-System Co. 171-000001, *BIO RAD Laboratories 2000 Alfred Nobel, Dr., Hercules, CA 94547, USA*

Mikrotiterplatte, *BIO RAD Laboratories 2000 Alfred Nobel, Dr., Hercules, CA 94547, USA*

Vaccum Pump, *BIO RAD Laboratories 2000 Alfred Nobel, Dr., Hercules, CA 94547, USA*

Vibrofix VF1 Electronic, *Janke&Kunkel KG, Ika-Werk, Staufen im Breisgau*

IKA-Schüttler MTS 2, *Bachofer, 74120 Reutlingen*

Waschträger für Bio-Plex-Protein-Array-System: Sheath Fluid Co. 13340, *BIO RAD Laboratories 2000 Alfred Nobel, Dr., Hercules, CA 94547, USA*

Assay Buffer A, Bio Plex, Co. 99977, *BIO RAD Laboratories 2000 Alfred Nobel, Dr., Hercules, CA 94547, USA*

Wash Buffer A Bio Plex, *BIO RAD Laboratories 2000 Alfred Nobel, Dr., Hercules, CA 94547, USA*

Human Cytokine Standard, Co. 97856, *BIO RAD Laboratories 2000 Alfred Nobel, Dr., Hercules, CA 94547, USA*

Beads: Anti-Human-Cytokine 8-Plex A conjugated beads; Anti-Human IL-6 und IL-8 conjugated beads, *BIO RAD Laboratories 2000 Alfred Nobel, Dr., Hercules, CA 94547, USA*

4.1.5 Messen von TGF-beta1 nach dem ELISA-Prinzip

ELISA-Reader, Vmax, *Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA*

Mikrotiterplatte, *Biosource Europe SA, B-1400 Nivelles, Belgium*

Extraction Solution, *Biosource Europe SA, B-1400 Nivelles, Belgium*

Standard Diluent Buffer, *Biosource Europe SA, B-1400 Nivelles, Belgium*

TGF- β 1-Biotin-Conjugate, *Biosource Europe SA, B-1400 Nivelles, Belgium*

Dilution-Wash-Solution, *Biosource Europe SA, B-1400 Nivelles, Belgium*

Streptavidin-HRP Working-Solution, *Biosource Europe SA, B-1400 Nivelles, Belgium*

Stabilized Chromogen, *Biosource Europe SA, B-1400 Nivelles, Belgium*

Stop-Solution, *Biosource Europe SA, B-1400 Nivelles, Belgium*

4.2 Krankengut und klinische Auswahlkriterien

Bei den Studienpatienten handelt es sich um Schwerbrandverletzte der Abteilung für plastische und wiederherstellende Chirurgie (Zentrum für Schwerbrandverletzte) des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen.

Der klinische Teil der Studie und die Erfassung der Patienten fanden im Zeitraum vom 30.11.02 bis zum 18.11.04 statt.

4.3 Auswahl der Patienten

Als Aufnahmekriterien wurden eine mindestens 25%ige Verbrennung der gesamten Körperoberfläche (KOF) mit einem Schweregrad II und/oder III festgelegt.

Weitere Voraussetzungen zur Aufnahme in unser Patientenkollektiv waren die Möglichkeit des Studienbeginns am Tag der Verbrennung (bis ca. acht Stunden nach thermischer Schädigung) bzw. Tag 1, die Keratinozytenabnahme am intubierten Patienten, das Alter des Patienten (< 70 Jahre) und das Einverständnis der Patienten oder ihrer Angehörigen.

4.4 Dokumentation

Die klinischen Verlaufsdaten der Studienpatienten wurden bei jeder Blutentnahme mit Hilfe eines für die Studie eigens entwickelten Patientendokumentationsblattes erhoben. Am Ende der Studie wurden die noch fehlenden Daten an Hand der jeweiligen Krankenakten vervollständigt.

4.5 Demographische Daten

Das Durchschnittsalter der Studienpatienten betrug 38 Jahre. 16 zufällig ausgewählte Patientinnen der plastisch-chirurgischen Abteilung im Alter zwischen 20 und 50 Jahren mit einer Brustverkleinerung stellten das Kontrollkollektiv.

In der Tabelle 2 sind das Geschlecht (Sex), das Alter (Jahre), der Anteil der verbrannten Körperoberfläche an der gesamten Körperoberfläche (KOF in %), der Verbrennungsgrad und der klinische Verlauf sowie ggf. der Todeszeitpunkt (Tage post Trauma) der Studienpatienten dargestellt.

Tabelle 2: Demographische Daten der Studienpatienten

Pat. Nr.	Sex (m/w)	Alter (Jahre)	Zeitpunkt d.Keratinozyten-abnahme	KOF (%)	Verbrennungsgrad	Klin. Verlauf	Verstorben	intubiert	Inhal.-trauma
1	m	50	1	43	II-III	Sepsis	Nein	Ja	Nein
2	m	54	0	31	II-III	o.Kompl	Nein	Ja	Nein
3	m	48	0	25	II-III	o.Kompl	Nein	Ja	Nein
4	m	56	0	45	II-III	Sepsis	Ja (43d)	Ja	Nein
5	m	72	1	57	II-III	MOV	Ja (11d)	Ja	Ja
6	w	65	0	45	II-III	MOV	Ja (30d)	Ja	Ja
7	w	39	0	30	II-III	o.Kompl	Nein	Ja	Nein
8	m	31	1	45	II-III	o.Kompl	Nein	Ja	Ja
9	m	49	3	40	II	Hep.A/B	Nein	Ja	Nein
10	m	32	0	58	II	Sepsis	Nein	Ja	Ja
11	m	21	1	45	I-II	o.Kompl	Nein	Ja	Nein
12	m	30	1	50	II	o.Kompl	Nein	Ja	Nein
13	m	18	0	40	II-III	Sepsis	Nein	Nein	Nein
14	w	34	0	45	II-III	MOV	Ja (68d)	Ja	Nein
15	m	29	1	50	II-III	o.Kompl	Nein	Ja	Nein
16	m	39	1	25	II	o.Kompl	Nein	Ja	Nein
17	m	27	0	48	II-III	Sepsis	Nein	Ja	Nein

4.6 Statistik

Die Streuung der Mittelwerte (MW) ist prinzipiell als Standardfehler (SF) angegeben. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Stichproben (Verbrennungspatienten versus Kontrollen) wurden mit dem T-Test für parametrische Daten oder im Falle nicht parametrischer Daten mit dem Mann-Whitney U-Test (Rangsummentest) erfasst. Die minimal geforderte Signifikanz für $p < 0.05$ (*) definiert. Präsentiert werden die Ergebnisse in einem Achsensystem, wobei die y-Werte die gemessene Konzentration des jeweiligen Zytokins/Wachstumsfaktors darstellen, während die X-Werte die Kulturdauer zeigen. Die grafischen Darstellungen erfolgen über so genannte Boxplots, die den Median (durchgezogene Linie in der Box), den Mittelwert (unterbrochene Linie in der Box), die Quartile und die Extremwerte anzeigen. Die Box stellt den Interquartilbereich mit 50% der Werte dar, die von der Box ausgehenden Linien führen bis zur 5.-95. Perzentile.

4.7.1.3 Protokoll zur Kultivierung der Keratinozyten

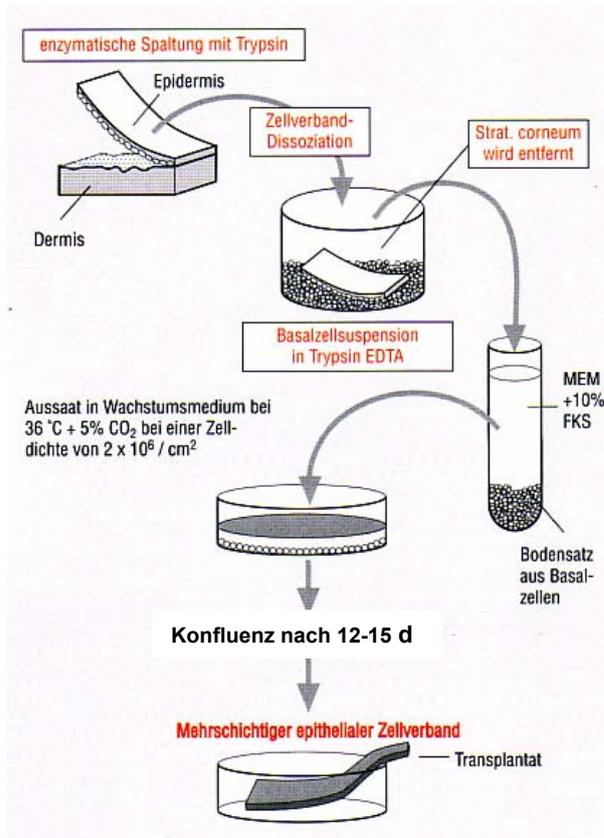


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Keratinozytenkultivierung (modifiziert nach v. Donnersmark, 2002)

- Einlegen der gewonnenen Spalthaut in einer Trypsin-EDTA-Mischung (Trypsin 0,05%/EDTA 0,02%) für 12 bis 18 Stunden (je nach Dicke der Haut) zum Lösen der Keratinozyten vom darunterliegenden Bindegewebe.
- Mechanisches Ablösen der Hautzellen von ihrem Untergrund und Auffangen in einer mit DMEM/HAMS-F12-gefüllten Petrischale.
- Zentrifugieren der in Lösung gegangenen Zellen bei $200 \times g$ und Resuspendieren des Pellets mit 10 ml DMEM/HAMS-F12-Medium.
- Befüllen der Zellkultur-Flasche mit 20 ml Zellsuspension (entspricht ca. 2×10^6 Zellen pro Flasche).
- Bebrüten der Zellkulturflasche für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank, anschließende Kontrolle des Zellwachstums unter dem Mikroskop, „Füttern“ der Zellen mit dem supplementierten Nährmedium DMEM/HAM's F12.
- Nach drei Tagen, Absaugen des Überstandes, Abfüllen des abgesaugten Mediums in Aliquots à $100\ \mu\text{l}$ und Einfrieren bei -80°C .



Abbildung 11: Adhärenz Zellen am Boden einer Zellkulturflasche (10. Kultivierungstag)

- „Füttern“ der Keratinozytenkultur mit dem supplementierten Nährmedium DMEM/HAM's F12 alle 3 Tage, letzter Mediumwechsel jeweils 3 Tage vor dem Abfüllen der Überstände an Kultivierungstag 10 und 15 in Aliquots à 100 µl und Einfrieren bei -80°C.
- Nach Tag 15 findet sich ein geschlossener Zellrasen auf dem Boden der Flasche (Abbildung 12); Auflöten der Zellkulturflasche und Absaugen des Mediums.

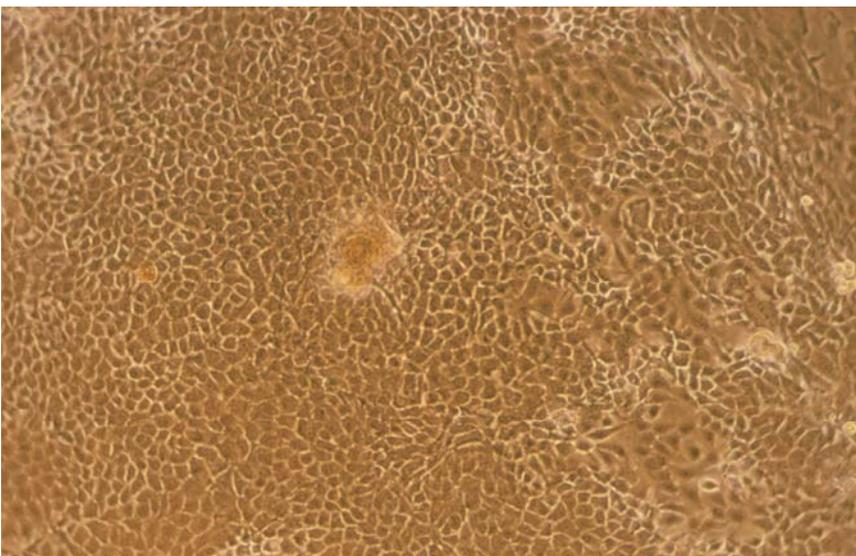


Abbildung 12: Photographische Darstellung einer Keratinozytenkultur an Tag 15 (Originalvergrößerung x100)

- Waschen der adhärenen Zellen mit 20 ml DispaseLösung (2,5 mg/ml DMEM) für 20 min. bei 37°C und 5% CO² zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden.
- Zweimaliges Waschen der adhärenen Zellen mit PBS-Dulbecco w/o Ca₂Mg₂. Anschließendes Anfeuchten der Zellen mit DMEM.
- Zum Herstellen der Sheets: Auflegen eines 75 cm² großen Stückes Grassolind auf den Zellrasen (Abbildung 13) und Befestigung mit Hämoclips, mechanisches Ablösen des Sheets vom Flaschenboden und Aufbewahrung für 24 Stunden in einer mit DMEM gefüllten Petrischale im Brutschrank.

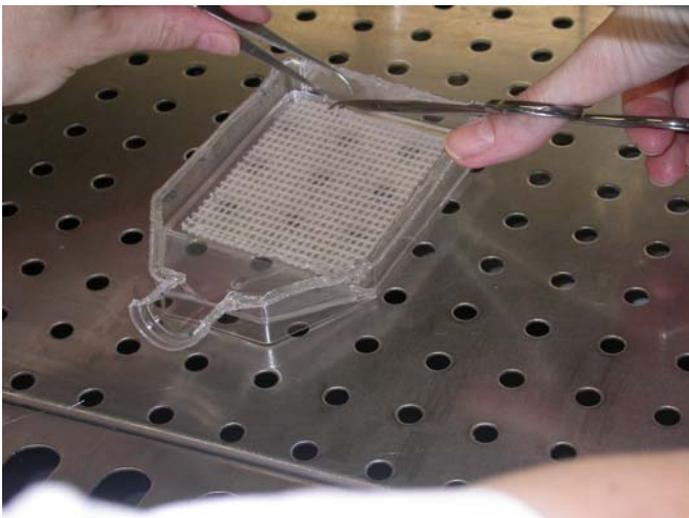


Abbildung 13: Herstellung der ‚sheets‘

- Nach 24 Stunden Absaugen des Überstandes und Abfüllen in Aliquots à 100 µl (entspricht dem Zeitpunkt „prä kryo“) und anschließendes Einfrieren bei -80 °C.

4.7.1.4 Einfrieren der Keratinozyten

Häufig werden die aus Mammareduktionsmaterial hergestellten Sheets nicht sofort zur Wunddeckung verwendet. In diesem Fall besteht die Möglichkeit der Kryokonservierung bei -80°C. Kryokonserviert stehen die Sheets einer klinikinternen Hausbank für spätere Verwendung zur Verfügung. Vorbereitung der Kryokonservierung:

- Vorkühlen des Sheets in einem Einfriermedium (MEM Earle, 20% FKS, 10% DMSO) bei ca. 4°C.
- Einschweißen des Sheets in einen Aluminiumbeutel (Beutelsset Haut-Transplantation, bestehend aus einem Beutel aus Kombinationsfolie mit biologisch inertem Polyolefin an der Innenseite, drei Seiten offen und mit Einlegetuch aus geprägtem bioverträglichem Polyolefin).

- Anschließendes Einfrieren des Aluminiumbeutel bei -80°C .

Auftauen der Sheets: Inkubieren in einer mit DMEM gefüllten Petrischale im Brutschrank (Abbildung 14).

- Nach 24 Stunden Absaugen des Überstandes und Abfüllen in Aliquots à $100\ \mu\text{l}$ (entspricht dem Zeitpunkt ‚post kryo‘).

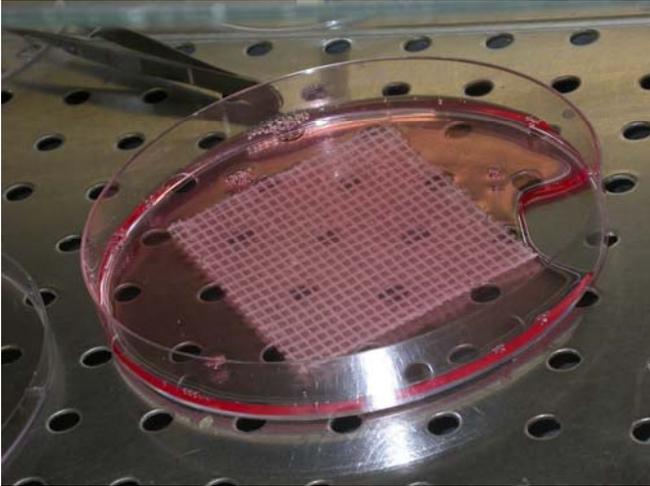


Abbildung 14: Inkubation des Sheets in DMEM

4.7.2 Kontrollgruppe: Hautmaterial aus Mammareduktionen

Das Material für die Kontrollgruppe wurde aus der überschüssigen Haut nach Mammareduktion gewonnen. Die Patientinnen wurden diesbezüglich vor dem operativen Eingriff aufgeklärt. Die Anzuchtung erfolgte analog dem oben beschriebenen Procedere.

4.7.3 Anfärben der Zellen eines Sheets

Zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung eines Keratinozyten-Sheets, wurden jeweils am 10. Kultivierungstag nach Abnahme der Hautzellen die anschließend hergestellten Zytospins einer Mammareduktion und eines Verbrennungspatienten mit der (Strept-) ABC-Methode und AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) als Substrat angefärbt. Außerdem führten wir eine histologische Färbung der Sheets mit Hämalaun-Eosin durch.

4.7.3.1 Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)

Diese Methode wurde 1977 von Hegenes und Ash erstmals in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, 1981 von Hsu et al. modifiziert und gilt auch heute noch als ein herausragendes indirektes Nachweisverfahren histologischer Antigene oder anderer Zellmarker. Sie nutzt die starke Affinität zwischen dem Protein Avidin und dem Vitamin Biotin (Affinitätskonstante $10\ \text{Mol/l}$). Avidin ist ein

Glycoprotein mit vier Bindungsstellen und einem Molekulargewicht von 68 kD. Sein isoelektrischer Punkt (Ip) liegt um 10. Allerdings bewirken dieser hohe Ip und der Zuckeranteil eine relativ starke unspezifische Bindung an biologische Strukturen, wie z.B. an Zellmembranen. Diesen Nachteil kann man mit dem Einsatz eines zu Avidin analogen Proteins, dem sogenannten Streptavidin mit einem Ip im sauren Bereich, einem niedrigeren MG von 60 kD und einer fehlenden Zuckergruppe, umgehen (Peters et al., 1985). Biotin ist die wasserlösliche Form des Vitamin H. Es kann sich mit seinem kleinen Molekulargewicht von 244 Dalton (Moss and Lane, 1971) über die Carboxylgruppe leicht an monoklonale Antikörper binden und so in der gekoppelten Form in vielen immunchemischen Techniken verwendet werden. Die Kopplung der monoklonalen Antikörper an Biotin weist im Vergleich zu der bereits beschriebenen direkten Konjugierung der Antikörper mit Enzymen wesentliche Vorteile auf. Es lassen sich einerseits pro Antikörpermolekül mehrere Biotinmoleküle binden, was zu einer erheblichen Signalverstärkung führt. Andererseits können biotinylierte Antikörper mit unterschiedlichen Avidin oder Streptavidinkonjugaten nachgewiesen werden. Bei der Avidin-Biotin-Methode bindet ein Primärantikörper an das zu untersuchende Gewebsantigen. Nun folgt eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der kovalent an Biotin gebunden und gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Der nachfolgend zugegebene Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex lagert sich mit der freien Bindungsstelle des Avidins an das Biotin an. Nach Zugabe des Chromogens erfolgt über Oxidation der Farbumschlag, wobei dieser durch die bereits erwähnte Signalverstärkung eine hohe Intensität aufweist (Peters, 1985)

4.7.3.2 HE-Färbung (Hämalaun-Eosin)

Die Hämalaun-Eosin- (HE-) Färbung ist die gängigste Übersichtsfärbung in der Histologie und Histopathologie. Der Farbstoff Hämalaun färbt im alkalischen Milieu basophile Strukturen wie Zellkerne intensiv blau. Das Zytoplasma wird anschliessend mit einer eosinhaltigen Lösung rot gegengefärbt. (Vorgehen wie unter 4.7.4 beschrieben)

4.7.3.3 Protokoll zur Herstellung der Zytozentrifugenpräparate

- Erhitzen der Dispase auf 37°C.
- Absaugen und des Überstandes aus der Zellkulturflasche und Abzentrifugieren der nicht adhären Zellen bei 600 x g.
- Waschen der adhären Zellen mit 15 ml DMEM.
- Waschen der adhären Zellen mit 13 ml Dispaselösung (2,5 mg/ml DMEM) für 40 min. bei 37°C und 5% CO₂ zum Ablösen des Sheets vom Flaschenboden.
- Mechanisches Zerlegen des Sheets, anschließendes Trypsinieren (mit 2-fach Trypsin in EDTA) für 50 min im Brutschrank bei 37°C.
- Waschen (2x) mit D-PBS-Puffer (35 ml) für jeweils 10 min, danach Abzentrifugieren bei 300 x g
- Resuspendieren mit D-PBS-Puffer (ca. 3ml).

- Vitalfärbung der Zellen mit Trypanblau, Bestimmung der vitalen Zellen in der Neubauer Zählkammer.
- Zusammenführen der kleinen Zellen aus dem Überstand mit den vormals adhärenenten, jetzt abgelösten Zellen, Zentrifugieren bei 1000 U/min anschließendes Resuspendieren mit D-PBS-Puffer.
- Vorbereitung der Zytozentrifuge, Herstellung der Zytospins, Zentrifugieren bei 35 x g für 5 min.

4.7.3.4 Protokoll der immunhistochemischen Färbung mit der ABC- Methode und AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) als Substrat

- Fixierung mit Acetonlösung und anschließendes Trocknen der Zytospins für jeweils 8 min bei Raumtemperatur.
- Blockade der Fc-Rezeptoren mit AB-Serum 1:10 verdünnt in 1X PBS für 30 min. in der feuchten Kammer.
- Blockade von endogenem Avidin und Biotin mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit für 15 min.
- Anschließendes Waschen (3x) mit PBS-Lösung.
- Überschüssige Flüssigkeit um das Präparat herum abtupfen und Überschichten mit dem jeweiligen Primäantikörper (verdünnt mit 10%igem AB-Serum).

Tabelle 3: Verwendete monoklonale Primäantikörper zur Phänotypisierung von Keratinozyten-Sheets

Antigen	Antikörper Klon	Isotyp	Produkt No.	Firma	Antikörperkonz.	Arbeitskonz.	Verdünnung
Negativkontrolle	MOPC21	IgG1	M9269	Sigma, St. Louis	1 mg/ml	6,6 µg/ml	1:150
Negativkontrolle	UPC-10	IgG2a	M9144	Sigma, St. Louis	1 mg/ml	2 µg/ml	1:500
Zytokeratin 2,6,8,10,11,18,19	KL-1	IgG1	1918	Immunotech, Marseille	126,5 ng/ml	0,32 ng/ml	1:400
Vimentin	Vim 3B4	IgG2a	M7020	Sigma, St. Louis	60 µg/ml	0,60 µg/ml	1:100
CD 45	T 200	IgG1	M0701	Sigma, St. Louis	0,45 mg/ml	4,5 µg/ml	1:100
PECAM-1/CD 31	1F11	IgG1	2052 Klon 1F11	Immunotech, Marseille	200 ng/ml	2 ng/ml	1:100
DC-Sign/ CD 209	DCN46	IgG2b	551249	BD Biosciences	31,25 µg/ml	1,25 µg/ml	1:25
Zytokeratin 5,6,8,17	MNF-116	IgG1	M0821	Dako Cytomation	0,12 mg/ml	2,4 µg/ml	1:50

- 3x Waschen für 5 min. in PBS (0,01 M; pH 7,4), anschließend für 30 min mit Biotin (1:4000 in 10%igem AB-Serum/1xPBS) überschichten.
- 3x Waschen für 5 min in PBS (0,01 M; pH 7,4), anschließend mit Streptavidin (1:1000 in 10%igem AB-Serum/1xPBS verdünnt) überschichten.
- 3x Waschen für 5 min PBS (0,01 M; pH 7,4).
- 8 min. in der Färbewanne mit AEC-Färbelösung unter ständigem Schütteln im Dunkeln inkubieren.
- kurzes Schwenken in Leitungswasser und anschließendes Gegenfärben mit Hämalaun für ca.10 sec.
- Für 10 min. mit Leitungswasser spülen, danach eindecken mit Gelatine.

4.7.3.5 Protokoll der Hämalaun-Eosin- (HE-) Färbung

- Fixierung der Zytospins für 5 min in 1%igem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur (RT).
- Wässern für 5 min in destilliertem Wasser bei RT.
- Färben der Zellkerne mit Mayer's Hämalaunlösung für 5 min.
- Spülen mit destilliertem Wasser.
- Wässern unter Leitungswasser für 10 min zum Bläuen der Kerne.
- Färben des Zytoplasmas mit 1%iger Eosinlösung für 8 min.
- Spülen mit destilliertem Wasser für 3 min zum Entfernen des überschüssigen Eosins.
- Entwässern der Zytospins in aufsteigenden Alkoholreihe: 90% für 30 sek., 96% für 30 sek., absoluter Alkohol für 2x2 min, abschließend für 2x5 min in Xylol.
- Eindeckeln der Präparate mit Eukitt (schnell härtendes Eindeckmedium für mikroskopische Präparate).

4.7.4 Das Prinzip des Bio-Plex Immunoassay System

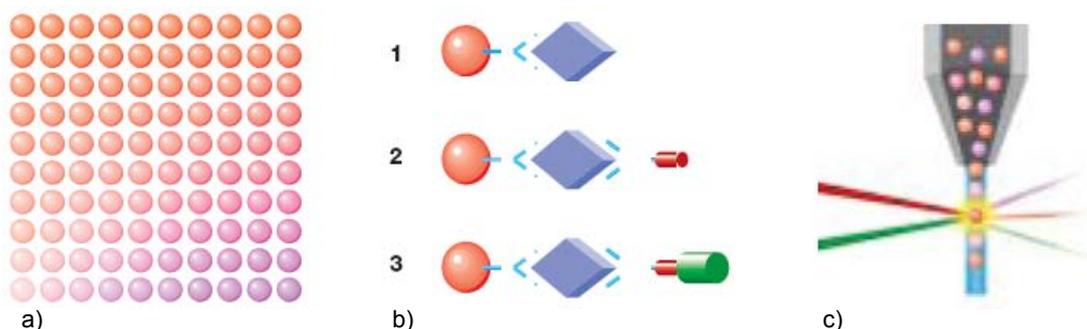


Abbildung 15: Das „Bio-Plex suspension array system“

Zur Quantifizierung der von uns untersuchten Zytokine und Wachstumsfaktoren wurde das Bioplex Protein Array System der Firma Biorad verwendet, mit welchem simultan bis zu 100 verschiedene Proteine in einer einzigen Kavität einer 96-Loch Mikrotiterplatte analysiert werden können (siehe

Abbildung 15). Das Prinzip funktioniert analog eines modifizierten Sandwich-Immunoassays. Hierbei sind verschiedene monoklonale zytokinspezifische Antikörper kovalent an unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Beads (a und b) gebunden (analog zur Fixierung auf einer Mikrotiterplatte). Ein biotinylierter Sekundärantikörper ist gegen die jeweiligen Epitope der zu messenden Zytokine gerichtet (b). Nach Zugabe von Streptavidin- Phycoerythrin (PE), das an den biotinylierten Antikörper bindet, findet die Messung im *Bio- Plex Protein Array System* statt (b und c). Die Messung erfolgt nach dem durchflusszytometrischen Prinzip: Mittels einer Kanüle wird jeweils ein kleines Volumen aus der Probe aufgenommen und zu einer Durchflusszelle geleitet, welche die Beads einzeln in einem gleichmäßigen Strom durchfließen. Hierbei werden die Polystyrolkugeln an zwei verschiedenen Lasern vorbeigeleitet. Während der erste „rote“ Laser die einzelnen Kügelchen und damit die Proteine klassifiziert, dient der zweite „grüne“ Laser (mit einer Exzitations-Wellenlänge von 532 nm) zur Anregung der auf der Kügelchenoberfläche gebundenen Fluorochrome, wodurch die gebundene Menge der jeweiligen Zytokine und Wachstumsfaktoren aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität quantifiziert wird (Abbildung 15).

4.7.4.1 Procedere des Bio-Plex Immunoassay Systems

Zur Messung von IL-1 α , IL- β , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ , VEGF, FGF-basic, TNF- α , GM-CSF und G-CSF wurde wie folgt vorgegangen. Die Durchführung erfolgte mittels Reagenzien-systemen der Firma Bio-Rad (siehe 4.1.4).

- 25 ng lyophilisierte Zytokinstandards in jeweils 50 μ l A. dest resuspendieren und für 30 min auf Eis inkubieren
- Anschließendes Herstellen einer Standard-Verdünnungsreihe (1:4).
- Herstellen der Arbeitslösung aus der Stammlösung: Dazu jeweils 2 μ l der „anti-cytokine conjugated beads“/well mit Assay Buffer A auf 50 μ l verdünnen.
- 2x Waschen der Mikrotiterplatte mit 100 μ l Assay Buffer A, absaugen und anschließend 50 μ l Beadlösung/well pipettieren.
- Absaugen der flüssigen Phase mit Hilfe der Vacuum Pumpe durch den permeablen Plattenboden (Beads bleiben in den wells).
- 2x Waschen mit je 100 μ l Wash Buffer A
- Anschließend 50 μ l Standardverdünnung und 50 μ l Proben auf die Platte auftragen.
- Inkubieren der Platte auf dem Schüttler für 30 sek. bei 1100 U/min und anschließend für 60 min. bei 300 U/min im Dunkeln und bei RT.
- Anschließend 3x Waschen (s.o.)
- Herstellen des „Multiplex Detection antibody Stock“ durch Verdünnen der Detektionsantikörper („Human Cytokine 8-Plex-Detection-Antibody“) mit Detection Ab Diluent A im Verhältnis 1:50.

- Pipettieren von 25 µl Multiplex Detection Antibody Stock/well, anschließend auf dem Schüttler bei für 30 sek. bei 1100 U/min. und danach für 30 min. bei 300 U/min im Dunkeln bei RT inkubieren.
- 3x Waschen (s.o.)
- Streptavidin–PE (100x)-Verdünnung herstellen, anschließend jeweils 50 µl Streptavidin-PE-Lösung/well pipettieren und Platte für 10 min. bei 300 U/min. auf dem Schüttler im Dunkeln bei RT inkubieren.
- 3 x Waschen (s.o.)
- 100 µl Assay Buffer A/well auftragen.
- Aufbewahrung der Platte bis zur Messung im Dunkeln. Unmittelbar vor dem Messen die Mikrotiterplatte für 30 sek. bei 1100 U/min. schütteln lassen.

4.7.5 TGF-beta1 Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung von TGF-β1 in den zellfreien Überständen der Keratinozytenkulturen wurden kommerziell erhältliche enzymvermittelte Immunassays der Fa. Biosource International, Camarillo, CA, USA verwendet. Die Nachweisgrenzen lagen für TGF-β1 bei 15,6 pg/ml.

5 Ergebnisse

5.1 Färbungen

5.1.1 Allgemeines

Um mögliche Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung zwischen allogenen Spalthauttransplantaten aus Mammareduktionsmaterial und dem untersuchten Patientenmaterial darzustellen, färbten wir diese nach Kultivierung mit den oben beschriebenen Färbemethoden (ABC- und HE-Färbung) an. Um eine repräsentative Aussage treffen zu können, wählten wir Tag 10 der Kultivierung, da zu diesem Zeitpunkt der Boden der Zellkulturflasche von einem geschlossenen Zellrasen bedeckt wurde. Zur Immuntypisierung wurden Antikörper gegen Zytokeratine, Vimentin, CD 45, CD 31 und CD 209 verwendet (siehe Tabelle 5).

Nach histologischer bzw. immunhistochemischer Anfärbung wurden die Präparate fotografisch dokumentiert.

5.1.2 Vergleichende Histologie der Keratinozytenkulturen mittels HE-Färbung

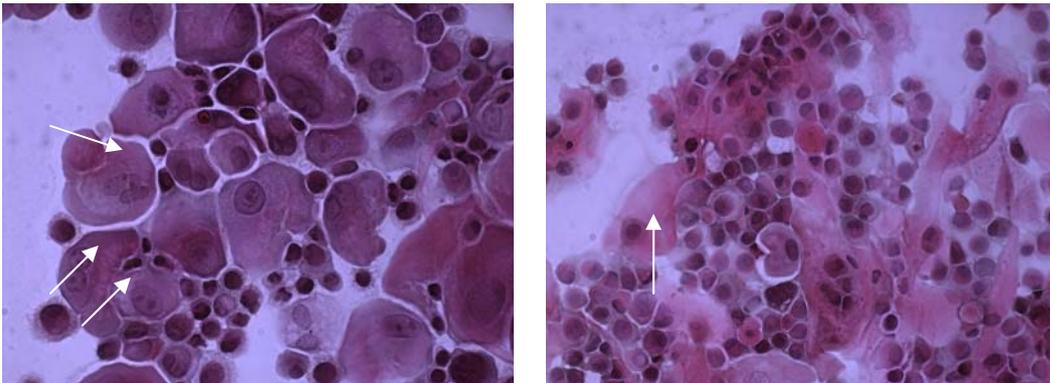


Abbildung 16: Mammareduktion vs. Verbrennungspatient (Originalvergrößerung x200)

Die HE-Färbung zeigt einen deutlich erhöhten Anteil terminal differenzierter suprabasaler Zellen (weiße Pfeile) in allogenen KETs (kultivierte epitheliale Transplantate) aus Mammareduktionsmaterial im Vergleich mit autologen KETs aus Patientenmaterial.

5.1.3 Immunhistochemische Färbung mit KL-1 nach der ABC-Methode

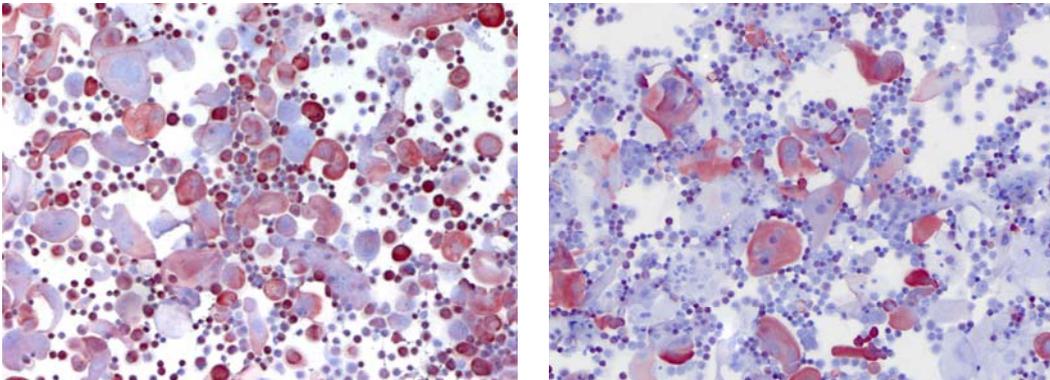


Abbildung 17: Mammareduktion vs. Verbrennungspatient (Originalvergrößerung x100)

Der monoklonale Antikörper KL-1 markiert die Zytokeratine 2, 6, 8, 10, 11, 18 und 19; insbesondere K 6, 10 und 11 werden von terminal differenzierten Keratinozyten exprimiert. Die immunhistochemische Färbung mit KL-1 bestätigt das Ergebnis der HE-Färbung und zeigt deutlich mehr terminal differenzierte Keratinozyten im allogenen Transplantat im Vergleich mit dem autologen KET.

5.1.4 Immunhistochemische Färbung mit MNF-116 nach der ABC-Methode

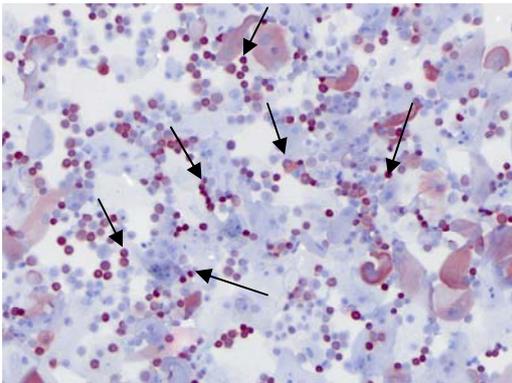


Abbildung 18: Verbrennungspatient (Originalvergrößerung x100)

Die immunhistochemische Anfärbung mit dem monoklonalen Antikörper MNF-116 markiert Zytochrom 5 positive teilungsaktive Basalzellen. Wie in Abbildung 18 ersichtlich sind diese Zellen in dem autologen Transplantat in einer erhöhten Dichte (schwarze Pfeile) nachweisbar.

5.1.5 Immunhistochemische Färbung mit Vim 3 B4 nach der ABC-Methode

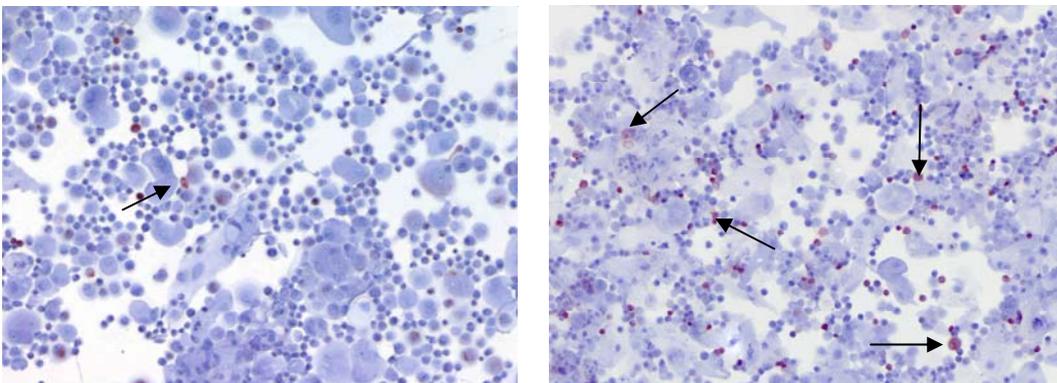


Abbildung 19: Mammareduktion vs. Verbrennungspatient (Originalvergrößerung x100)

In den autologen KETs sind im Vergleich zu den allogenen vermehrt Vimentin positive Zellen (schwarze Pfeile) nachzuweisen. Vimentin wird zum einen von mesenchymalen Zellen exprimiert (z.B. Fibroblasten), zum anderen können aber auch basaloide Keratinozyten Vimentin positiv sein.

5.1.6 Immunhistochemische Färbung mit DCN46 nach der ABC-Methode

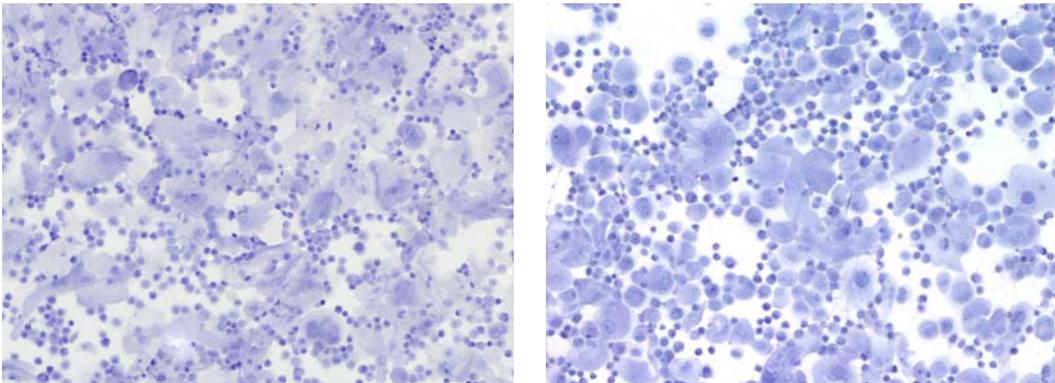


Abbildung 20: Mammareduktion vs. Verbrennungspatient (Originalvergrößerung x100)

Weder in dem Präparat der Mammareduktionsplastik noch des Verbrennungspatienten zeigen sich CD-209 positive Zellen, damit sind keine dermalen dendritischen Zellen in den Transplantaten nachweisbar.

5.1.7 Immunhistochemische Färbung mit 1F11 nach der ABC-Methode

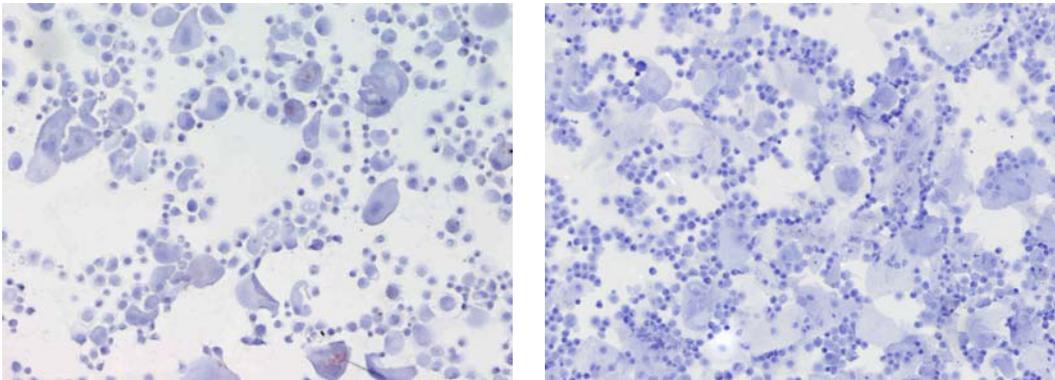


Abbildung 21: Mammareduktion vs. Verbrennungspatient(Originalvergrößerung x100)

Sowohl in dem allogenen als auch in dem autologen Transplantat sind keine 1F11- positiven Zellen (z.B. Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen) nachweisbar.

5.1.8 Immunhistochemische Färbung mit T-200 nach der ABC-Methode

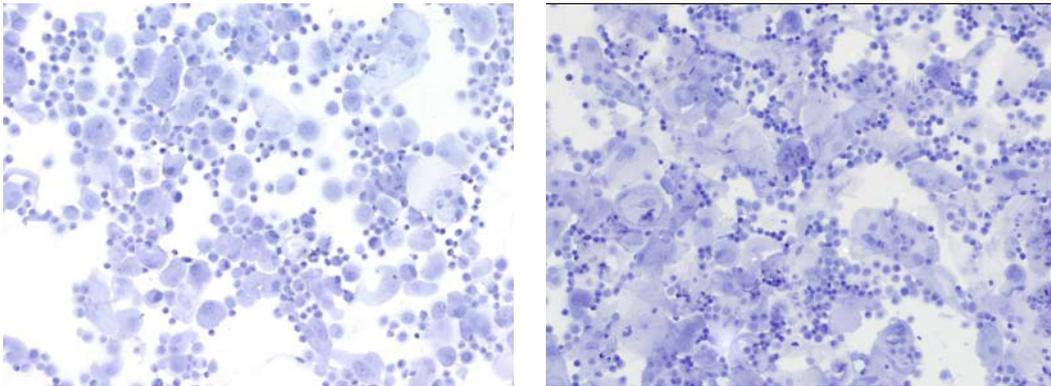


Abbildung 22: Mammareduktion vs. Verbrennungspatient (Originalvergrößerung x100)

Sowohl in dem allogenen als auch in dem autologen Spalthauttransplantat sind keine T-200 (CD45) positiven Zellen und somit keine Leukozyten (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten) nachweisbar.

5.1.9 Immunhistochemische Färbung mit MOPC-21 nach der ABC-Methode

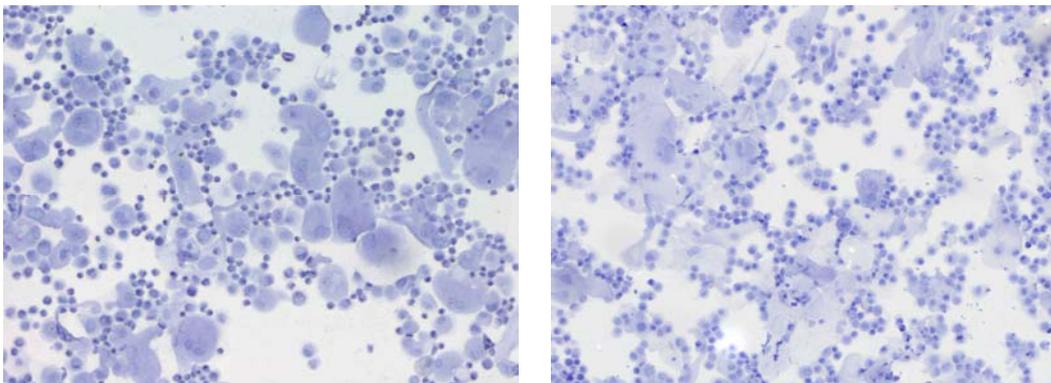


Abbildung 23: Mammareduktion vs. Verbrennungspatient (Originalvergrößerung x100)

Abbildung 23 zeigt die IgG1 Negativkontrolle mit MOPC-21

5.2 Messungen

5.2.1 Allgemeines

Um Aussagen über den Sekretionsverlauf ausgewählter Zytokine und Wachstumsfaktoren treffen zu können, entnahmen wir den Keratinozytenkulturen an den Tagen 3, 10 und 15, vor dem Einfrieren („prä kryo“) und nach dem Auftauen („post kryo“) Proben der Zellkulturüberstände zur Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des „Bio-Plex Immunoassay Systems“. Die Zeitpunkte der Probenent-

nahmen wurden aufgrund laborexperimenteller Erfahrung gewählt: Schon nach wenigen Tagen konnten wir kleine Zellklone im Mikroskop beobachten, die sich aus adhärenen Zellen gebildet hatten. Um den Tag zehn war der Boden der Zellkulturflasche erstmals von einem konfluierenden Zellrasen bedeckt, zu diesem Zeitpunkt allerdings noch streng einschichtig, an Tag 15 zeigte sich dann ein vollständig konfluenter zum Teil mehrschichtiger Zellrasen. Um optimale Wachstumsbedingungen für die Keratinozytenkultur zu schaffen, wurde das Medium regelmäßig ausgetauscht, wobei der letzte Mediumwechsel stets drei Tage vor jeweiliger Probenentnahme erfolgte.

5.2.2 Interleukin-1-alpha

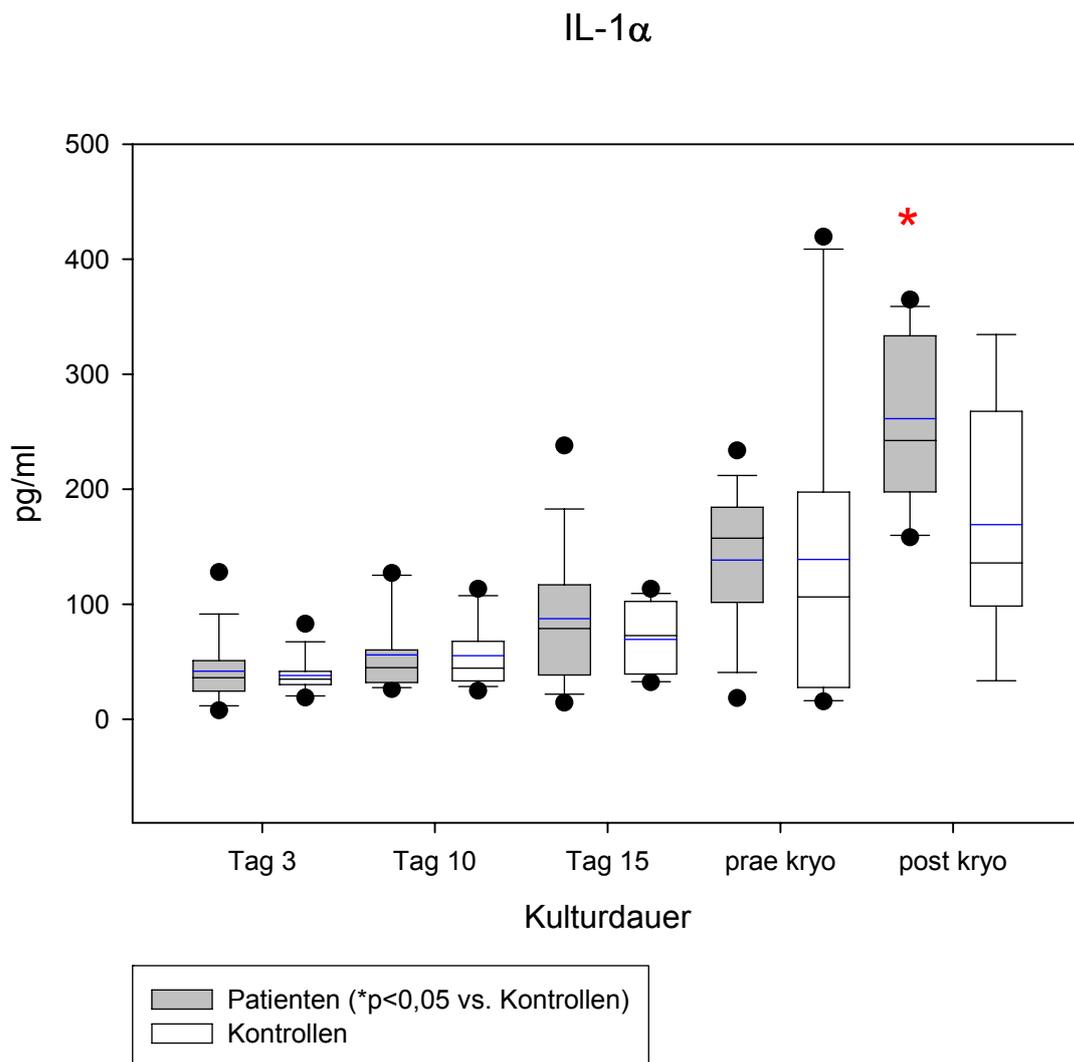


Abbildung 24: IL-1 α Freisetzung aus Keratinozyten im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Interleukin 1 α war an den Tagen 3 und 10 mit $41,84 \pm 7,14$ pg/ml (Tag 3) und $56,00 \pm 8,90$ pg/ml (Tag 10) nur geringfügig im Nährmedium der Patientengruppe nachweisbar und zeigte nur minimale Unterschiede zur Kontrollgruppe ($37,90 \pm 3,98$ pg/ml (Tag 3) und $55,27 \pm 7,09$ pg/ml (Tag 10),

allerdings nahm die IL-1 α Sekretion mit weiterer Kultivierungsdauer zu. Wie sich in Abbildung 25 zeigt, scheinen dafür vor allem die Keratinozyten der überlebenden Patienten verantwortlich zu sein. Die Werte des Kontrollkollektivs zeigten einen, dem überlebenden Patientengut sehr ähnlichen Verlauf. Die Werte der überlebenden Patienten lagen zwar durchweg höher als die der Kontrollgruppe. Dennoch ergab sich nur nach dem Auftauen ein signifikanter Unterschied zum Kontrollkollektiv ($261,22 \pm 20,17$ pg/ml vs. $169,27 \pm 34,29$ pg/ml). In der 24-stündigen Kultur nach dem Einfrieren zeigten sich deutlich höhere Konzentrationen an IL-1 α im Vergleich mit der entsprechenden Kultur vor Kryokonservierung ($261,21 \pm 20,17$ pg/ml vs. $138,34 \pm 15,52$ pg/ml, Abbildung 24).

IL-1 α (differenziert)

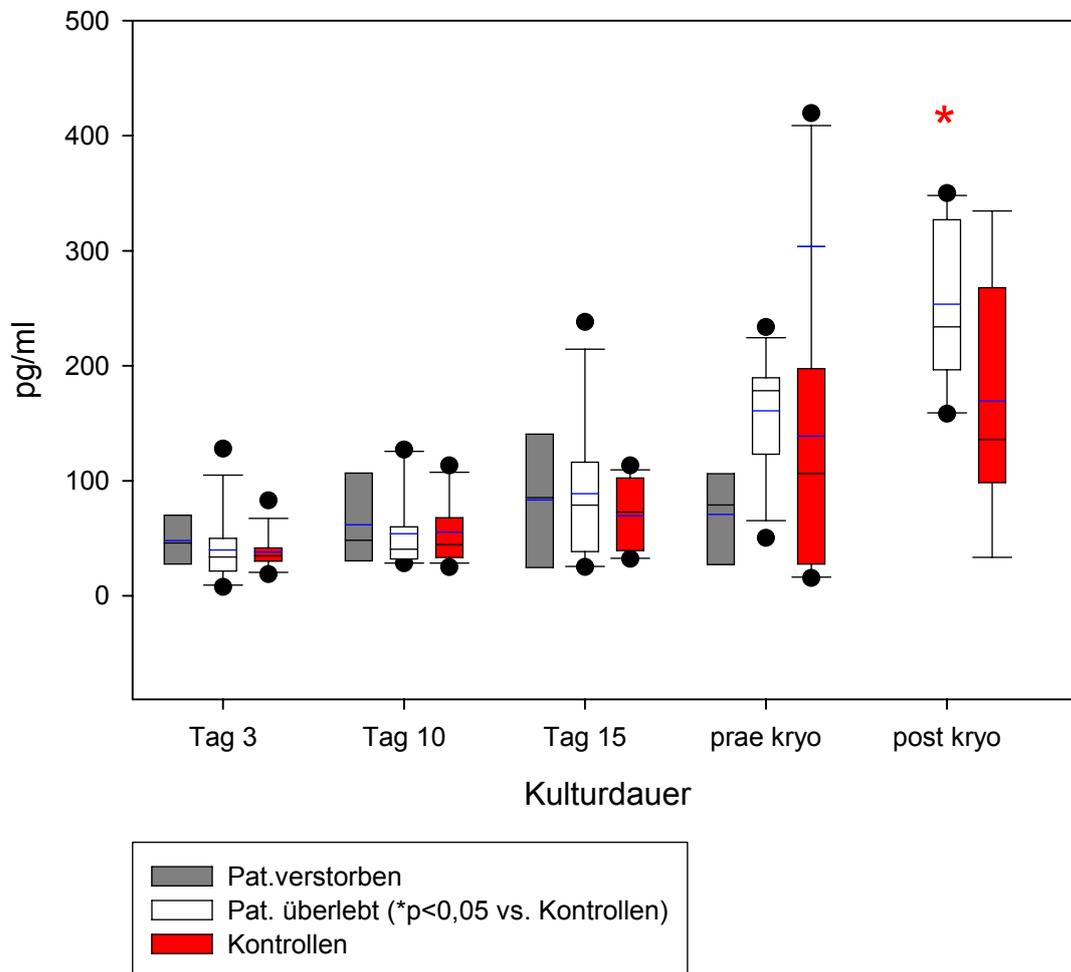


Abbildung 25: Differenzierte Darstellung der IL-1 α Freisetzung aus Keratinozytenkulturen im zeitlichen Verlauf

In Abbildung 25 wird der unterschiedliche Verlauf der IL-1 α -Sekretion zwischen dem verstorbenen Patientengut und den überlebenden Patienten deutlich. Während die Werte der überlebenden Pa-

tienten mit zunehmender Kulturdauer anstiegen, erreichten die Werte der verstorbenen Patienten an Tag 15 ihr Maximum und sanken nach weiterer Kultivierung wieder leicht ab (Tag 10: $61,792 \pm 21,63$ pg/ml, Tag 15: $83,44 \pm 30,11$ pg/ml und prä kryo: $70,72 \pm 21,35$ pg/ml). Nur die überlebenden Patienten zeigen vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen einen deutlichen Anstieg der IL-1 α -Synthese.

5.2.3 Interleukin-1-Rezeptorantagonist

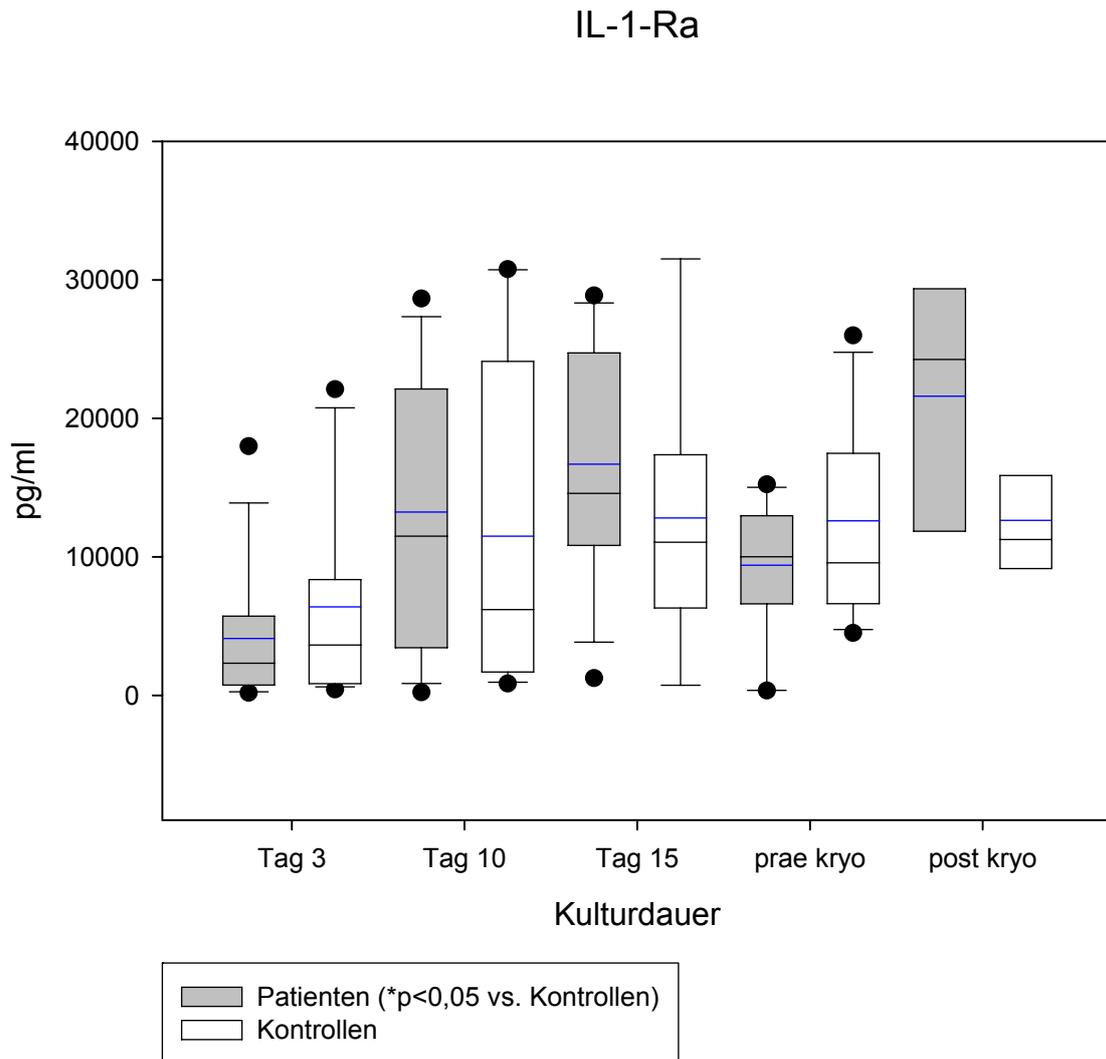


Abbildung 26: Produktion des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten von Keratinozyten im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

IL-1-Ra war in den Überständen der Keratinozytenkulturen in vergleichsweise hoher Konzentration nachweisbar. Dabei zeigten beide Gruppen im Laufe der Kultivierung einen Anstieg der IL-1-Ra Sekretion mit Maximum an Tag 15 (Patienten: $16690,69 \pm 2258,85$ pg/ml vs. Kontrolle: $12807,68 \pm 3016,70$). In der 24-stündigen Kultur vor Kryokonservierung nahm die Produktion von IL-1-Ra sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen wieder deutlich ab (Abbildung 26). Doch auch

hier zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Nach dem Auftauen ließ sich vor allem in den Überständen der Patientengruppe eine deutlich höhere Konzentration an IL-1-Ra im Vergleich mit den prä kryo-Werten nachweisen ($21598,35 \pm 3380,05$ pg/ml vs. $9396,69 \pm 1083,58$), die Sekretionsleistung des Kontrollkollektives erhöhte sich dagegen kaum (prä kryo: $12602,14 \pm 1813,55$ pg/ml vs. post kryo: $12634,48 \pm 2096,83$ pg/ml).

Wie in Abbildung 27 ersichtlich, unterschieden sich die Gruppe der überlebenden Patienten und das Kollektiv der Verstorbenen nur sehr geringfügig, signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen ergaben sich auch hier nicht.

IL-1-Ra (differenziert)

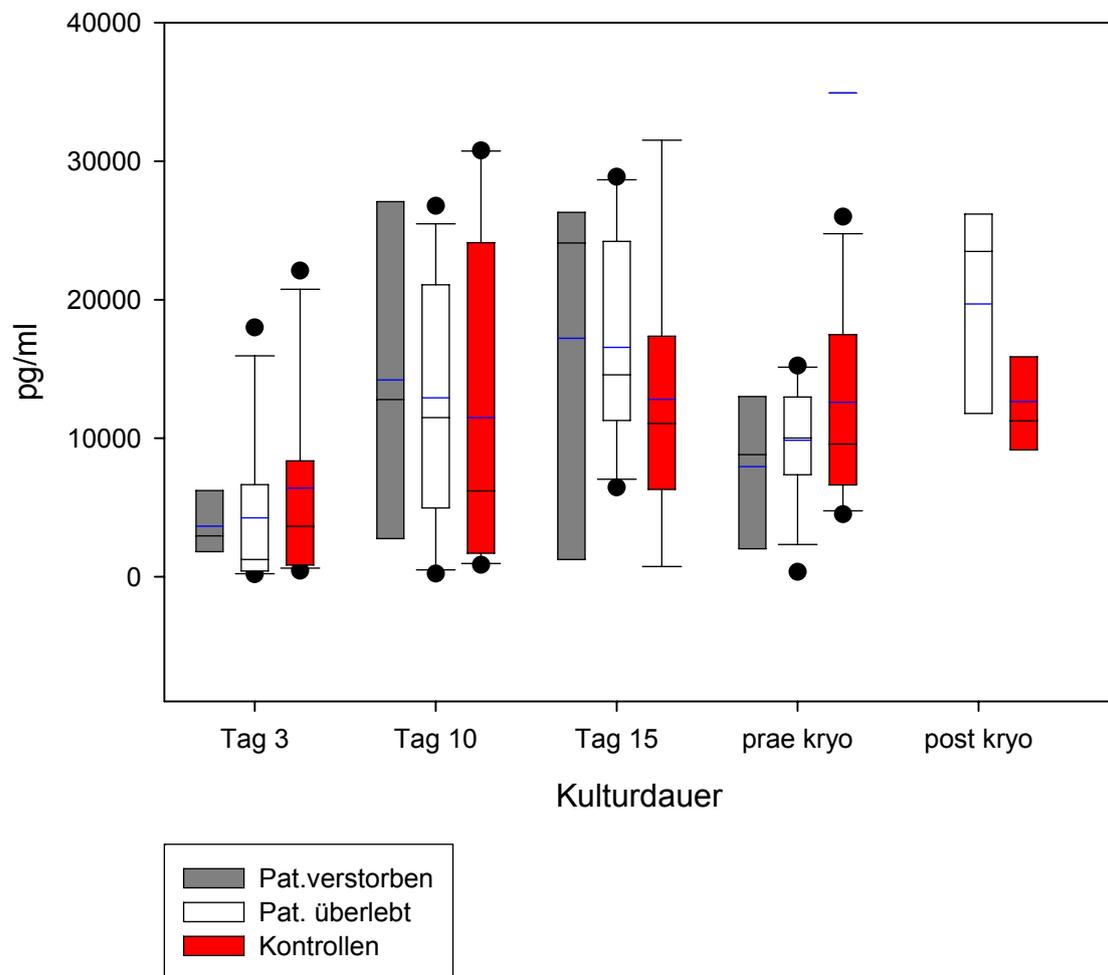


Abbildung 27: Differenzierte Darstellung der IL-1-Ra Synthese von Epithelzellen im zeitlichen Kulturverlauf und vor bzw. nach dem Einfrieren/Auftauen

5.2.4 Interleukin-1-beta

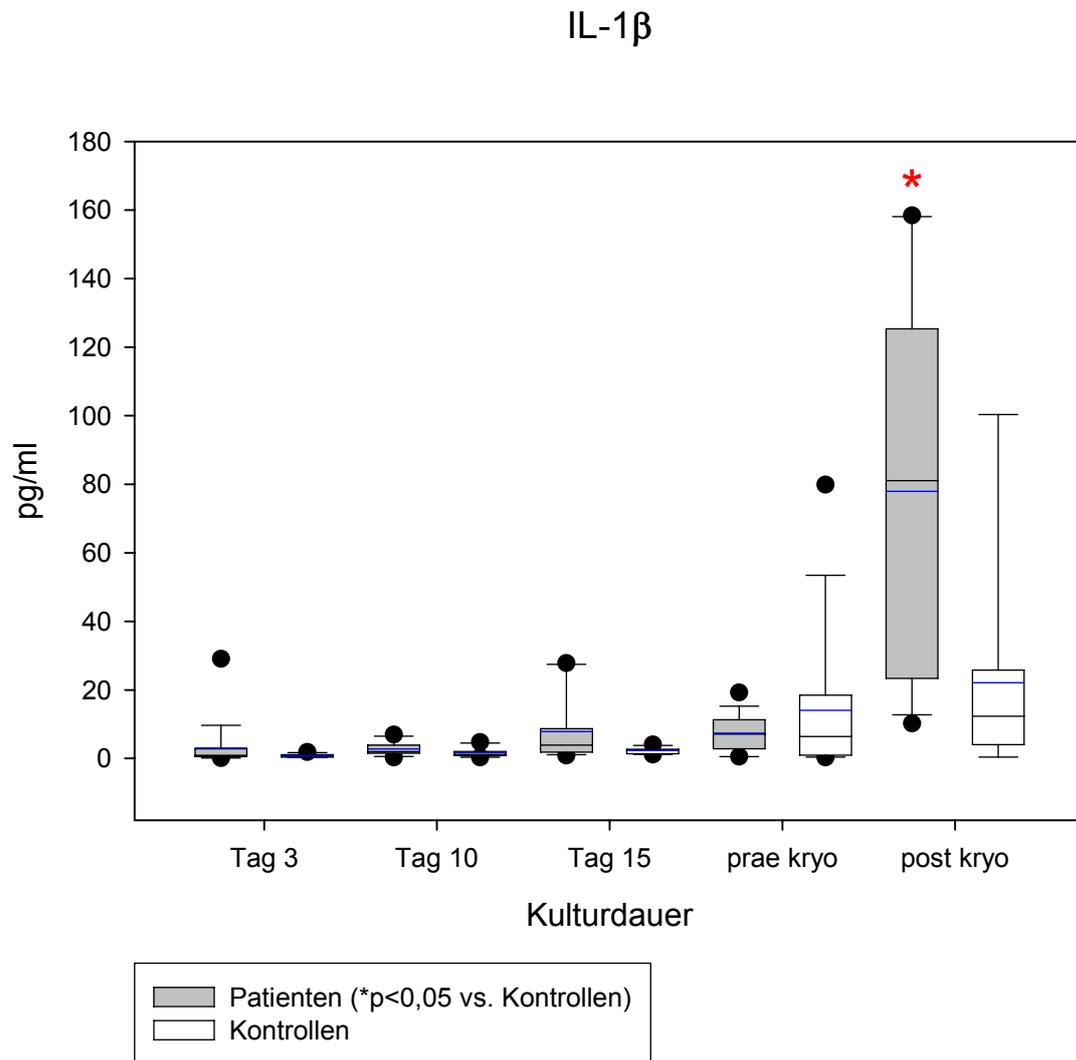


Abbildung 28: Interleukin-1 β Produktion von Keratinozyten in Kultur im zeitlichen Verlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Abbildung 28 zeigt die Konzentrationen von Interleukin-1 β in ihrem zeitlichen Verlauf. Das Zytokin war in den Keratinozytenüberständen nur in minimaler Konzentration nachweisbar (z.B. Tag 10: $2,78 \pm 0,47$ pg/ml (Pat.) und $1,69 \pm 0,33$ pg/ml (Kontrolle)). Analog zur IL-1 α Produktion ähneln sich die Werte der Patienten und des Kontrollkollektivs in ihrem Verlauf (Abbildung 24). Beide Gruppen zeigten einen leichten Anstieg der IL-1 β Sekretion mit zunehmender Kulturdauer (Patienten: $2,78 \pm 0,47$ pg/ml an Tag 10 und $7,82 \pm 2,21$ pg/ml an Tag 15, verglichen mit der Kontrollgruppe: $1,69 \pm 0,33$ pg/ml und $2,31 \pm 0,23$ pg/ml). Während die Kontrollgruppe schon vor dem Einfrieren einen deutlichen Anstieg der IL-1 β Sekretion (Tag 15: $2,31 \pm 0,2290$ pg/ml und prä kryo $14,03 \pm 5,34$ pg/ml) zeigte, steigerte sich die IL-1 β -Produktion der Patientengruppe erst nach dem Auftauen um ein Vielfaches (prä kryo: $7,37 \pm 1,32$ und post kryo: $77,91 \pm 13,96$ pg/ml) und zeigte damit einen

signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Beide Gruppen sezernierten in der 24-stündigen Kultur nach Kryokonservierung deutlich mehr IL-1 β als in der entsprechenden Kultur vor dem Einfrieren.

IL-1 β (differenziert)

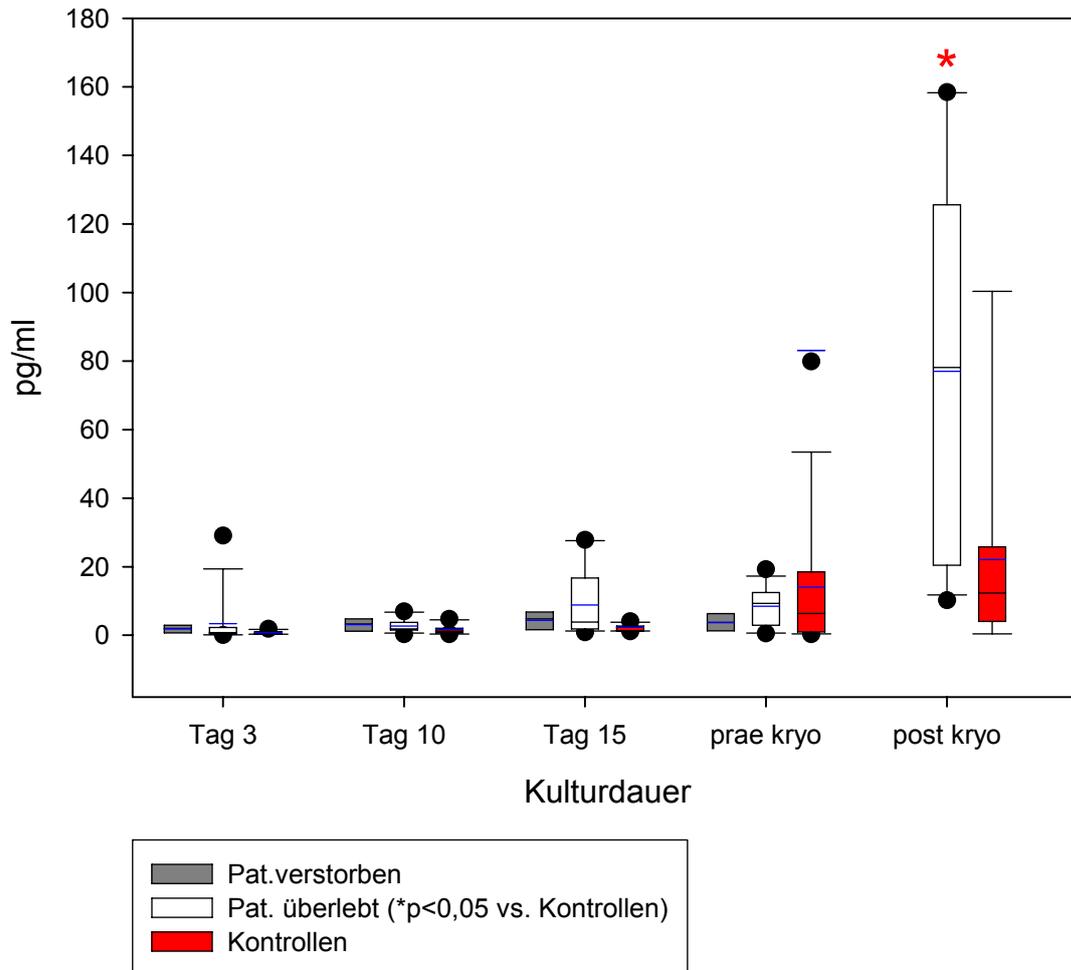


Abbildung 29: Differenzierte Darstellung der IL-1 β Synthese von Epithelzellen im zeitlichen Kulturverlauf

Bei differenzierter Betrachtung (Abbildung 29) wurde deutlich, dass vor allem die Gruppe der überlebenden Patienten für den oben beschriebenen Anstieg der IL-1 β -Werte verantwortlich waren. Die in den Überständen gemessenen IL-1 β Werte waren alle nur in sehr niedrigen Konzentrationen nachweisbar, obwohl auch diese einen leichten Anstieg zeigten (Tag 3: $1,87 \pm 0,62$ pg/ml, Tag 10: $3,11 \pm 0,94$ pg/ml, Tag 15: $4,41 \pm 1,36$ pg/ml).

5.2.5 Interleukin-2

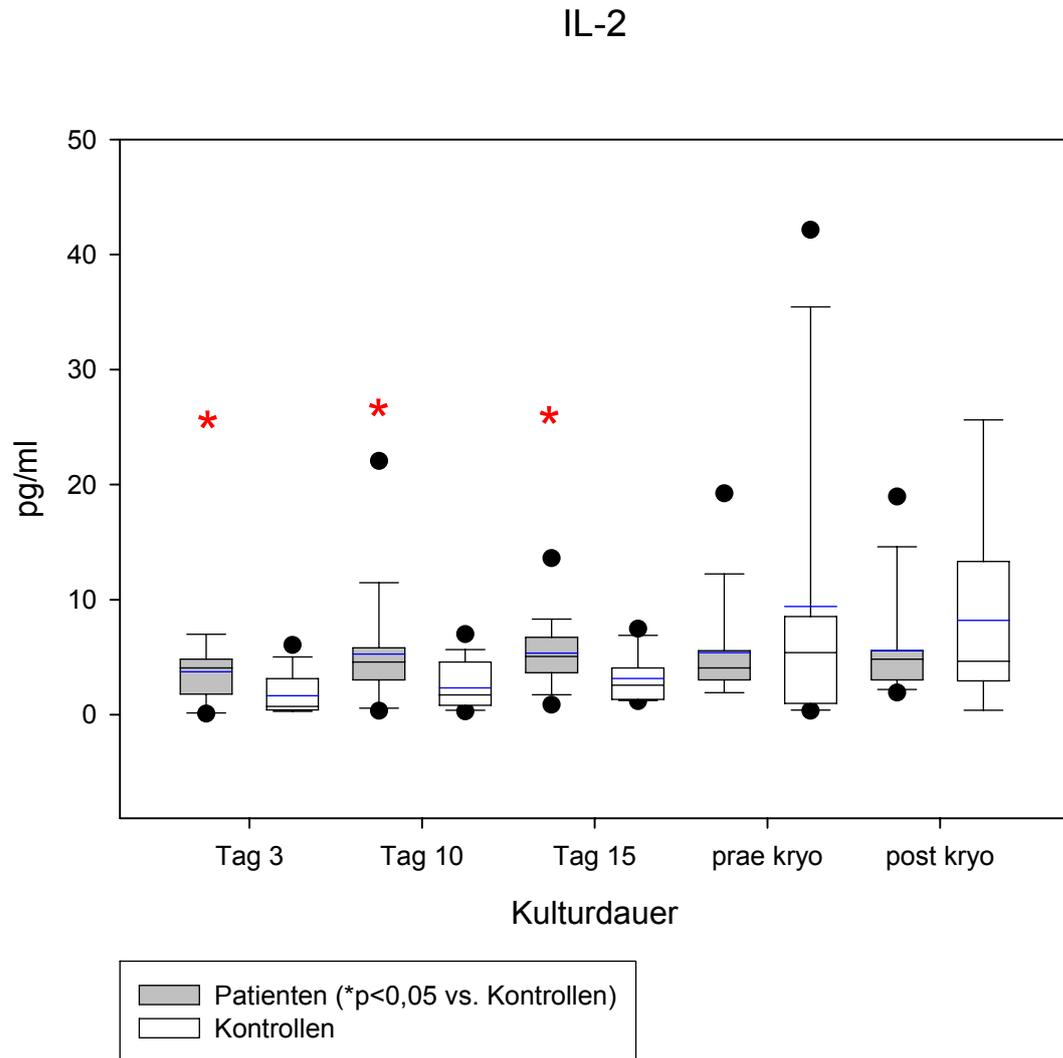


Abbildung 30: IL-2 Sekretion von Keratinozyten im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Der T-Zellwachstumsfaktor IL-2 war in den Überständen von Keratinozytenkulturen nur geringfügig nachweisbar (Abbildung 30). Die Patientengruppe zeigte an den Kulturtagen 3, 10 und 15 eine signifikant höhere Sekretion von IL-2 mit einem Maximum an Tag 15 mit $5,34 \pm 0,67$ pg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $3,15 \pm 0,49$ pg/ml. Die 24-stündige Kultur vor und nach der Kryokonservierung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, obwohl die Werte der Kontrollen mit $9,41 \pm 3,05$ pg/ml (prä) und $8,19 \pm 2,83$ pg/ml (post) deutlich höher lagen als die der Patienten ($5,40 \pm 1,03$ und $5,58 \pm 1,16$ pg/ml).

IL-2 (differenziert)

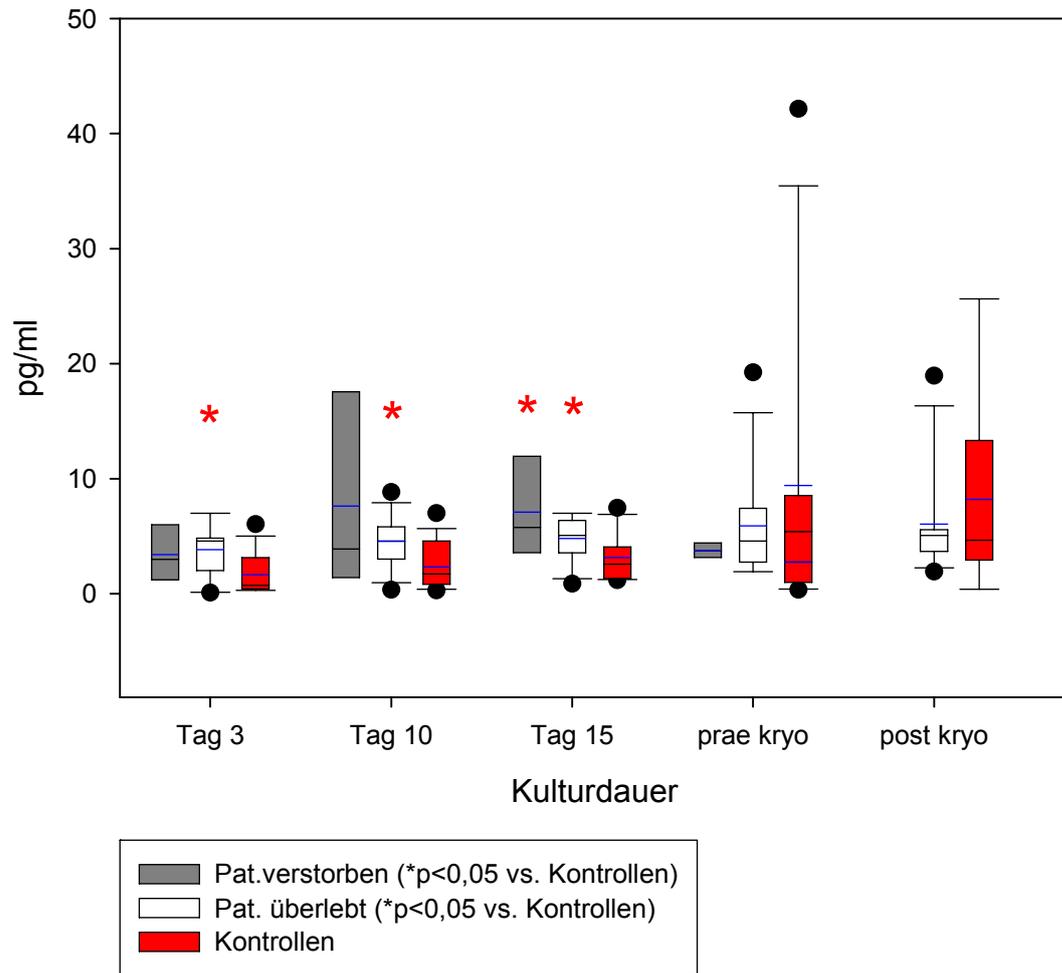


Abbildung 31: Differenzierte Darstellung der IL-2 Produktion von Keratinozyten nach unterschiedlicher Kulturdauer

Die differenzierte Darstellung ergab an den Tagen 3, 10 und 15 eine signifikant höhere Konzentration von IL-2 in den Überständen der überlebenden Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe, allerdings zeigte auch das Kollektiv der verstorbenen Patienten an Tag 10 eine deutlich höhere und an Tag 15 eine signifikant höhere Sekretion von IL-2 als die Kontrollen ($7,09 \pm 2,30$ pg/ml) vs. $3,15 \pm 0,49$ pg/ml). Vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen lagen die Werte der verstorbenen und überlebenden Patienten zwar deutlich unter denen der Kontrollgruppe, zeigten aber keine signifikanten Unterschiede (z.B.: prä kryo (verstorbene Patienten): $3,77 \pm 0,33$ pg/ml vs. (Kontrollgruppe) $9,41 \pm 3,05$ pg/ml).

5.2.6 Interleukin-4

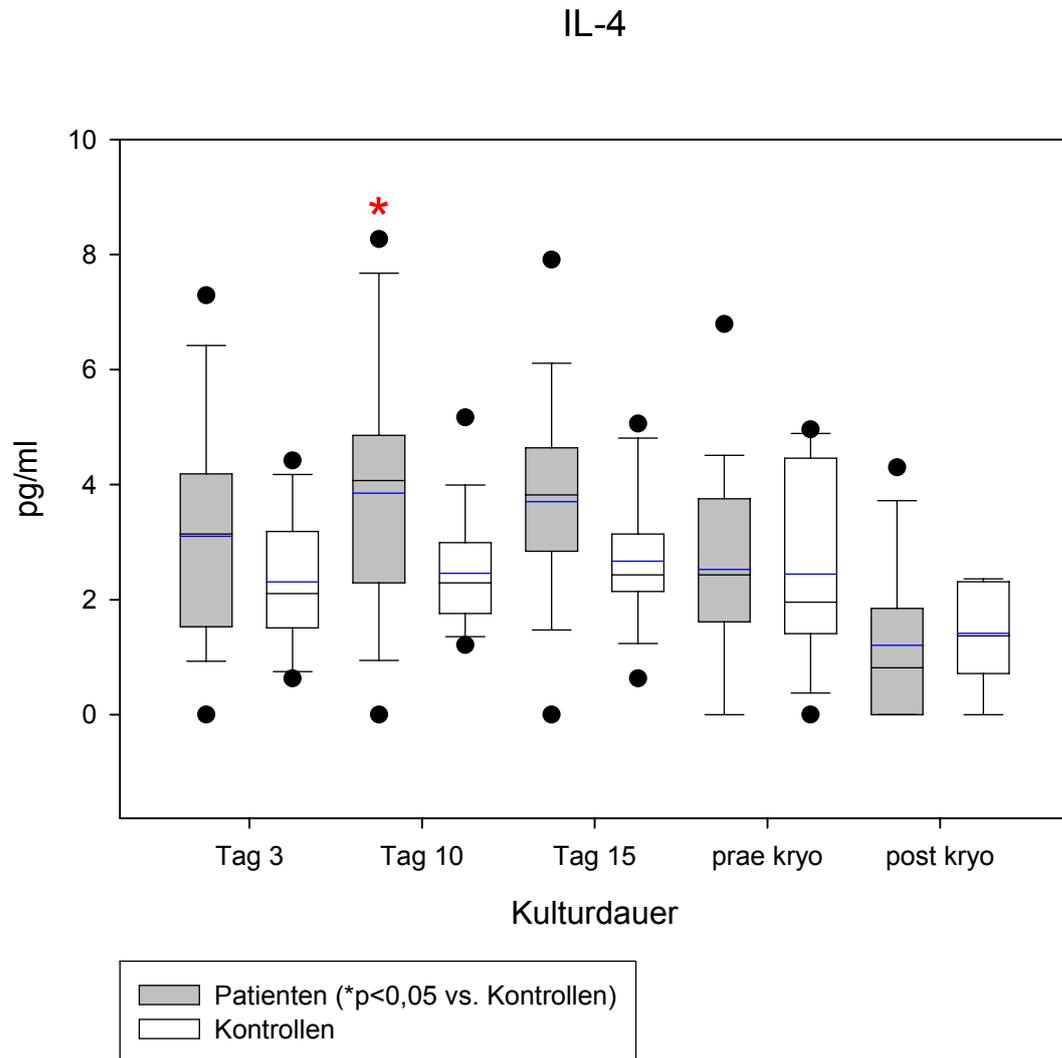


Abbildung 32: IL-4 Produktion von Keratinozyten im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Interleukin-4 wurde sowohl von der Patientengruppe als auch von dem Kontrollkollektiv nur in relativ geringer Konzentration produziert (Abbildung 32). Beide Gruppen zeigten einen Anstieg IL-4 Sekretion bis zum Tag 10 mit einem Plateau an den Tagen 10 und 15 und einem Abfall der Werte vor Einfrieren und nach Auftauen der Zellkultur (Abb.28) unter das Niveau der Ausgangswerte. Obwohl in den ersten 15 Tagen die Werte für den T-Zellwachstumsfaktor bei der Patientengruppe deutlich höher lagen (Tag 3: $3,10 \pm 0,46$ pg/ml vs. $2,31 \pm 0,27$ pg/ml, Tag 15: $3,70 \pm 0,42$ pg/ml vs. $2,67 \pm 0,28$ pg/ml), zeigte sich nur am Tag 10 eine signifikant erhöhte IL-4 Sekretion der Patienten gegenüber den Kontrollen ($3,85 \pm 0,53$ pg/ml vs. $2,46 \pm 0,26$ pg/ml). Beide Gruppen produzierten in der 24stündigen Kultur post kryo weniger IL-4 im Vergleich mit der entsprechenden Kultur vor dem Einfrieren (prae kryo: $2,53 \pm 0,41$ und $2,44 \pm 0,41$ pg/ml vs. post kryo: $1,21 \pm 0,37$ und $1,42 \pm 0,29$ pg/ml).

IL-4 (differenziert)

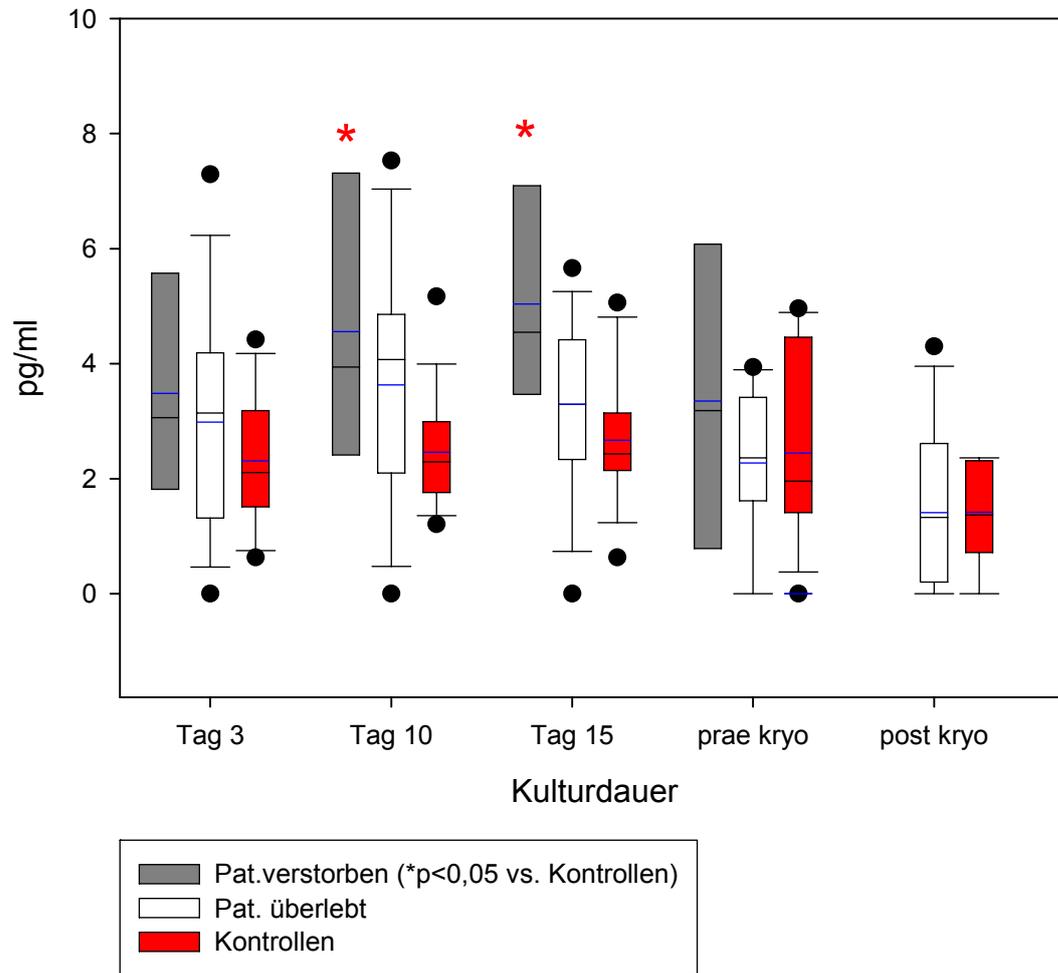


Abbildung 33: Differenzierte Darstellung der IL-4 Synthese von Hautzellen im zeitlichen Kulturverlauf und vor bzw. nach dem Einfrieren/Auftauen

Abbildung 33 Bei differenzierter Darstellung (Abbildung 33) zeigt die Gruppe der verstorbenen Patienten an Tag 10 und 15 eine signifikant höhere Sekretion von Interleukin-4 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 10: $4,56 \pm 1,33$ pg/ml vs. $2,46 \pm 0,26$ pg/ml und Tag 15: $5,04 \pm 1,01$ pg/ml vs. $2,67 \pm 0,28$ pg/ml). Der T-Zelldifferenzierungsfaktor war auch zu den anderen gemessenen Zeitpunkten in deutlich höherer Konzentration als bei den überlebenden Patienten und der Kontrollgruppe in den Überständen nachweisbar. Wie schon oben beschrieben ähnelte sich die IL-4 Sekretion der drei untersuchten Gruppen in ihrem Verlauf mit einem Anstieg der Werte bis Tag 10 bzw. Tag 15 (bei den verstorbenen Patienten) und einem anschließenden Abfall der IL-4 Produktion während der 24-stündigen Kultur vor und nach der Kryokonservierung unter das Ausgangsniveau.

5.2.7 Interleukin-6

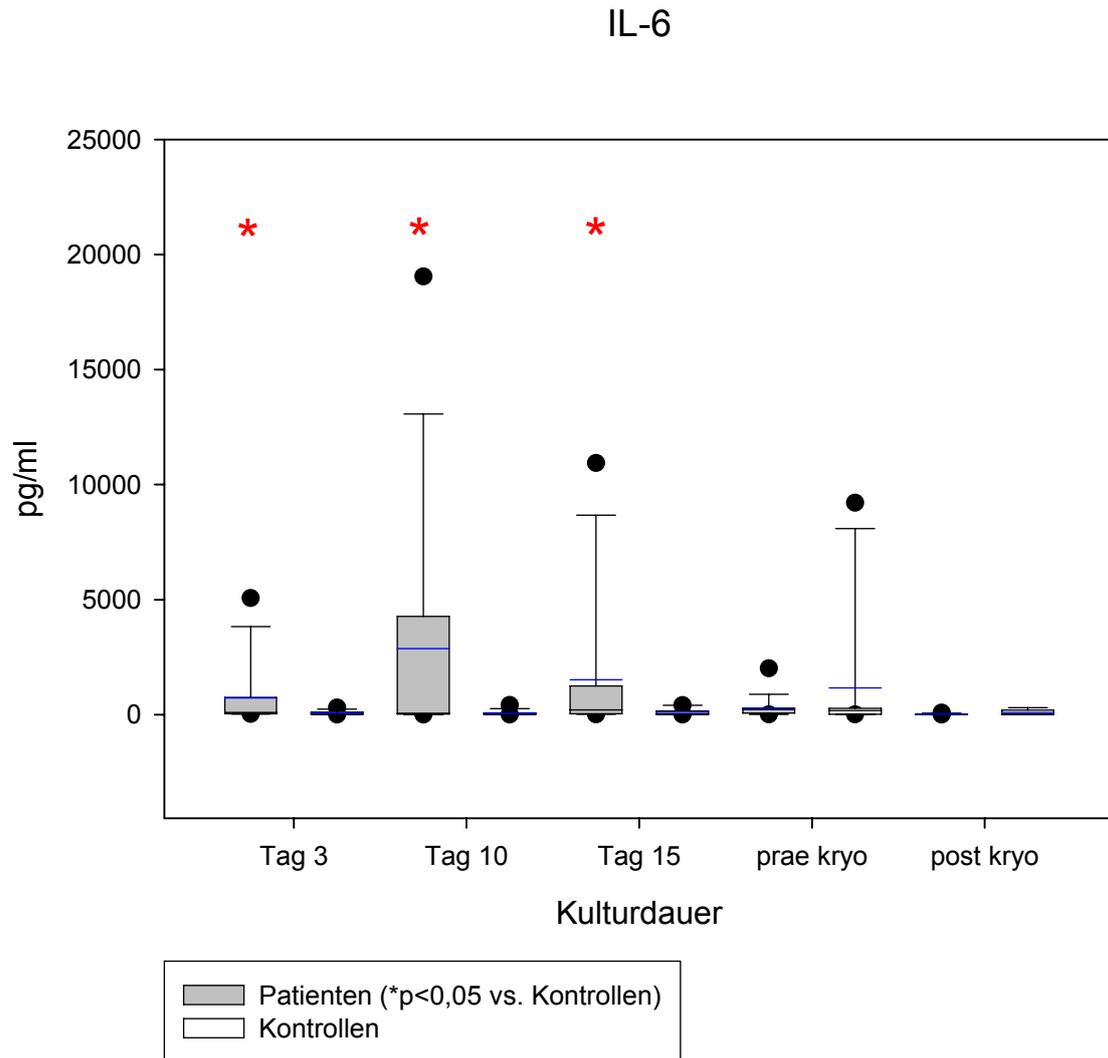


Abbildung 34: IL-6 Freisetzung aus Keratinozyten im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Das inflammatorische Protein IL-6 konnte zum Teil in vergleichsweise hoher Konzentration in den Überständen der Keratinozytenkulturen nachgewiesen werden (Abbildung 34). So zeigte die Patientengruppe an den Kulturtagen 3, 10 und 15 eine signifikant höhere Sekretion von IL-6 mit einem absoluten Maximum an Tag 10 mit $2874,04 \pm 1352,89$ pg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $60,37 \pm 28,19$ pg/ml. Im Unterschied dazu wurde Interleukin 6 von der Kontrollgruppe während des gesamten Kultivierungszeitraumes in nur sehr geringen Mengen produziert (Tag 3: $69,35 \pm 21,82$ pg/ml, Tag 15: $98,28 \pm 35,38$ und post kryo: $89,41 \pm 38,85$ pg/ml). In der 24-stündigen Kultur vor und nach der Kryokonservierung war IL-6 dann auch in den Überständen der Patienten in nur noch verhältnismäßig minimaler Konzentration vorhanden, dabei zeigten sich in der 24-stündigen Kultur vor dem Einfrieren deutlich höhere Konzentrationen an IL-6 als in der entsprechenden Kultur nach Kryokonservierung (prä kryo: $294,41 \pm 113,36$ pg/ml und post kryo: $19,52 \pm 5,79$ pg/ml).

IL-6 (differenziert)

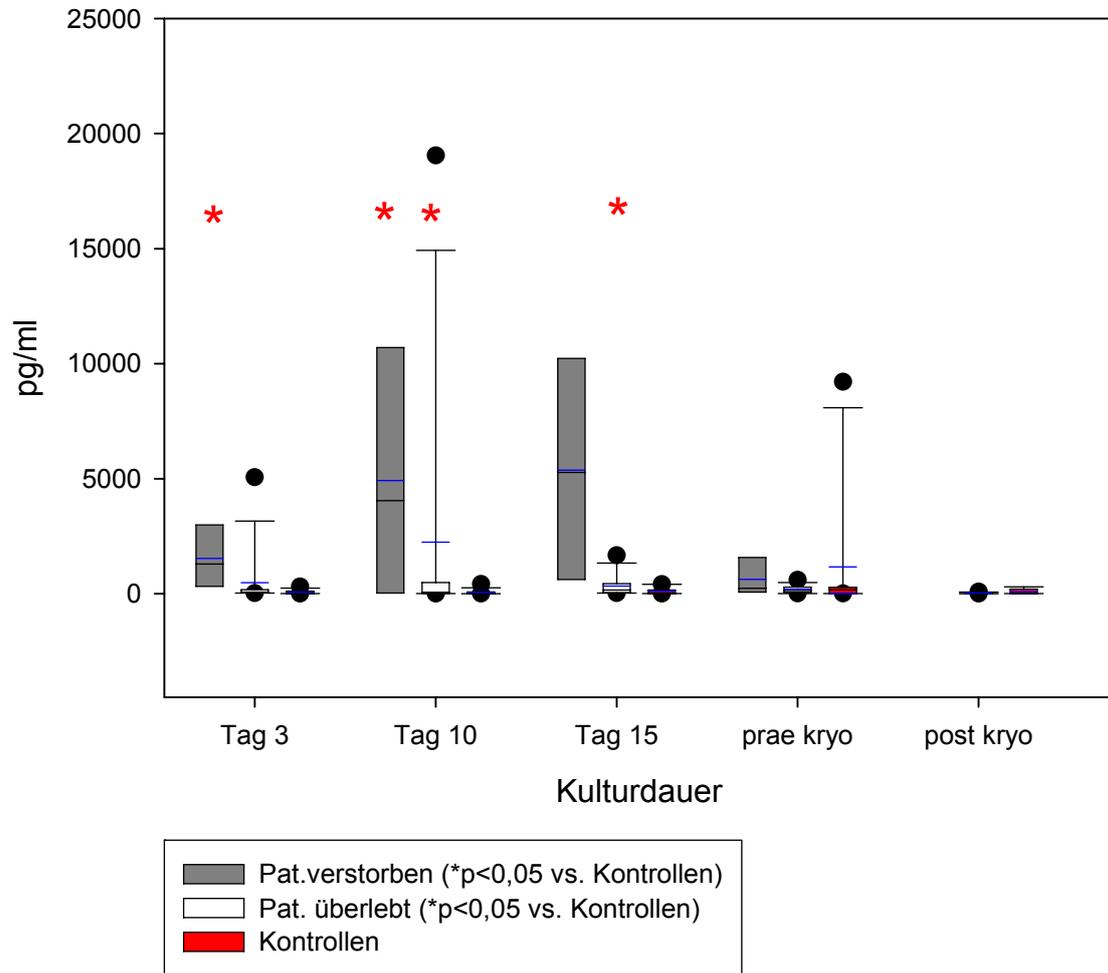


Abbildung 35: Differenzierte Darstellung der IL-6 Produktion von Keratinozyten nach unterschiedlicher Kulturdauer und unter dem Einfluss der Kryokonservierung

Wie in Abbildung 35 ersichtlich, zeigte die Gruppe der verstorbenen Patienten an den Kulturtagen 3, 10 und 15 eine vielfach höhere Sekretion des inflammatorischen Proteins im Vergleich zu den überlebenden Patienten und an den Tagen 3 und 10 signifikant höhere Werte als die Kontrollgruppe. In den Überständen der überlebenden Patienten wurden an Tag 10 und 15 gleichfalls signifikant höhere Konzentrationen an IL-6 im Vergleich zum Kontrollkollektiv gemessen, vor dem Einfrieren bzw. nach dem Auftauen war IL-6 in den Überständen aller drei Gruppen nur noch in geringer Menge nachweisbar.

5.2.8 Interleukin-8

Die gemessenen Interleukin 8-Werte lagen weit überhalb der Nachweisgrenze und waren daher nicht quantifizierbar, sodass auf eine graphische Darstellung verzichtet wurde.

5.2.9 Interleukin-10

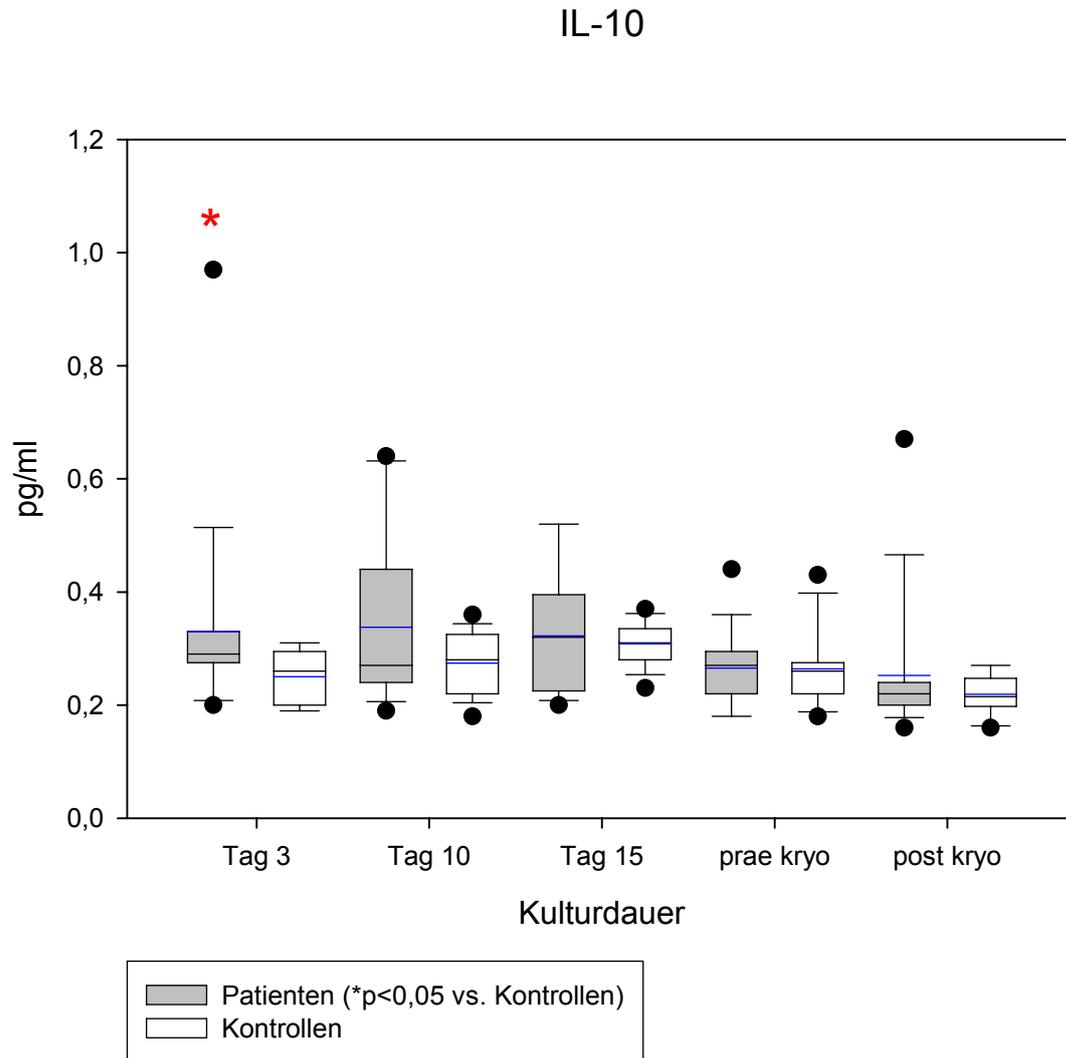


Abbildung 36: IL-10 Sekretion von Hautzellen im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

IL-10 war in den Überständen von Keratinozytenkulturen in nur minimaler Konzentration nachweisbar (Abbildung 36). Das Sekretionsverhalten beider Kollektive, Patienten und Kontrollen, wies keine bedeutsamen Unterschiede auf, nur an Tag 3 zeigten die überlebenden Patienten eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant höhere Produktion von Interleukin 10 ($0,33 \pm 0,04$ pg/ml vs. $0,25 \pm 0,01$ pg/ml), (Abbildung 37).

Wie in Abbildung 37 ersichtlich, konnte in den Überständen der verstorbenen Patienten deutlich höhere Konzentrationen als in denen der überlebenden Patienten oder Kontrollen (z.B. Tag 3: $0,48 \pm 0,17$ pg/ml vs. $0,28 \pm 0,01$ pg/ml und $0,25 \pm 0,01$ pg/ml) gemessen werden, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

IL-10 (differenziert)

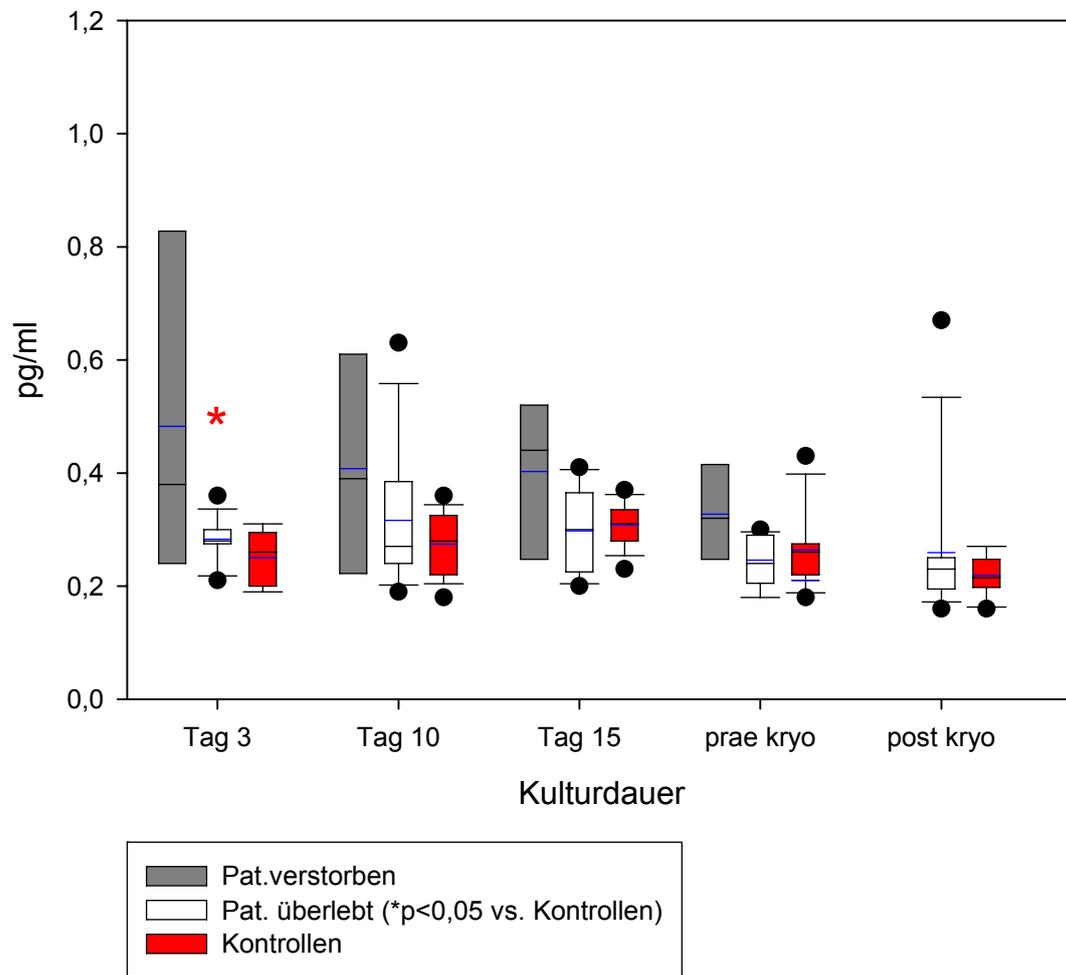


Abbildung 37: Differenzierte Darstellung der Interleukin-10 Synthese von Kerationozyten nach unterschiedlicher Kulturdauer und vor bzw. nach Kryokonservierung

5.2.10 Interferon gamma

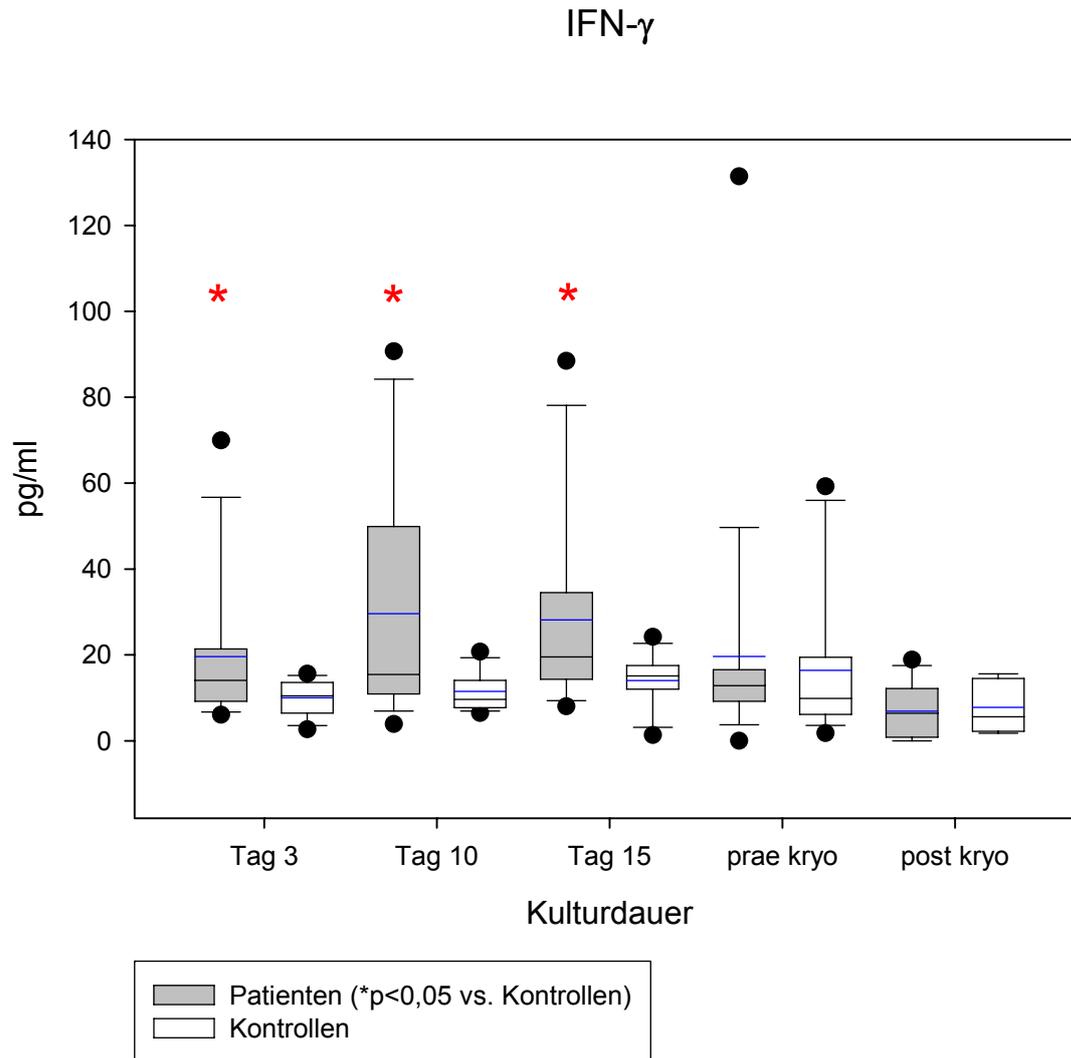


Abbildung 38: INF- γ Sekretion von Keratinozyten im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Interferon gamma konnte während der Kultivierung in den Überständen in nur mäßiger Konzentration nachgewiesen werden. In Abbildung 38 zeigt die Patientengruppe an den Kulturtagen 3, 10 und 15 eine signifikant höhere Sekretion von INF- γ mit einem Maximum an Tag 10 mit $29,58 \pm 7,15$ pg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $11,49 \pm 1,16$ pg/ml. Im Vergleich mit der 24-stündigen Kultur vor dem Einfrieren nahm die INF- γ Produktion beider Gruppen in der entsprechenden Kultur nach Auftauen deutlich ab ($19,65 \pm 7,16$ pg/ml vs. $6,92 \pm 1,66$ pg/ml) ab, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven ergaben.

IFN- γ (differenziert)

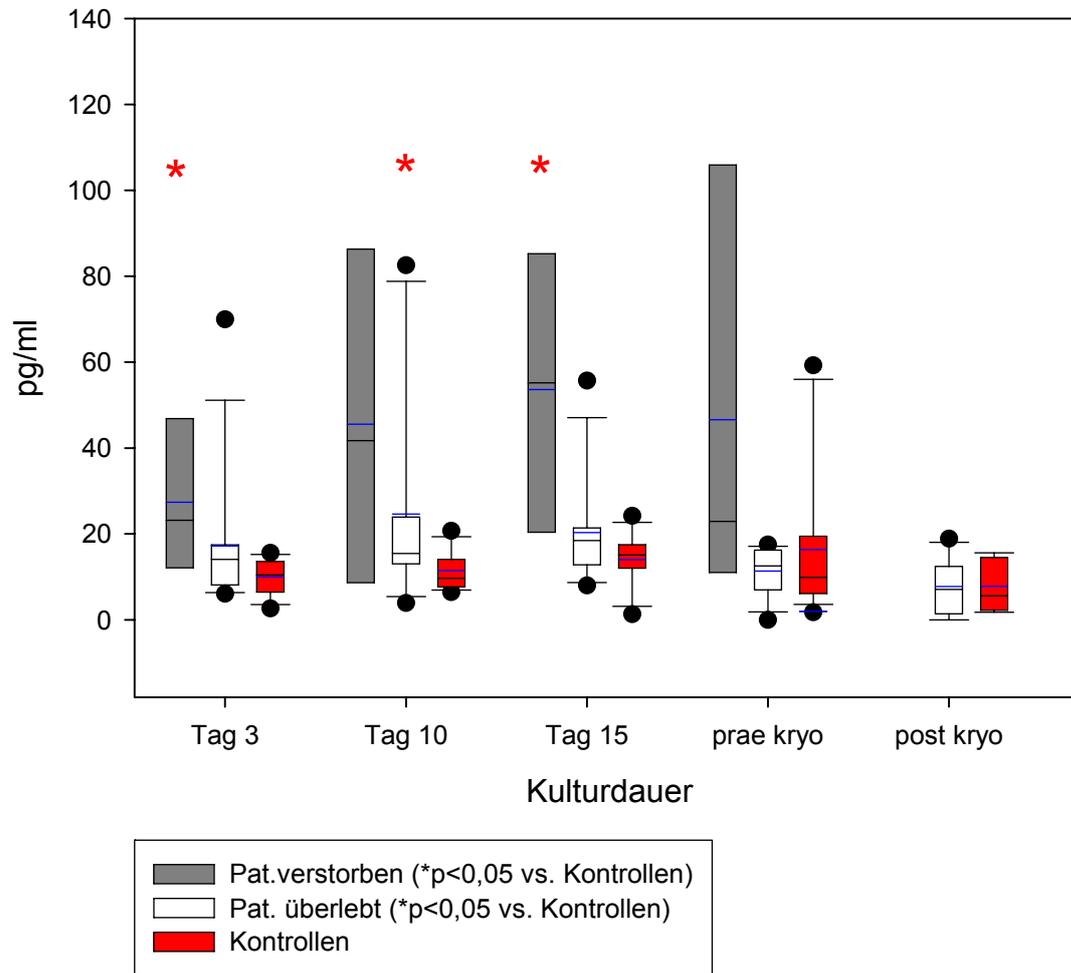


Abbildung 39: Differenzierte Darstellung der INF-y Produktion von Keratinozyten nach unterschiedlicher Kulturdauer

Bei differenzierter Darstellung zeigten die verstorbenen Patienten eine vielfach höhere Produktion von INF-y als die überlebenden Patienten und die Kontrollgruppe. Allerdings ergab nur die Konzentration an Tag 3 einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($27,39 \pm 9,37$ pg/ml vs. $10,03 \pm 1,04$ pg/ml). Die Gruppe der überlebenden Patienten sezernierte gleichfalls mehr Interferon y als die Kontrollgruppe. An Tag 10 und Tag 15 zeigten sie signifikant höhere Werte als das Kontrollkollektiv ($24,67 \pm 6,75$ und $20,35 \pm 3,47$ pg/ml vs. $11,49 \pm 1,16$ und $14,06 \pm 1,53$ pg/ml). Die 24-stündige Kultur vor und nach der Kryokonservierung zeigte bei allen drei Gruppen eine verringerte Sekretion von Interferon y (Abbildung 39).

5.2.11 Tumor Necrosis Factor alpha

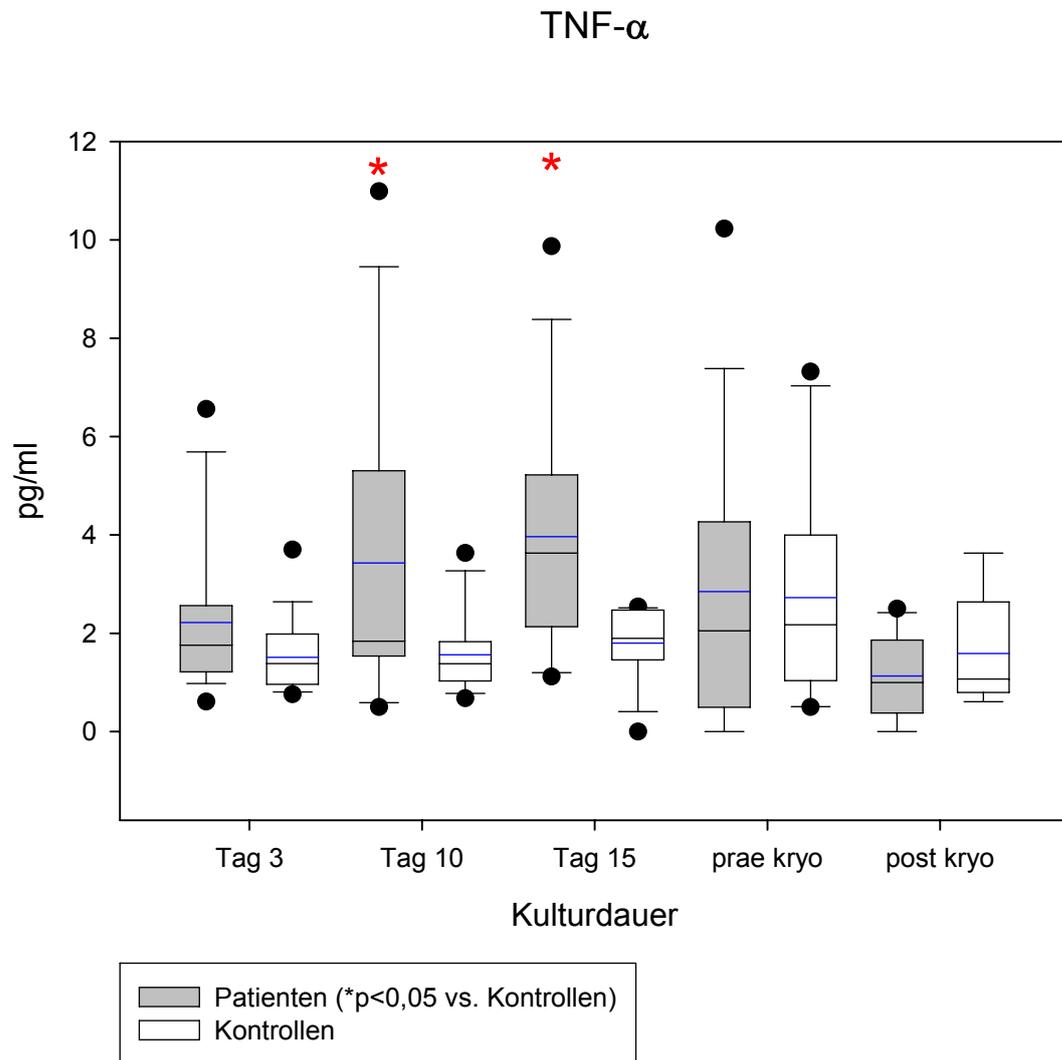


Abbildung 40: Freisetzung von TNF- α durch Keratinozyten im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Insgesamt war das proinflammatorische Protein TNF- α in den Zellkulturüberständen in nur geringer Menge nachweisbar (Abbildung 40). Die Patientengruppe sezernierte während der ersten 15 Tage deutlich mehr TNF- α als die Vergleichsgruppe. Allerdings waren nur die Werte an den Tagen 10 und 15 signifikant höher als die des Kontrollkollektivs ($3,43 \pm 0,75$ pg/ml vs. $1,56 \pm 0,22$ pg/ml und $3,97 \pm 0,57$ pg/ml vs. $1,79 \pm 0,19$ pg/ml). In der 24-stündigen Kultur vor und nach Kryokonservierung ließ die TNF- α -Synthese der Patienten wieder nach, wohingegen die TNF- α -Produktion der Kontrollgruppe vor dem Auftauen ihr Maximum mit $2,72 \pm 0,54$ pg/ml erreichte und sich erst nach dem Auftauen wieder verringerte.

In Abbildung 41 zeigte sich, dass die Gruppe der verstorbenen Patienten deutlich mehr TNF- α produzierte als die der überlebenden Patienten und die Kontrollgruppe, dennoch konnte nur am

Tag drei eine signifikant höhere Konzentration von TNF- α in den Überständen der verstorbenen Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppe gemessen werden ($2,22 \pm 0,39$ pg/ml vs. $1,51 \pm 0,19$ pg/ml). An den Tagen 10 und 15 zeigte die TNF- α -Synthese der überlebenden Patienten mit $2,96 \pm 0,67$ pg/ml vs. $1,56 \pm 0,22$ pg/ml und $3,32 \pm 0,37$ pg/ml vs. $1,79 \pm 0,19$ pg/ml signifikant höhere Werte als die Kontrollgruppe.

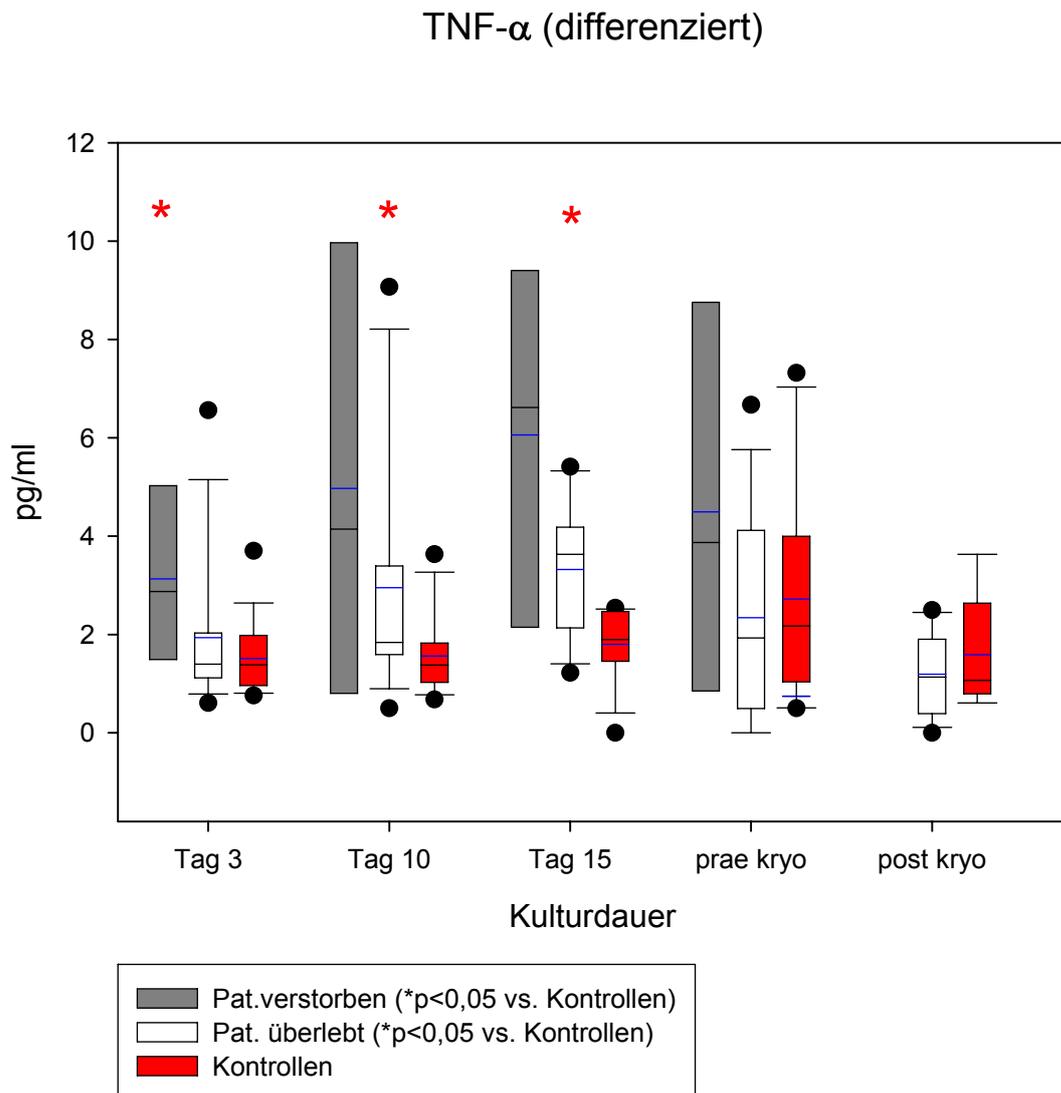


Abbildung 41: Differenzierte Darstellung der TNF- α Synthese von Hautzellen im zeitlichen Kulturverlauf und vor bzw. nach dem Einfrieren/Auftauen

5.2.12 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der Wachstumsfaktor VEGF war in den Überständen der Zellkulturen in vergleichsweise hohen Konzentrationen nachweisbar. Sowohl die Patienten als auch die Kontrollgruppe zeigte einen deutlichen Anstieg der VEGF-Sekretion mit Maximalwerten ($3387,19 \pm 494,63$ pg/ml und $4314,63 \pm 565,03$ pg/ml) an Tag 15 und einem Abfall auf minimale Werte in der 24-stündigen Kultur vor und nach Kryokonservierung. Obwohl die Kontrollgruppe ausnahmslos mehr VEGF produzierte als die Gruppe der Patienten, ließen sich nur an Tag drei und nach Kryokonservierung signifikant höhere Konzentrationen in den Überständen der Zellkulturen bestimmen ($1400,06 \pm 268,49$ pg/ml vs. $978,21 \pm 347,08$ und $444,89 \pm 163,67$ vs. $310,69 \pm 292,53$ pg/ml, Abbildung 42).

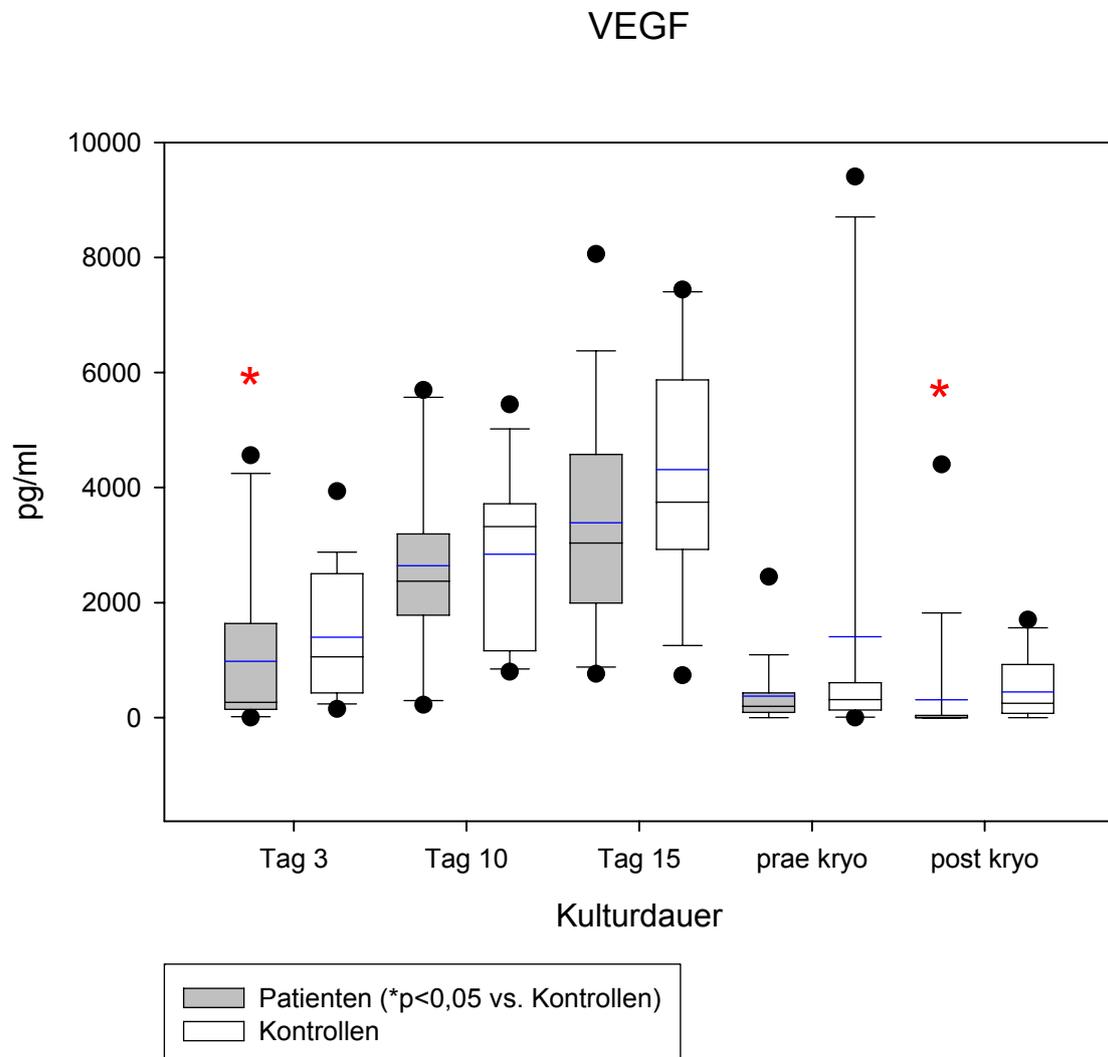


Abbildung 42: Konzentrationen von VEGF in Überständen von Zellkulturen im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Bei differenzierter Darstellung (Abbildung 43) zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der VEGF-Sekretion wie in Abbildung 27. Auch hier stiegen die VEGF Konzentrationen in den Überständen bei allen drei Gruppen bis zum Tag 15 stetig an, um dann auf minimale Werte zurückzugehen. Die Gruppe der verstorbenen Patienten produzierte dabei vor allem an Tag 3 wesentlich geringere Mengen des Wachstumsfaktors als die Gruppe der überlebenden Patienten ($600,26 \pm 400,52$ vs. $1094,51 \pm 439,21$ pg/ml). Nur vor Kryokonservierung zeigten die verstorbenen Patienten eine deutlich höhere Produktion von VEGF im Vergleich zu den überlebenden Patienten. Dabei lag der Wert weiterhin unter dem der Kontrollgruppe.

VEGF (differenziert)

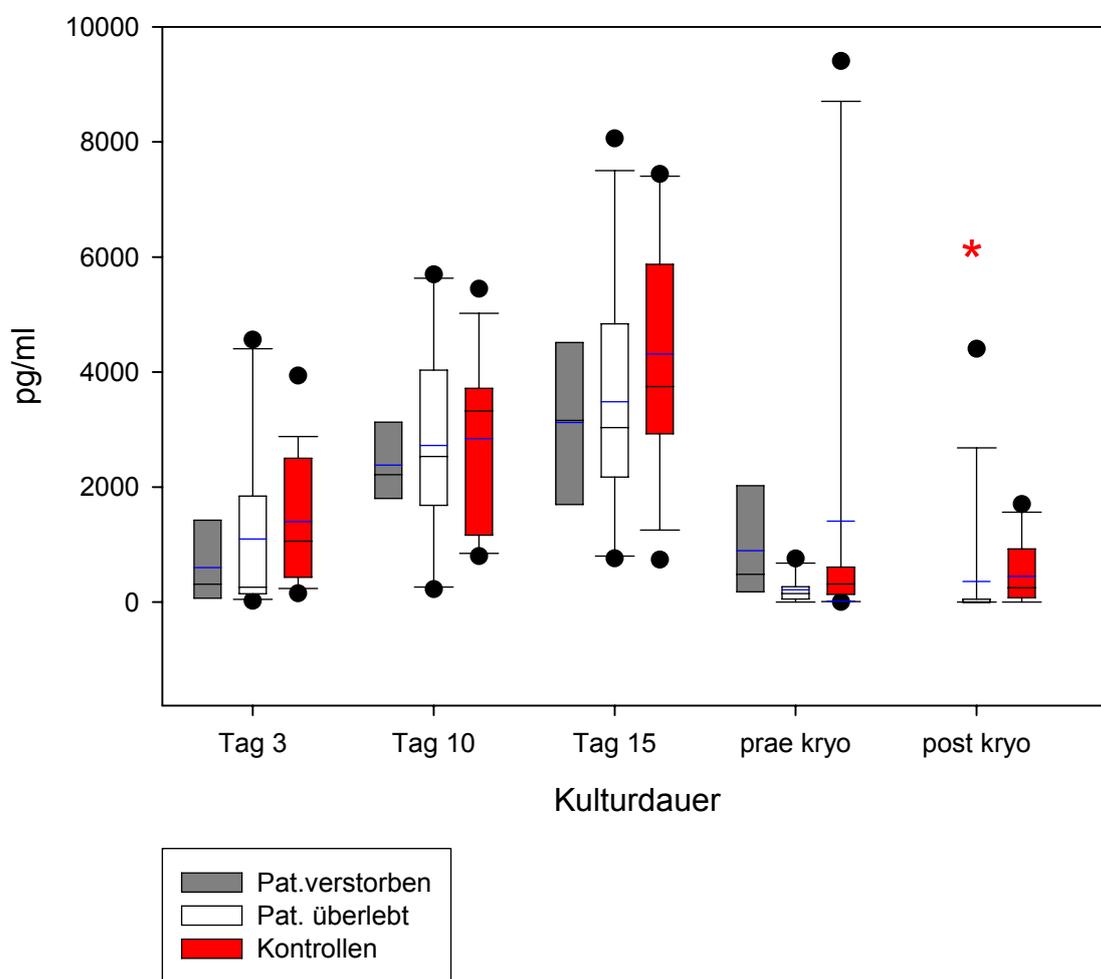


Abbildung 43: Differenzierte Darstellung der VEGF Produktion von Keratinozyten nach unterschiedlicher Kulturdauer

5.2.13 Transforming Growth Factor beta

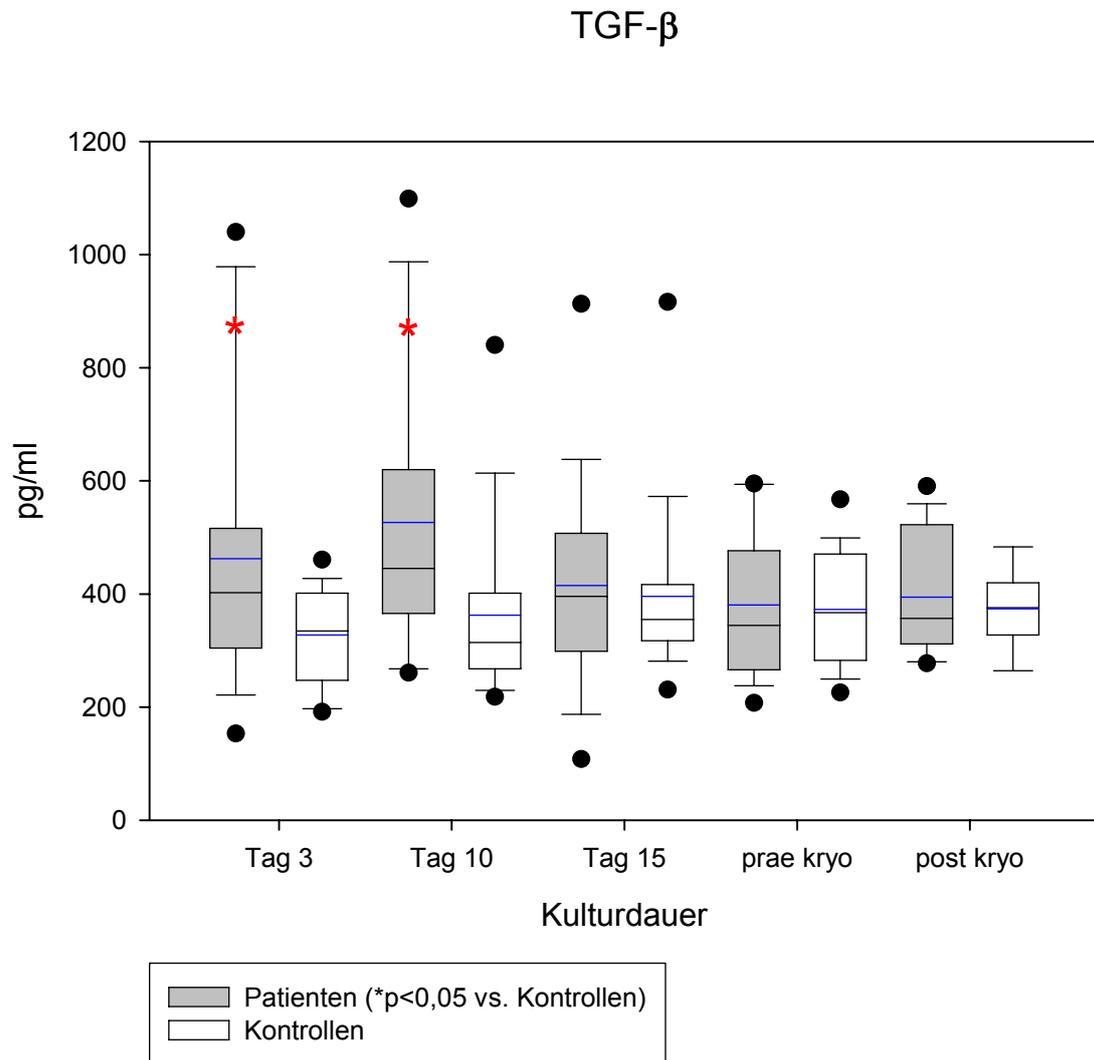


Abbildung 44: TGF- β Freisetzung von Keratinozyten im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Die Patientengruppe zeigte an den Kultivierungstagen 3 und 10 eine signifikant höhere Sekretion von TGF-beta mit einem Maximum an Tag 10 mit $526,43 \pm 61,16$ pg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $362,59 \pm 38,50$ pg/ml (Abbildung 44). An Tag 15 wurden in den Überständen der Patientengruppe wieder geringere Konzentrationen des Wachstumsfaktors gemessen ($390,54 \pm 47,91$ pg/ml). Die 24-stündige Kultur vor und nach der Kryokonservierung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Sowohl Patienten als auch das Kontrollkollektiv produzierten ähnliche Mengen an TGF- β ($380,46 \pm 31,31$ pg/ml vs. $372,75 \pm 23,45$ pg/ml [prä kryo] und $394,52 \pm 28,13$ pg/ml vs. $373,86 \pm 21,93$ pg/ml [post kryo]).

TGF-β (differenziert)

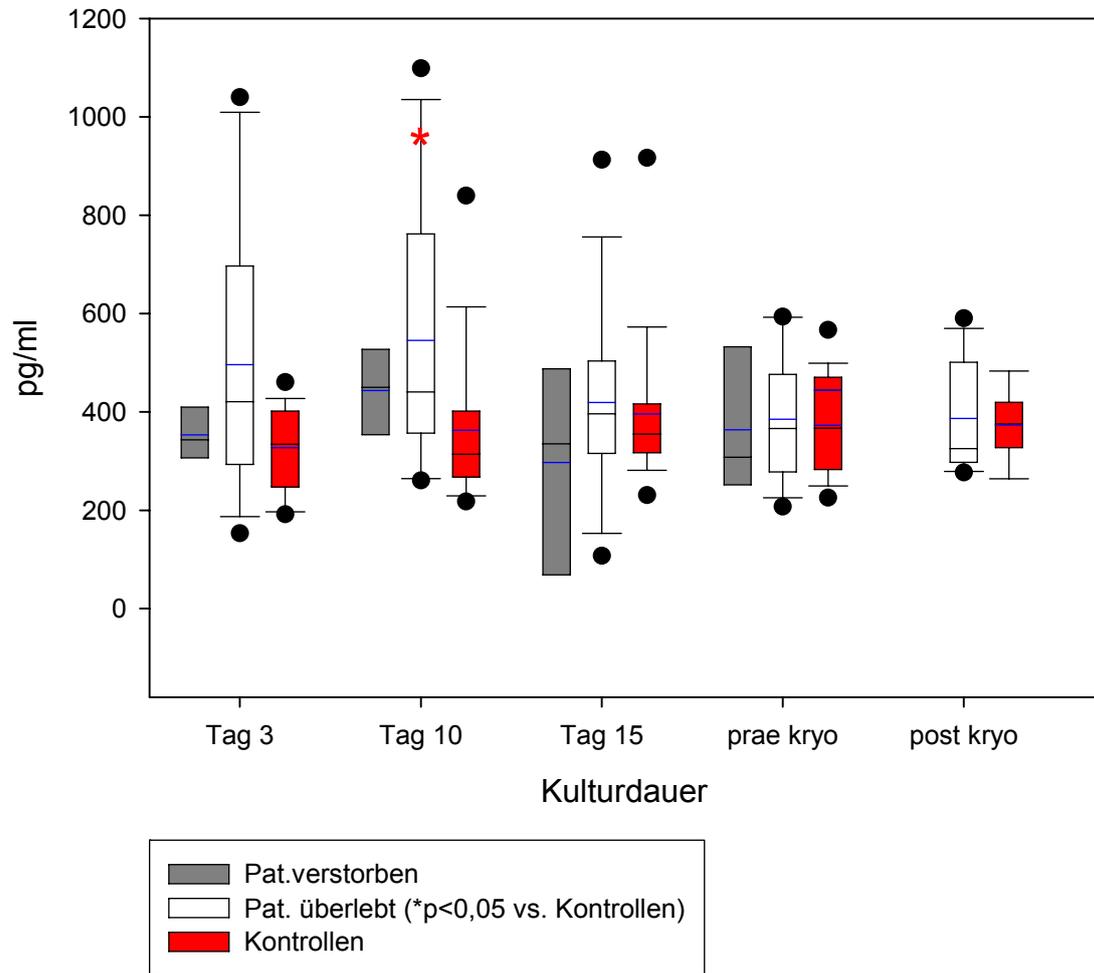


Abbildung 45: Differenzierte Darstellung der Konzentrationen von TGF-β in Überständen von Zellkulturen im zeitlichen Kulturverlauf und vor/nach Kryokonservierung

Wie in Abbildung 45 dargestellt, ähnelte das Sekretionsverhalten von TGF-β aus Keratinozyten von überlebenden Patienten dem des gesamten Patientenkollektives mit einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höheren Sekretion von TGF-β an Tag 10 mit $545,50 \pm 74,13$ pg/ml. Auch in den Überständen der verstorbenen Patienten war an Tag 10 eine deutlich höhere Konzentration des Wachstumsfaktors im Vergleich zu den anderen Kulturtagen nachweisbar, ohne aber ein statistisches Signifikanzniveau zu erreichen.

5.2.14 Fibroblast Growth Factor (FGF-basic)

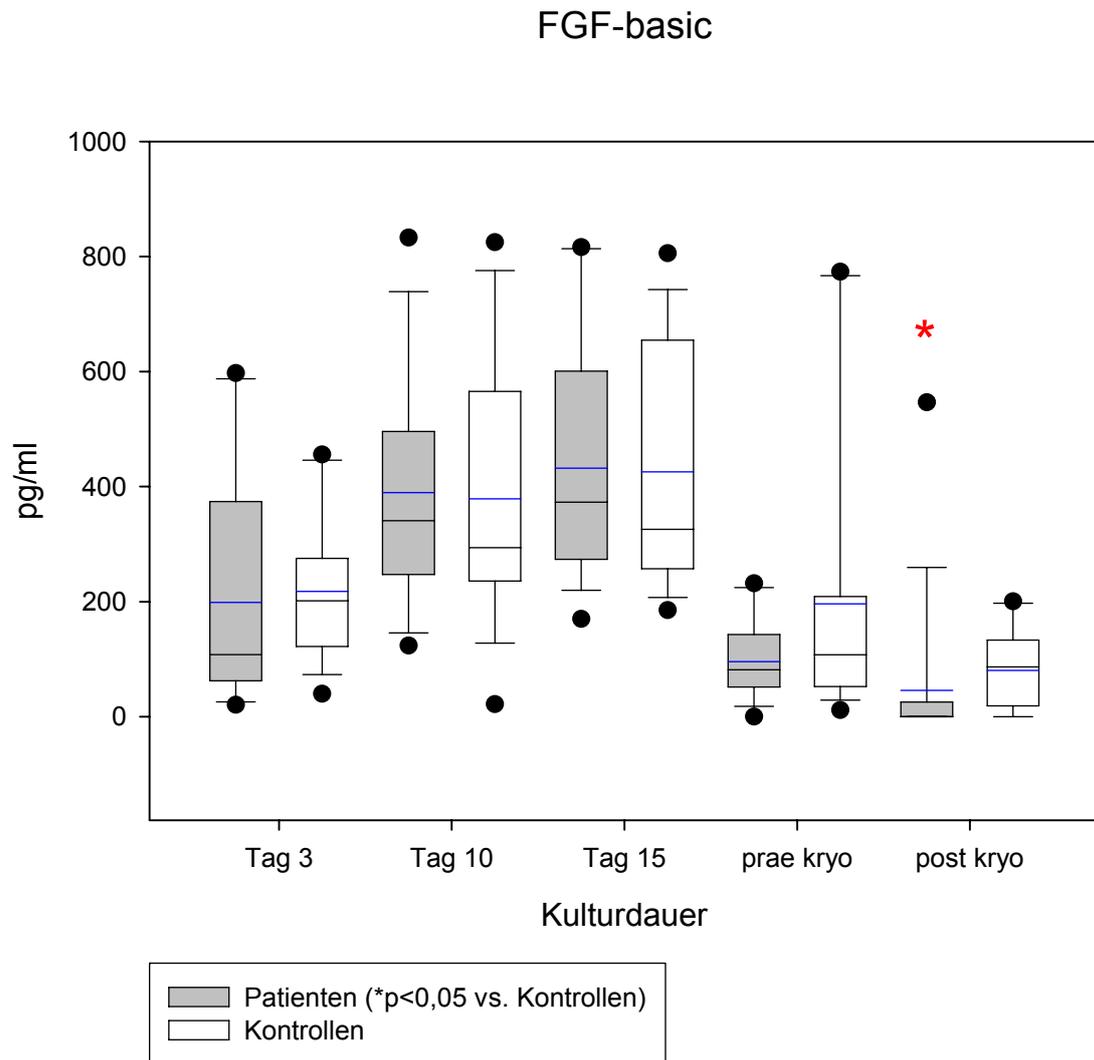


Abbildung 46: Freisetzung von FGF-basic durch Keratinozyten im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Wie Abbildung 46 deutlich macht, lag FGF-basic in den Überständen der Zellkulturen in nur mäßiger Konzentration vor. Dabei zeigten beide Gruppen, Patienten und Kontrollen, einen Anstieg der Sekretion von FGF-basic im Kulturverlauf mit einem Maximum an Tag 15 ($432,03 \pm 49,48$ vs. $425,68 \pm 53,02$ pg/ml) und einem deutlichen Abfall der Produktion vor und nach Kryokonzentration. Während sich die beiden Gruppen in ihrem Verlauf während der ersten 15 Tage sehr ähnelten, waren in der 24-stündigen Kultur vor und nach Kryokonservierung die Konzentrationen von FGF-basic in den Überständen der Kontrollgruppe deutlich höher als die der Patientengruppe. Nach dem Auftauen sezernierte die Kontrollgruppe sogar signifikant mehr FGF als die Patienten ($80,37 \pm 21,63$ vs. $45,48 \pm 36,12$ pg/ml). Beide Gruppen produzierten jedoch deutlich weniger FGF-basic in der 24-stündigen Kultur nach Kryokonservierung im Vergleich mit der entsprechenden Kultur vor

dem Einfrieren (prä kryo: $95,52 \pm 16,62$ pg/ml und $196,14 \pm 58,06$ pg/ml vs. post kryo: $45,48 \pm 36,12$ pg/ml und $80,37 \pm 21,63$ pg/ml).

Bei differenzierter Betrachtung lagen die Konzentrationen von FGF-basic in den Überständen der verstorbenen Patienten unter denen der Überlebenden, ihre maximale Sekretion erreichten sie schon an Tag 10 ($332,21 \pm 33,19$ pg/ml), während die Gruppe der überlebenden Patienten erst an Tag 15 mit $468,67 \pm 61,34$ pg/ml ihr Maximum verzeichnete. Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den verstorbenen Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede, obwohl das Kontrollkollektiv durchgehend mehr FGF sezernierte. Eine signifikant höhere Produktion des Wachstumsfaktors zeigte nur die Kontrollgruppe nach Kryokonservierung gegenüber der Gruppe der überlebenden Patienten ($80,37 \pm 21,63$ pg/ml vs. $52,27 \pm 41,56$ pg/ml) (siehe Abbildung 47).

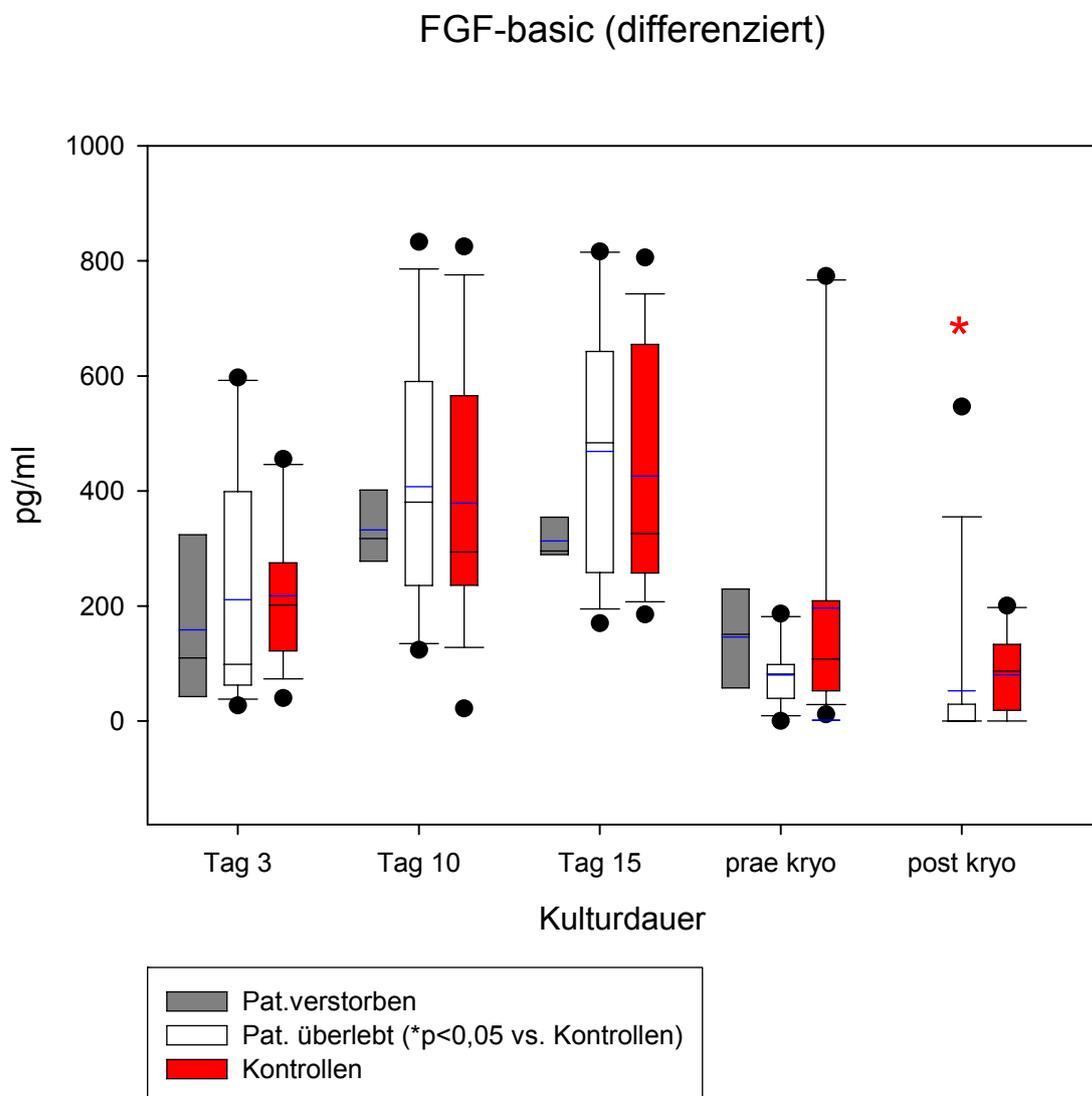


Abbildung 47: Differenzierte Darstellung der FGF-basic Produktion von Keratinozyten nach unterschiedlicher Kulturdauer und unter dem Einfluss der Kryokonservierung

5.2.15 Granulocytes Colony Stimulating Factor (G-CSF)

Obwohl die Patientengruppe innerhalb der ersten 15 Kulturtage eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe, deutlich höhere Sekretion von G-CSF mit einem Maximum an Tag 15 ($1599,44 \pm 451,40$ pg/ml) zeigte, ergaben sich in diesem Zeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. In der 24-stündigen Kultur vor und nach Kryokonservierung zeigten beide Kollektive wesentlich geringere Konzentrationen an G-CSF, wobei die Patienten nach dem Auftauen signifikant mehr G-CSF produzierten als die Kontrollgruppe ($117,19 \pm 88,09$ vs. $106,32 \pm 25,65$ pg/ml) (Abbildung 48)

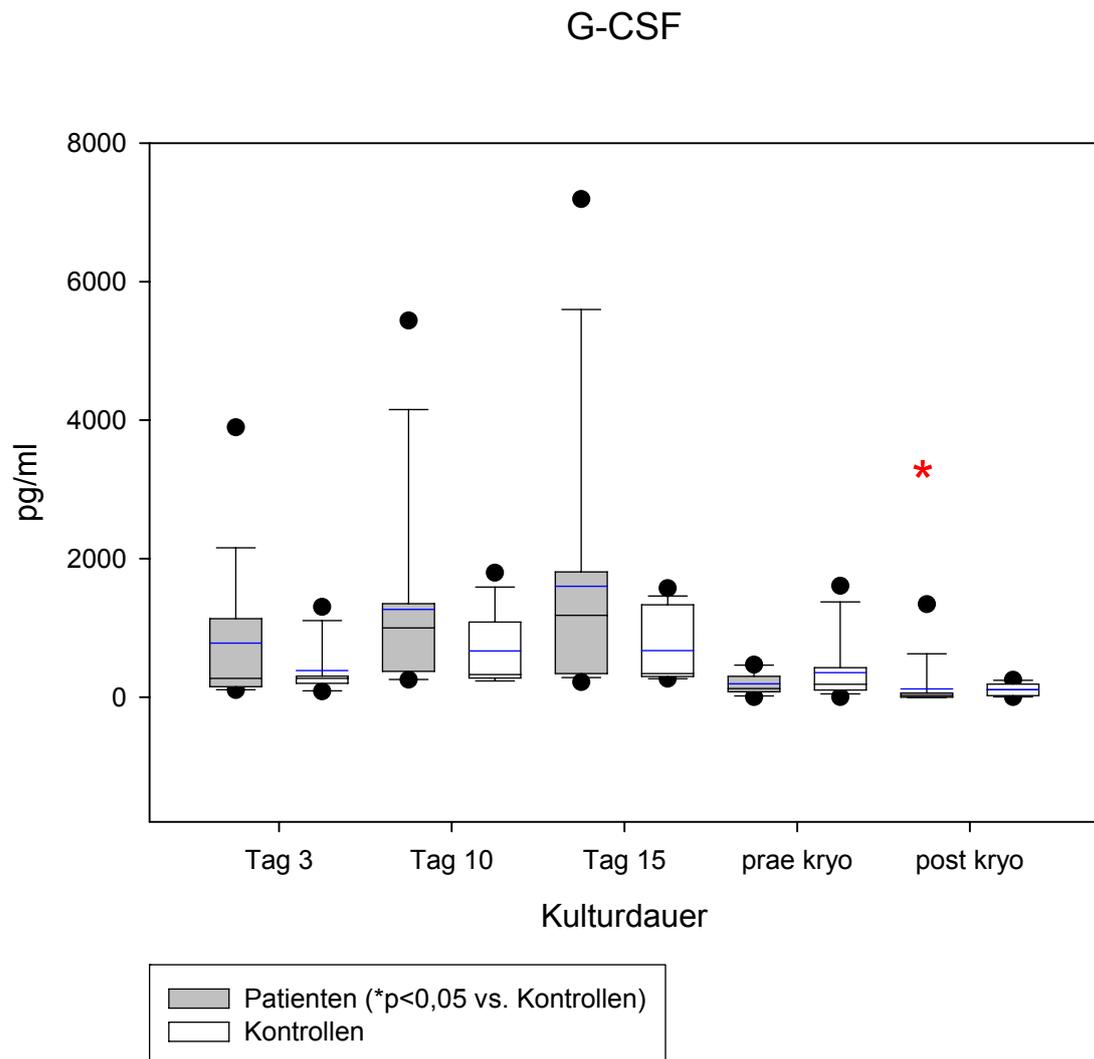


Abbildung 48: Konzentrationen von den G-CSF in Überständen von Zellkulturen im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

Die differenzierte Darstellung der G-CSF-Konzentration in den Überständen der untersuchten Gruppen zeigt Abbildung 49: Die verstorbenen Patienten sezernierten an Tag 10 und 15 mehr als doppelt so viel G-CSF wie die Kontrollgruppe ($1871,76 \pm 1192,74$ pg/ml vs. $664,55 \pm 127,60$ pg/ml und $1782,29 \pm 1143,69$ pg/ml vs. $670,79 \pm 130,07$ pg/ml). Auch die gemessenen Werte der überlebenden Patienten lagen während der ersten 15 Tage ausnahmslos über denen der Kontrollgruppe. Dennoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In der 24-stündigen Kultur nach Kryokonservierung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Produktion von G-CSF zwischen den Gruppen.

G-CSF (differenziert)

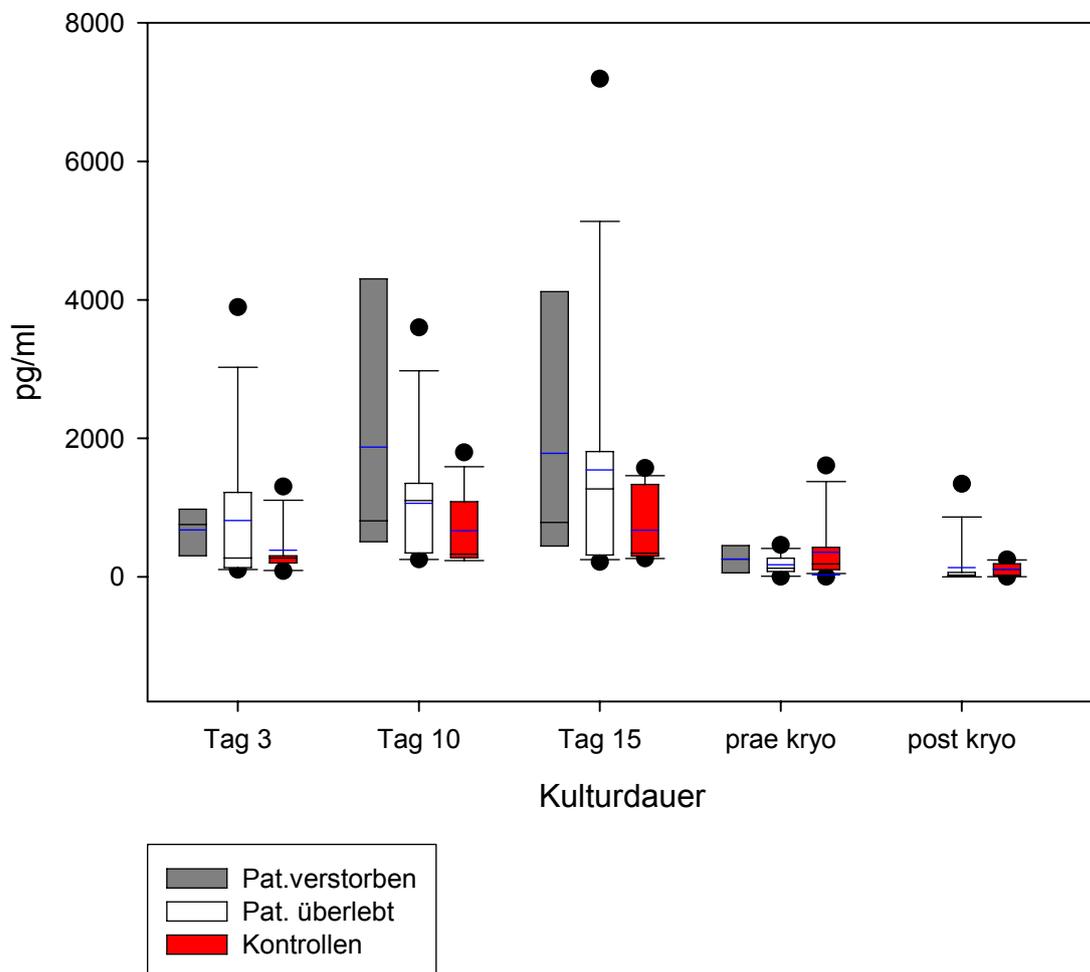


Abbildung 49: Differenzierte Darstellung der G-CSF Synthese von Hautzellen im zeitlichen Kulturverlauf und vor bzw. nach dem Einfrieren/Auftauen

5.2.16 Granulocytes/Macrophages Colonie Stimulating Factor (GM-CSF)

Der Wachstumsfaktor GM-CSF war in den Überständen von Keratinozytenkulturen nur geringfügig nachweisbar (Abbildung 50). Die Patientengruppe zeigte an den Kulturtagen 3, 10 und 15 eine signifikant höhere Sekretion von GM-CSF mit einem Maximum an Tag 15 mit $32,84 \pm 9,85$ pg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $14,59 \pm 1,67$ pg/ml. In der 24-stündigen Kultur vor und nach Kryokonservierung nahm die Produktion von GM-CSF merklich ab. Hier zeigten sich aber nur minimale Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($13,03 \pm 2,12$ vs. $16,49 \pm 2,22$ pg/ml und $9,62 \pm 1,56$ vs. $10,88 \pm 1,81$ pg/ml).

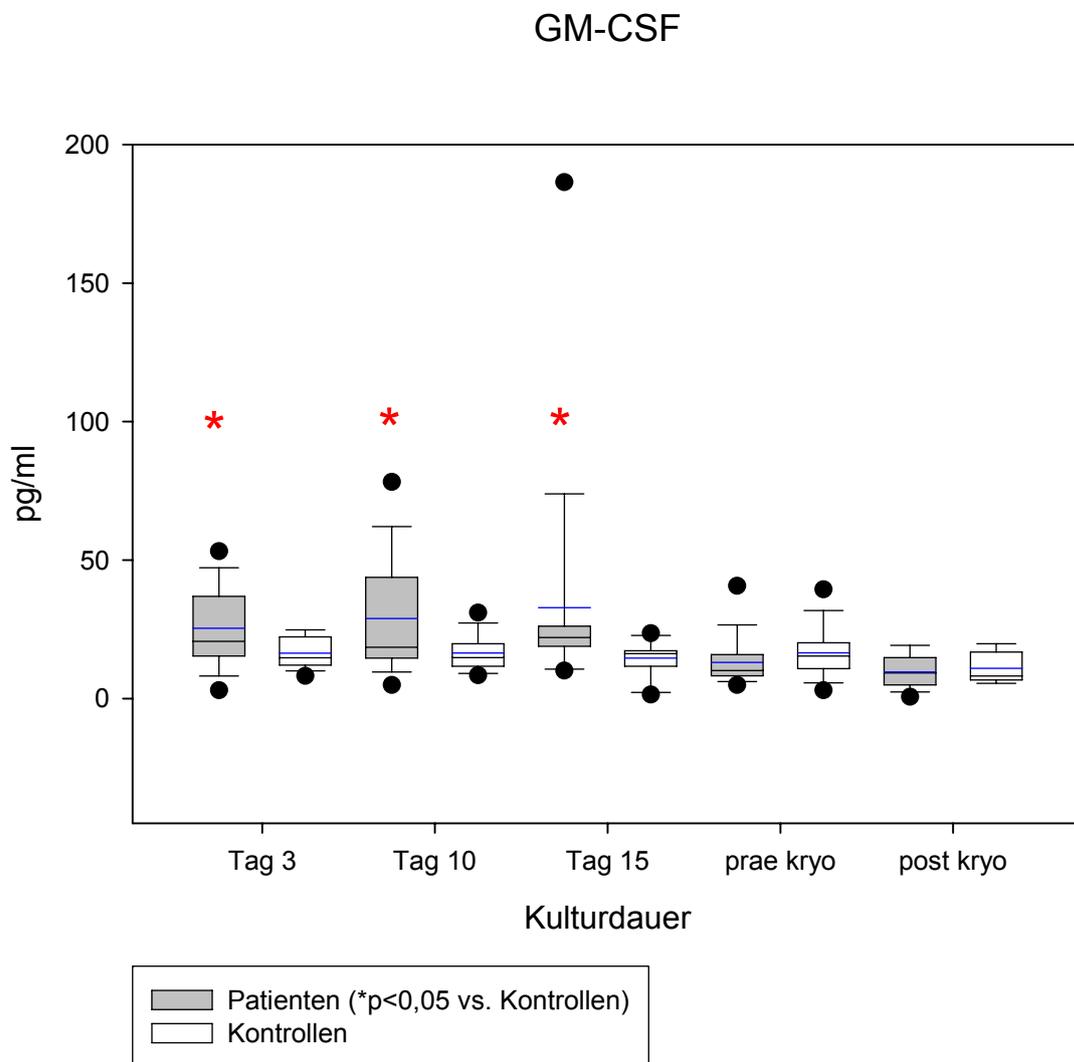


Abbildung 50: Freisetzung des Wachstumsfaktors GM-CSF durch Keratinozyten im zeitlichen Kulturverlauf und unter dem Einfluss der Kryokonservierung. *p<0,05 vs. Kontrollen

GM-CSF (differenziert)

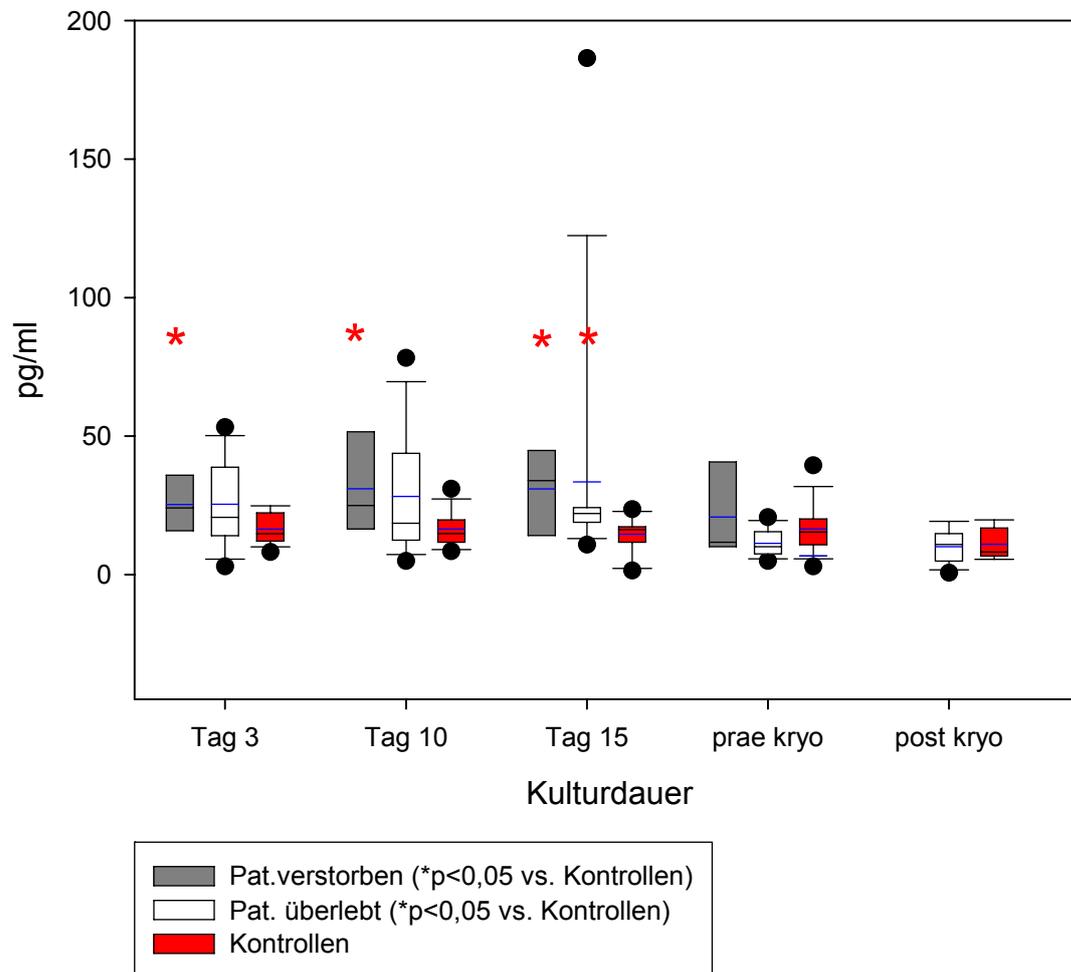


Abbildung 51: Differenzierte Darstellung der GM-CSF Synthese von Hautzellen im zeitlichen Kulturverlauf und vor bzw. nach dem Einfrieren/Auftauen

Wie in Abbildung 51 ersichtlich, zeigte die Gruppe der verstorbenen Patienten im Vergleich mit den Überlebenden keine großen Unterschiede hinsichtlich der Produktion von GM-CSF (Tag 3: $25,26 \pm 5,24$ vs. $25,35 \pm 4,18$ pg/ml, Tag10: $30,99 \pm 9,72$ vs. $28,21 \pm 6,06$ pg/ml). Allerdings sezernierte die Gruppe der verstorbenen Patienten an den Tagen 3, 10 und 15 signifikant mehr GM-CSF als die Kontrollgruppe. An Tag 15 war auch die Konzentration in den Überständen der überlebenden Patienten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($33,43 \pm 12,79$ vs. $14,59 \pm 1,67$ pg/ml).

6 Diskussion

6.1 Keratinozytenkultivierung

Rheinwald und Green etablierten 1975 als Erste ein Verfahren zur Kultivierung humaner Keratinozyten. Über mehrere Passagen hinweg gelang es ihnen die initial entnommene Hautbiopsie innerhalb von drei Wochen auf das 6000-fache der Ausgangsgröße zu expandieren (Green et al., 1979; Rheinwald and Green, 1975). Dieser Durchbruch war schließlich Ausgangspunkt für weitere, vielfältige Modifikationen dieses Verfahrens durch zahlreiche Forschungsgruppen (Boyce et al., 1983; Maciag et al., 1981; Tsao et al., 1982). So gelang unter anderem die Züchtung von mehrlagigen humanen Keratinozytentransplantaten, sogenannten „sheet grafts“ (Gallico et al., 1984; Gallico, 1990; Grenn et al., 1979; Herzog et al., 1988). O'Connor etablierte 1981 deren autologe Transplantation auf Verbrennungswunden (Gallico et al., 1984; O'Connor et al., 1981). Seitdem werden sie zur Behandlung von Brandverletzten eingesetzt. Inzwischen kann aus 3 cm² Vollhaut innerhalb von 3-4 Wochen eine Fläche von bis zu 1,7 m² gedeckt werden. Allerdings ist auf diese Weise der Wundverschluss erst nach einiger Zeit möglich (Pallua et al., 2006). Zur temporären Deckung werden aus diesem Grund zumeist allogene Hauttransplantate eingesetzt, die von Organspendern entnommen und in spezialisierten Hautbanken aufbereitet, dem Patienten kryokonserviert zu Verfügung stehen (Pallua et al., 2006). Spezifische DNA-Analysen haben ergeben, dass der Überlebenszeitraum von allogenen Keratinozyten auf Verbrennungswunden lediglich ein bis zwei Wochen beträgt (v. Donnersmarck, 1995; Przybilski et al., 2004). Sie müssen deshalb als semipermanenter Hautersatz betrachtet werden, da sie alleine nicht in der Lage sind einen definitiven Wundverschluss zu bewerkstelligen. Die begrenzte Überlebenszeit von allogenen Keratinozytentransplantaten (AKTs) auf Verbrennungswunden wird Langerhans-Zellen, Lymphozyten, endothelialen Zellen und Melanozyten zugeschrieben, die für die Expression spezifischer HLA-Antigene des Empfängers verantwortlich sind (Otto et al., 1995).

Obwohl allogene Keratinozytentransplantate nur temporär auf der Wunde verbleiben, beschleunigen sie anscheinend die Heilung thermischer Wunden. Verschiedene experimentelle und klinische Studien konnten sogar die Überlebensraten schwerst verbrannter Patienten durch Therapie mit AKTs günstig beeinflussen (Mühlbauer et al., 1995; Nunez-Gutierrez et al., 1996; Rivas-Torres et al., 1996; Koller, 1999; Brychta et al. 2001). Verantwortlich für diese lokalen, teilweise auch systemischen Effekte, werden von Keratinozyten exprimierte, Zytokine und Wachstumsfaktoren gemacht, welche beim Zerfall der allogenen Keratinozytentransplantate freigesetzt werden (Przybilski et al., 2004). Die Entwicklungen der letzten Jahre im Bereich des Tissue Engineering haben eine Vielzahl interessanter Technologien hervorgebracht, was zu einer breiten Palette an verfügbaren Hautersatzmaterialien geführt hat. Produkte aus allogenen Kulturzellen in Kombination mit synthetisch/biologischen Materialien, angereichert mit Wachstumsfaktoren und Matrixproteinen sind mitt-

lerweile kommerziell erhältlich (z.B. Dermagraft[®], Transcyte[®], Apligraf[®]). Entsprechende Materialien aus autologem Zellmaterial befinden sich derzeit in der klinischen Erprobung, haben jedoch noch nicht den gleichen Entwicklungsstand erreicht (Przybilski et al., 2004).

Das Konzept der vorliegenden Studie erlaubte den direkten Vergleich von allogenen und autologen Keratinozytentransplantaten hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung und des in-vitro Sekretionsverhaltens ausgewählter Zytokine und Wachstumsfaktoren in den Überständen der Zellkulturen nach unterschiedlicher Kulturdauer.

6.2 Immunhistochemische Färbungen

Zur Interpretation der in vorliegender Studie gemessenen Konzentrationen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in den Überständen der Keratinozytenkulturen war die zelluläre Zusammensetzung der von uns untersuchten Transplantate und etwaige histologische Unterschiede zwischen den beiden Gruppen von großer Bedeutung. Dazu wurden exemplarisch, jeweils am 10. Kultivierungstag nach Abnahme der Hautzellen, die anschließend hergestellten Zytospins aus Mammareduktions- und Verbrennungsmaterial mittels der oben erläuterten (Strept-) ABC-Methode und AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) als Substrat angefärbt. Weiterhin wurde eine Hämalaun-Eosin (HE-) Färbung durchgeführt. In vitro kultivierte, für die Transplantation geeignete Keratinozytenkulturen (Sheets) sind mehrschichtig, bestehen aus basalen und suprabasalen Keratinozyten, unterscheiden sich aber von normaler Haut hinsichtlich ihrer histologischen Struktur. Stratum granulosum und Stratum corneum, sowie verschiedene terminale Differenzierungsmarker der Epidermis sind nicht korrekt ausgebildet (Schönfeld et al., 1993).

Entgegen der Vermutung von Otto et al. konnten wir weder in allogenen noch in autologen Keratinozytenkulturen T200 (Leukozyten) oder 1F11 positive Zellen (Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen) nachweisen. Auch dendritische Zellen ließen sich mit dem monoklonalen Antikörper DCN46 an Kulturtag 10 in den Sheets beider Gruppen nicht anfärben. Die MHC Klasse I und II exprimierenden Langerhans Zellen sind in Hämalaun-Eosin-gefärbten Präparaten nicht erkennbar. Eine immunhistochemische Färbung zu ihrem Nachweis mit Antikörpern gegen das CD1a-Antigen wurde nicht durchgeführt, zumal auch in früheren Studien Langerhanszellen nicht nachgewiesen werden konnten (Schönfeld et al., 1993). Mesenchymale Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, exprimieren Vimentin. Entgegen unserer Vermutungen konnten wir vor allem in kultiviertem Patientenmaterial vermehrt Vimentin positive Zellen nachweisen. Aufgrund der von uns angewandten Methodik der Keratinozytenkultivierung, ist das Vorhandensein von mesenchymalen Zellen in den von uns angefärbten Sheets aber sehr unwahrscheinlich. Andererseits exprimieren anscheinend auch epitheliale Zellen unter Stress Vimentin (Evans, 1998). Weiterhin wird vermutet, dass proliferierende Keratinozyten in Kultur die Fähigkeit zur Expression von Vimentin besitzen (Hansson et al., 2003)

Intermediärfilamente vom Typ der Cytokeratine (CK) charakterisieren alle Zellen epithelialen Ursprungs (Franke et al., 1982; Kopan et al., 1988). CK liegen immer in Paaren, bestehend aus Typ-I und Typ-II-Polypeptiden vor, wobei in vivo nur wenige der theoretisch möglichen Paarbildungen anzutreffen sind. In der Haut werden entsprechend den Differenzierungsschichten spezifische Cytokeratine exprimiert. Das Expressionsmuster kann daher Auskunft über die hierarchische Organisation und den Differenzierungsgrad eines Epithelgewebes geben. Um einen Hinweis auf den Aktivierungszustand der kultivierten Keratinozyten erhalten und etwaige Unterschiede zwischen allogenen und autologen Sheets zu entdecken, färbten wir diese mit spezifischen anti-Cytokeratin Antikörpern an. Allogene Keratinozytensheets zeigten nach vergleichbarer Kultivierungszeit, gegenüber Autografts ein vermehrtes Auftreten von KL-1 positiven Zellen. Der monoklonale Antikörper KL-1 färbt die Cytokeratine 2, 6, 8, 10, 11, 18 und 19 an. Die Cytokeratine 7, 8, 18 und 19 sind typische Markerproteine einfacher, innerer und Wechsel-Epithelien (Schoop et al., 1999). Die Cytokeratinpaare 1/10 und 1/11 werden als Reifungscytokeratine bezeichnet. Sie kommen in terminal differenzierten und verhornten suprabasalen Zellen vor (Marenholz, 2001; Smiley et al., 2006). Interessanterweise ließen sich in kultiviertem Patientenmaterial, welches möglichst nahe einer tiefdermalen Wunde entnommen wurde, nach 10 Kultivierungstagen vermehrt die Cytokeratine 5, 6, 8 und 17 nachweisen. Das Cytokeratinpaar 5/14 wird vor allem von proliferierenden Keratinozyten exprimiert und kommt ausschließlich in der Basalzellschicht normaler Epidermis vor (Smiley et al., 2006; Hansson et al., 2003). CK-6/16 und CK-17 sind so genannte hyperproliferative Cytokeratine (Breitkreuz et al., 1998; Smiley et al., 2006). CK-6/16 ist ein Indikator für aktivierte Keratinozyten (Stark et al., 1999), zudem wird das CK-Paar von irregulär ausdifferenzierten Epithelien und während der Wundheilung synthetisiert (Brandes, 1999).

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten immunhistochemischen Färbungen stärkten unsere Vermutung, dass sich kultivierte Keratinozyten aus dem Bereich thermisch geschädigter Haut in einem aktivierten Zustand befinden. Bereits vorausgegangene Studien konnten zeigen, dass Keratinozyten durch bestimmte Stimuli wie Inflammation oder Wundheilung in der Lage sind, ihren Phänotyp zu ändern. In aktiviertem Zustand setzen sie Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die unter normalen Bedingungen nicht gefunden werden (Mc Kay et al., 1991; Kupper, 1990).

6.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Um Aussagen über den Sekretionsverlauf der von uns bestimmten Zytokine und Wachstumsfaktoren zu treffen, entnahmen wir den Keratinozytenkulturen an den Tagen 3, 10 und 15 Aliquots aus dem Kulturmedium. Die Zeitpunkte der Probenentnahmen wurden aufgrund laborexperimenteller Erfahrung gewählt: Schon nach wenigen Kulturtagen konnten wir kleine Zellklone im Mikroskop beobachten, die sich aus adhärennten Zellen gebildet hatten. Um den Tag 10 war der Boden der Zellkulturflasche erstmals von einem fast konfluenten Zellrasen bedeckt, der zu diesem Zeitpunkt allerdings noch streng einschichtig war, sich aber dann bis zum Tag 15 vollständig konfluent und zum Teil mehrschichtig entwickelte. Um optimale Wachstumsbedingungen für die von uns kultivier-

ten Keratinozyten zu schaffen, wurde das Kulturmedium regelmäßig ausgetauscht. Der letzte Medienwechsel erfolgte zur Erzielung weitgehend standardisierter Kulturbedingungen stets drei Tage vor jeweiliger Probenentnahme.

Mit Hilfe des Bio-Plex-Immunoassay Systems konnten wir die Zytokine IL-1 α und IL-1-Ra, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, VEGF, TGF- β und FGF-basic in deutlich erhöhten Konzentrationen in den Überständen beider Gruppen nachweisen. IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, INF- γ und TNF- α wurden in nur verhältnismäßig geringen, teils kaum messbaren Mengen sezerniert.

Interleukin-1 (IL-1) wurde erstmals 1972 beschrieben und ist seitdem Gegenstand vieler klinisch-experimenteller Studien. Es wird vor allem von aktivierten Makrophagen und Monozyten, aber auch vielen anderen Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, Endothelzellen und auch Keratinozyten sezerniert (Fini, 1994, Yu, 1996). IL-1 gehört zusammen mit TNF- α zu den initialen inflammatorischen Zytokinen und ist neben IL-6 und TNF- α das bedeutendste Zytokin in der Frühphase nach einem Verbrennungstrauma (Pallua, 2002). In der Haut wird IL-1 vorwiegend in den basalen Lagen der Epidermis produziert. Molekulare Klonierungen zeigten zwei Unterformen von IL-1, alpha (α) und beta (β), welche nur eine Aminosäurehomologie von 22-26 % aufweisen. Während die Alphaform anscheinend membranständig ist, wird die Betaform zum größten Teil sezerniert (Hazuda 1988). Wir konnten in den Überständen unserer Zellkulturen IL-1 β in nur sehr geringen Mengen nachweisen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Schon frühere Studien konnten zeigen, dass IL-1 β vornehmlich von Monozyten sezerniert wird, während in Keratinozyten nur das inaktive zytosolgebundene pro-IL-1 β vorliegt (Demczuk 1987; Kupper et al., 1988; Nashan und Luger, 1999). Monozyten als Produktionsort für IL-1 β konnten wir aufgrund der immunhistochemischen Färbungen allerdings weitgehend ausschließen. Das pro-IL-1 β ist inaktiv und muss durch eine spezifische Protease, Caspase-1 (auch ICE, IL-1 converting enzyme), die in Keratinozyten nicht vorhanden ist, in die aktive Form gespalten werden (Nashan und Luger, 1999). IL-1 α wird insbesondere von Keratinozyten in der Epidermis produziert (Nashan und Luger, 1999). Auch wir konnten die alpha –Form in erhöhten Konzentrationen in den Überständen unserer Keratinozytenkulturen beider Gruppen nachweisen. Interessanterweise sezernierten die Keratinozyten aus dem Bereich thermisch geschädigter Haut mehr Interleukin 1 α als Keratinozyten aus Mammareduktionsmaterial. Dabei nahm die Sekretion von IL-1 α mit der Kultivierungsdauer deutlich zu. Unter physiologischen Bedingungen ist IL-1 α in der Zirkulation nicht nachweisbar, sondern wird erst nach Gewebeschaden mit umfangreichem Zelluntergang in Gewebeflüssigkeiten oder im Serum gefunden (Nashan und Luger, 1999). Auch ruhende Keratinozyten sezernieren IL-1 anscheinend nicht aktiv, sondern setzen das intrazellulär gespeicherte Protein normalerweise durch Abschuppung frei (Nashan und Luger, 1999), mit dem Ergebnis, dass IL-1 in den Überständen humaner, in-vitro kultivierter Keratinozyten ohne entsprechenden Stimulus nur in minimaler Konzentration nachweisbar ist (Kupper et al., 1988). Im Rahmen toxisch oder entzündlich bedingter Zellschädigung kommt es jedoch zu vermehrter IL-1 Produktion und Entleerung des intrazellulären Pools (Nashan und Luger, 1999; Kupper et al., 1988). Ein besonders starker Stimulus der IL-1-

Synthese in der Epidermis scheint UV-Licht zu sein (Didierjean et al., 1991). In vitro konnte in Keratinozyten verschiedener Spezies, wie auch in Keratinozytenzelllinien eine vermehrte Synthese und Freisetzung von IL-1 durch UVB induziert werden (Nashan und Luger, 1999). Aus in-vitro-Untersuchungen ist weiterhin bekannt, dass aufgrund zellulärer Schädigung freigesetztes IL-1 die IL-1mRNS in Keratinozyten induziert und in Abhängigkeit von den Rezeptoren die autokrine Produktion von GM-CSF, IL-6, IL-8 und TNF- α stimuliert (Nashan und Luger, 1999; Kupper, 1990; Kupper et al., 1988; Fujisawa et al., 1997; Owsianowski et al., 1991). Die im Rahmen dieser Studie gemessenen Zytokinkonzentrationen scheinen dies zu bestätigen. So korrelierten IL-6, GM-CSF und TNF- α hinsichtlich ihrer Sekretionsverläufe in den Überständen kultivierter Keratinozyten aus dem Bereich tiefermal verbrannter Haut und zeigten signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Wir vermuten daher, dass thermisches Trauma die IL-1 Produktion der nahe dem Verbrennungsareal liegenden Keratinozyten stimuliert und über auto- und parakrine Aktivierung der umliegenden Keratinozyten die Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert, welche Einfluss auf Wundheilung und zumindest die lokale Immunantwort nehmen.

Obwohl die Patientengruppe konstitutiv mehr IL-1 α als die Kontrollgruppe sezernierte, zeigten sich wider Erwarten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Populationen. Weiterhin waren die in den Überständen der Keratinozytenkulturen bestimmten Konzentrationen an IL-1 α verhältnismäßig gering. Eine mögliche Erklärung könnten die beachtlich hohen Mengen an Interleukin-1 Rezeptorantagonist in den Überständen beider Gruppen sein. So zeigten verschiedene Studien, dass eine Reihe von inflammatorischen Hauterkrankungen wie das atopische Ekzem, Psoriasisläsionen und Sonnenbrand durch ein erhöhtes epidermales IL-1Ra zu IL-1 α Verhältnis charakterisiert sind, wodurch das proinflammatorische IL-1 α zumeist niedriger exprimiert wird als unter homöostatischen Bedingungen (Terui et al., 1998).

Das Vorkommen eines **Rezeptorantagonisten**, wie **IL-1Ra** im IL-1-System, ist einzigartig und bislang für keine andere Zytokinfamilie nachgewiesen worden. Selbst in 1000fach höheren Konzentrationen als IL-1 α oder IL-1 β besitzt er keine agonistische Wirkung. Die Sequenzhomologie von IL-1 β zu IL-1Ra ist mit 26% höher als die von IL-1 β zu IL-1 α . Es sind zwei verschiedene Formen von IL-1Ra bekannt. Die lösliche Form, sIL-1Ra, besitzt eine Translokationssequenz, wird nach der proteolytischen Spaltung aus pro(s)IL-1Ra von der Zelle sezerniert und antagonisiert die Wirkung von IL-1 β (Nashan und Luger, 1999). Dagegen wird der intrazellulär gespeicherte IL-1Ra (icIL-1Ra) konstitutiv in Keratinozyten und intestinalen Epithelzellen gebildet und fungiert als Gegenspieler von pro IL-1 α , das intrazellulär die Zelldifferenzierung steuert. Das Verhältnis von IL-1 zu IL-1Ra wird durch diverse Stimuli unterschiedlich beeinflusst. Das Gleichgewicht zwischen IL-1 und IL-1Ra ist bedeutsam für Keratinozytenproliferation und -differenzierung (Eller et al., 1995) und wirkt regulierend auf die inflammatorische Potenz von IL-1 in der Haut (Hammerberg et al., 1992; Bigler et al., 1992). Beispielsweise stimulieren zirkulierende Immunkomplexe, Immunglobuline und Zytokine wie IL-4 und IL-10 die Synthese von IL-1Ra in Keratinozyten und Epithelzellen (Nashan und Luger, 1999). Interessanterweise induzieren bereits 1-2% besetzte IL-1 Rezeptoren

eine biologische Antwort, wohingegen bis zu 100fach höhere Konzentrationen an IL-1 Ra notwendig sind, um die die Wirkungen von IL-1 zu antagonisieren (Nashan und Luger, 1999). Damit ließen sich die deutlich erhöhten Mengen an IL-1Ra in den Überständen unserer Zellkulturen erklären.

Interleukin 6 (IL-6) wird von Keratinozyten pathologisch unauffälliger Haut konstitutiv kaum exprimiert (Ohta et al., 1994). Erst eine Verletzung oder Störung hautphysiologischer Prozesse durch z.B. UV-B Strahlung, Viren und Bakterien sowie lokale oder systemische (Auto-) Immunerkrankungen induzieren eine verstärkte IL-6-Expression in unterschiedlichen Zelltypen der Dermis und auch in den Keratinozyten der Epidermis (Kishimoto et al., 1992). In gesunder Haut zeigen ausschließlich proliferative Basalzellen, jedoch keine weiter differenzierten Keratinozyten, eine äußerst schwache konstitutive IL-6-Expression (Grossmann et al., 1989; Krüger et al., 1991; Luger et al., 1989; Enk und Knop, 2002). Entsprechend niedrig ist die IL-6-Aktivität im Überstand unstimulierter Keratinozyten (Yoshizaki et al., 1990). Die in den Überständen der Keratinozytenkulturen aus gesunder Haut nachgewiesenen minimalen Konzentrationen an IL-6 während der ersten 15 Kulturtage stimmten mit diesen Beobachtungen überein. Dagegen produzierten kultivierte Keratinozyten aus dem Bereich tiefdermal verbrannter Haut innerhalb des gleichen Zeitraums signifikant größere Mengen an Interleukin 6 als die Kontrollgruppe. Ein vergleichbares Sekretionsmuster zeigte **Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)**. Diese Ergebnisse werden durch die Literatur unterstützt. Gene und Proteine von IL-6 und GM-CSF zeigen eine hohe Sequenzhomologie (Gauldie et al., 1987). Auch ihre Rezeptorstrukturen aus bindender und Signaltransduktionskomponente sind einheitlich (Gauldie et al., 1987). Dies lässt auf gemeinsame Signaltransduktions- oder Aktivierungswege schließen (Kishimoto et al., 1992) und könnte somit die von uns beobachtete synchrone Freisetzung von GM-CSF und IL-6 aus Keratinozyten im Bereich gesunder Haut erklären. Sowohl GM-CSF als auch IL-6 werden durch IL-1 α induziert (Kupper et al., 1988; Fujisawa et al., 1997; Owsianowski et al., 1991). Dabei zeigten beispielsweise mit IL-1 α stimulierte Keratinozyten aus atopischem Ekzem eine signifikant stärkere GM-CSF-Freisetzung als Keratinozyten aus gesunder Haut (Pastore et al., 1997). Auch in humaner und muriner Haut mit geschädigter Barrierefunktion, wie sie typischerweise auch in thermisch geschädigter Haut vorkommt, wurde eine korrelierte, auffällig hohe Zytokinproduktion und -freisetzung von GM-CSF und IL-1 α nachgewiesen (Nickoloff et al., 1994; Wood et al., 1992; Wood et al., 1996).

Über das Sekretionsverhalten von **Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF)** durch kultivierte Keratinozyten ist in der Literatur wenig bekannt. Leizer et al. konnten zeigen, dass Interleukin 1 und TNF- α in der Lage sind, die Produktion von G-CSF in Synovialzellen zu induzieren. Weitere Studien demonstrierten eine vermehrte Produktion von GM-CSF und G-CSF in kultivierten Lungenfibroblasten nach Stimulation mit IL-1 (Zucali et al., 1986). Nach unserem Wissen existieren bislang keine funktionellen Studien, die das ex-vivo Sekretionsverhalten von G-CSF in Kulturen humaner thermisch geschädigter Keratinozyten mit denen gesunder Epithelzellen vergleichend untersucht haben. Aufgrund der Korrelation der Konzentrationen von IL-1, GM-CSF und G-CSF in den Überständen beider Untersuchungsgruppen ist eine Induktion der Produktion von G-CSF durch IL-1 α in

kultivierten Keratinozyten zu vermuten, wobei auch hier Keratinozyten aus dem Bereich thermisch geschädigter Haut auffallend höhere Mengen an G-CSF sezernieren als Keratinozyten aus gesunder Haut.

Neben GM-CSF und IL-6 stimuliert IL-1 α offensichtlich auch die Synthese des proinflammatorisch wirksamen **Tumor Necrosis Factor alpha** (TNF- α) in Keratinozyten (Nashan und Luger, 1999). Die korrelierenden Sekretionsverläufe von IL-6, GM-CSF und TNF- α könnten diese Beobachtungen bestätigen. Da TNF- α von Keratinozyten nur in geringen Mengen produziert wird und ein Teil des synthetisierten TNF- α membranständig an der Zelloberfläche verbleibt (Fritsch, 2004; Kriegler et al., 1988; Decker et al., 1987) war TNF- α in deutlich niedrigeren Mengen in den Überständen der untersuchten Gruppen nachweisbar als die vergleichbaren Konzentrationen an IL-6 und GM-CSF. Andere Autoren postulieren, dass IL-1 und TNF- α synergistisch die Freisetzung von IL-6, G-CSF und GM-CSF, sowie IL-8 in verschiedenen Zellen induzieren (Leizer et al., 1990; Kupper, 1990, Kawada et al., 1997), wobei ein genauer Mechanismus bisher nicht bekannt ist (Leizer et al., 1990). Aufgrund der verhältnismäßig niedrigen Konzentrationen von TNF- α in den Überständen beider Gruppen sind weiterreichende Interpretationen diesbezüglich im Rahmen dieser Studie nicht möglich.

Auch die Synthese von **Interleukin-8** (IL-8) kann in Keratinozyten durch IL-1 induziert werden (Kupper, 1990). IL-8 zeigt nach Verbrennungstrauma eine proinflammatorische Wirkung, indem es einen chemotaktischen Reiz auf neutophile Granulozyten ausübt und die Sekretion lysosomaler Enzyme stimuliert. Darüberhinaus hat IL-8 anscheinend Auswirkungen auf die Wundheilung (Garner et al., 1994). Klinisch-experimentelle Studien konnten eine massive Erhöhung von IL-8 im Serum schwerverbrannter Patienten direkt nach thermischem Trauma gegenüber gesunden Probanden nachweisen (Faunce, 1999, Vindenes, 1995). Weiterhin konnten Untersuchungen von Zucehlen et al. erhöhte IL-8 Produktionen in Proben thermisch geschädigter Haut im Vergleich mit gesunder Haut demonstrieren (Pallua und Bülow, 2002; Zucehlen et al., 1993). Unsere Untersuchungen scheinen die Ergebnisse von Zucehlen et al. zu bestätigen. Die im Rahmen unserer Studie gemessenen IL-8 Konzentrationen in den Überständen beider Kollektive lagen allerdings weit oberhalb der Nachweisgrenze, so dass an dieser Stelle keine differenzierten Aussagen über das quantitative Sekretionsverhalten thermisch geschädigter Keratinozyten verglichen mit Keratinozyten aus dem Bereich gesunder Haut getroffen werden können.

Neben IL-1 und IL-6 sind eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel TGF- β , FGF-basic, GM-CSF und G-CSF sowie VEGF und EGF für den ungestörten Ablauf der Gewebereparation von essentieller Bedeutung (Mc Kay et al., 1991; Knighton et al., 1982; Lawrence, 1998; Köveker, 1999; Tateshita et al., 2001). Für die bestmögliche Wiederherstellung von Funktion und Morphologie des verletzten Gewebes ist ein gut koordiniertes Zusammenspiel dieser Faktoren unabdingbar:

IL-6 scheint ein wichtiger Stimulus für das Wachstum von Keratinozyten zu sein. Bisher wurde seine Bedeutung für Proliferation von Keratinozyten zwar kontrovers diskutiert (Sugawara et al., 2001; Gallucci et al., 2004; Grossman et al. 1998), neuere in vivo Untersuchungen scheinen aber seinen positiven Effekt auf Wundheilung und das Wachstum von Keratinozyten zu belegen (Ono et al., 1995; Hernandez-Quintero, 2006).

Neben **G-CSF** fördert **GM-CSF** die Differenzierung von Endothelzellen und Fibroblasten und stimuliert die Proliferation von Keratinozyten (Cianfarani et al., 2006; Kawada et al., 1997). In verschiedenen klinischen Studien konnte durch die lokale Applikation von rekombinanten humanen GM-CSF auf therapierefraktäre Ulcera eine deutlich beschleunigte Wundheilung erreicht werden (Da Costa et al., 1999; Jaschke et al., 1999). GM-CSF stimuliert die Proliferation von Vorläuferzellen im Knochenmark und beschleunigt deren Reifung zu neutrophilen Granulozyten, zusätzlich fördert es die Bildung von Eosinophilen und Monozyten (Sociinski 1988) und induziert die Differenzierung von T-Zellen in der Epidermis (Kupper, 1988). Außerdem bewirkt es gemeinsam mit **TNF- α** und **IL-1** die Aktivierung der Langerhans Zellen in der Epidermis. Neben IL-1 und IL-6 ist anscheinend auch GM-CSF für die Reepithelialisierung tieferdermalen Verbrennungswunden von Bedeutung (Mery et al., 2004; Jaschke et al., 1999; Mann et al., 2001). Während das durch Keratinozyten sezernierte IL-1 benachbarte Fibroblasten zur Sekretion von Keratinocyte Growth Factor (KGF) stimuliert und damit Keratinozyten zum Wachstum anregt (Maas-Szabowski et al., 2000), steigert GM-CSF offensichtlich die Konzentration von VEGF in chronischen Wunden, um damit die Neovaskularisation zu fördern (Cianfarani et al., 2006).

Fibroblast Growth Factor basic (FGF-basic) wird von Keratinozyten produziert (Fritsch, 2004), wirkt mitogen und besitzt chemotaktische Effekte auf Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Keratinozyten (Aktas und Kayton, 2000). FGF hat wie EGF, PDGF und TGF eine hohe angiogene Potenz und ist damit von essentieller Bedeutung für die Wundheilung (Beer et al., 1997; Corral et al., 1999; Burgess, 1989). In verschiedenen klinisch-experimentellen Studien führte die lokale Applikation von FGF-basic zu einer verbesserten Heilung diabetischer Ulcera (Albertson et al., 1993; Richard et al., 1995).

Auch **Transforming Growth Factor beta** (TGF- β) wird von Keratinozyten sezerniert. Es handelt sich um einen potenten parakrin und autokrin wirkenden Regulator von Zellwachstum, Differenzierung, Morphogenese, Adhäsion, Angiogenese, Immunantwort, Chemotaxis und Apoptose. Ferner induziert er die Produktion von extrazellulärer Matrix (EZM) und steuert deren Formation (Bonewald et al., 1999; Gold et al., 2000; Neta, 1997). Es wird vermutet, dass TGF- β das Wachstum vieler Zellarten ektodermalen Ursprungs wie beispielsweise Keratinozyten inhibiert (Ono et al., 1995; Bennett et al., 1993; Bonewald et al., 1999), auf die Proliferation von Fibroblasten dagegen aber stimulierend wirkt (Gold et al., 2000). Vor allem seine Isomere TGF- β 1 und TGF- β 2 werden für Keloidbildung und hypertrophe Narben nach Verbrennungstrauma verantwortlich gemacht. TGF- β 3 scheint als natürlicher Gegenspieler diese Wirkungen zu antagonisieren (Komarcevic,

2000; O'kane und Ferguson, 1997). Die genaue Bedeutung von TGF- β für den Prozess der Wundheilung ist bisher nicht exakt geklärt, allerdings sollen sich mäßige Konzentrationen an TGF- β positiv auf die Wundheilung auszuwirken (Bernstein et al., 1993). Auch TGF- β scheint lokal appliziert die Heilung chronischer Wunden bei immunsupprimierten Patienten zu verbessern (Tateshita et al., 2001).

Verschiedene Autoren machen daher in der Therapie tieferdormaler Verbrennungswunden die von allogenen Keratinozytentransplantaten freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren für die beschleunigte Wundheilung verantwortlich (Mühlbauer et al., 1995; Nunez-Gutierrez et al., 1996; Rivas-Torres et al., 1996; Koller, 1999; Brychta et al., 2001). Interessanterweise waren sämtliche von uns gemessenen und für die Wundheilung essentiellen Mediatoren in den Überständen beider Vergleichskollektive in erhöhten Konzentrationen nachweisbar. Dabei zeigten die weiter oben beschriebenen Zytokine und Wachstumsfaktoren größtenteils übereinstimmende Sekretionsverläufe. Auffallenderweise sezernierten kultivierte Keratinozyten aus dem Bereich tieferdormal verbrannter Haut, im Vergleich zu Keratinozyten aus gesunder Haut, deutlich, teils signifikant erhöhte Mengen an IL-6, GM-CSF, G-CSF, TNF- α und TGF- β . Viele der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mediatoren waren Gegenstand vorausgegangener Studien, dennoch sind die komplexen Interaktionen der von Keratinozyten sezernierten Faktoren und deren autokrine und parakrine Beeinflussung vieler physiologischer und pathologischer Prozesse noch nicht vollständig geklärt. Die im Rahmen dieser Pilotstudie als Marker für kutane Entzündungs- und Wundheilungsprozesse gewählten Zytokine und Wachstumsfaktoren und deren gemessene Konzentrationen fügen sich jedoch sinnvoll in das aus der Literatur bekannte, komplexe Zytokinnetzwerk ein. Die wechselseitigen Einflüsse und zum Teil gemeinsamen Transduktionswege erklären außerdem die nachgewiesenen Korrelationen von unterschiedlichen Zytokinen in den Überständen kultivierter Keratinozyten aus gesunder bzw. thermisch geschädigter Haut. Weiterhin dürfte die erhöhte Sekretionsleistung diverser Mediatoren von ex-vivo kultivierten Keratinozyten aus der Umgebung tieferdormal verbrannter Haut gegenüber Epithelzellen aus homöostatischer Umgebung für eine bereits in der Literatur beschriebene Aktivierung der umliegenden Keratinozyten durch thermisches Trauma sprechen (Mc Kay et al., 1991; Kupper, 1990).

Die in den Überständen beider Vergleichsgruppen in hohen Konzentrationen bestimmten Wachstumsfaktoren **Vascular Endothelial Growth Factor** (VEGF) und FGF-basic zeigten keine Unterschiede hinsichtlich ihres Sekretionsverhaltens im Vergleich zwischen thermisch geschädigten Keratinozyten und jenen aus gesunder Haut. Verantwortlich für die deutlich erhöhte Sekretion von VEGF könnten die hohen Konzentrationen an **Epidermal Growth Factor** (EGF) sein. Neben Keratinocyte Growth Factor (KGF), Insulin-like Growth Factor (IGF-1) und IL-6, gilt EGF als ein potenter Stimulus für die Synthese von VEGF in einer Vielzahl von Zellen (Neufeld et al. 1999). Weiterhin wirkt EGF durch seine stimulierende Wirkung auf Angiogenese und die Produktion von Fibronectin fördernd auf die Wundheilung. Durch seine chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten stimuliert EGF auch indirekt die Kollagen-Synthese (Lawrence, 1998). In Zellkultursystemen steigert EGF die

Proliferation einer Vielzahl transformierter und nicht-transformierter Zelltypen und ist aufgrund dieser Eigenschaften ein beliebter Bestandteil vieler serumfreien Medienformulierungen für eine Vielzahl von Zellen. Auch in dem von uns verwendeten Keratinozytennährmedium DMEM/HAM's F12 der Firma Biochrom AG sind definierte Mengen an EGF supplementiert; aus diesem Grund wurde auf die Bestimmung von EGF in den Überständen unserer Zellkulturen verzichtet.

Die **Interleukine IL-2, IL-4** und **IL-10** waren zu allen Messzeitpunkten nur in minimalen Quantitäten in den Überständen der untersuchten Keratinozytenkulturen nachweisbar. IL-2 und -4 zeigten zwar signifikante Unterschiede hinsichtlich ihres Sekretionsverhaltens zwischen beiden Gruppen, eine Interpretation der Ergebnisse bezüglich ihrer lokal autokrinen, parakrinen und systemischen Wirkungen war aufgrund der niedrigen Konzentrationen allerdings nicht möglich.

6.4 Systemische Auswirkungen der von Keratinozyten sezernierten Mediatoren

Die Haut wird heute als essentieller Bestandteil des körpereigenen Immunsystems angesehen. Eine Vielzahl von Zellen spielt dort bei der Vermittlung und Amplifizierung von Immunreaktionen zusammen. Keratinozyten machen den Hauptteil der Zellen in der Epidermis aus und sind für die Immunfunktion der Haut von immenser Bedeutung. Auf eine Noxe hin sind Keratinozyten in der Lage, eine große Menge an Zytokinen freizusetzen und eine Immunantwort auszulösen (Kupper, 1990). Beispielsweise gelangt IL-1 bei massiver Freisetzung in die Zirkulation und führt zu systemischen Effekten wie z.B. Fieber und Leukozytose (Nashan und Luger, 1999). Zusammen mit TNF- α bestimmt es durch lokale autokrine, parakrine und systemische Wirkungen den Schweregrad der Erkrankung (Nashan und Luger, 1999). Aussagen zur Prognoserelevanz der IL-1 Sekretion von Keratinozyten aus dem Läsionsgebiet schwerst verbrannter Patienten konnten im Rahmen dieser Studie nicht getroffen werden, da weder bei überlebenden, noch bei verstorbenen Patienten signifikant veränderte IL-1 Spiegel nachgewiesen werden konnten, auch nicht im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Ein anderes Verhalten zeigten Interleukin-6, Interferon gamma und GM-CSF. Verschiedene Studien konnten das inflammatorisch wirksame IL-6 nach massiver zellulärer Schädigung durch Trauma, Operation oder Verbrennung im Serum von Patienten in erhöhten Mengen nachweisen (Curfs et al., 1997; Ertel et al., 1990; Wang et al., 1997; Le Voyer, 1992). Dabei korrelierten erhöhte IL-6-Serumspiegel mit dem Auftreten posttraumatischer infektiöser Komplikationen (Flach, 1999). Auch in unserer Studie sezernierten kultivierte Keratinozyten aus dem Bereich thermisch geschädigter Haut von später verstorbenen Patienten signifikant mehr Interleukin-6 als kultivierte Keratinozyten aus gesunder Haut. Im Rahmen unseres Studienprotokolls wurden allerdings keine Serumproben gewonnen. Somit konnten keine Aussagen zur möglichen Korrelation von erhöhter keratinozytärer IL-6 Sekretion mit systemischen IL-6 Serumspiegeln nach thermischem Trauma getroffen werden. Auch GM-CSF war in den Überständen später verstorbener Patienten zu allen

drei Messzeitpunkten gegenüber dem Kontrollkollektiv signifikant erhöht. GM-CSF induziert die Differenzierung von T-Zellen in der Epidermis (Kupper, 1988) und fördert gemeinsam mit IL-1 und TNF- α die Aktivierung von Langerhans Zellen. Weiterhin ist der Wachstumsfaktor maßgeblich an der Heilung thermischer Wunden beteiligt (Mery et al., 2004; Jaschke et al., 1999; Mann et al., 2001). Eine direkte systemische Wirkung von GM-CSF ist in der Literatur dagegen nicht detailliert beschrieben. Die signifikant erhöhten Titer an GM-CSF in den Überständen von Keratinozytenkulturen aus dem Bereich tiefermal verbrannter Haut von verstorbenen Patienten könnten daher als ein Zeichen der massiven Zellschädigung durch thermisches Trauma interpretiert werden.

Interessanterweise produzierten auch kultivierte Keratinozyten aus dem Bereich thermisch geschädigter Haut signifikant mehr Interferon-gamma als das Kontrollkollektiv. Dabei ließen sich in den Überständen später verstorbener Patienten signifikant höhere IFN- γ -Titer nachweisen als in den Überständen von überlebenden Patienten. IFN- γ wird vor allem von Th1-Zellen und NK-Zellen sezerniert (Curfs et al., 1997). IFN- γ hat eine bedeutende immunmodulatorische Wirkung durch Steigerung der Phagozytose und der akzessorischen Funktion von Monozyten und Makrophagen als antigenpräsentierende Zellen. Durch eine vermehrte Expression von Histokompatibilitätsantigenen der Klassen I und II fördert IFN- γ die Erkennungsphase der Immunantwort und verstärkt über diesen Mechanismus sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort. Weiterhin ist IFN- γ in der Lage die Synthese verschiedener inflammatorisch wirksamer Mediatoren in Keratinozyten zu stimulieren (Leigh et al., 1994; Traidl-Hoffmann et al., 2006) und damit Entzündungszellen anzulocken. Außerdem regen erhöhte IFN- γ -Spiegel Keratinozyten selbst zur autokrinen Produktion von IFN- γ an (Konur et al., 2006). Es ist zu vermuten, dass Keratinozyten aus dem Bereich tiefermal verbrannter Haut durch Mediatoren, wie z.B. IFN- γ aus migrierenden T-Lymphozyten, aktiviert werden, was die erhöhte in vitro IFN- γ -Sekretion von Keratinozyten aus dem Verbrennungsgebiet erklären könnte.

6.5 Der Einfluss der Kryokonservierung der Keratinozytentransplantate auf die in vitro Mediatorensynthese

Seit der Entdeckung von Polge 1949, dessen Arbeitsgruppe die Kryokonservierung von Spermatozoen mit Glycerin zum ersten Mal erfolgreich durchführte, gewinnt die Lagerung biologischer Zellen in Tiefkälte in der Medizin zunehmend an Bedeutung (Fuller, 1991). Kryokonservierung bedeutet das Abkühlen von Zellen auf Temperaturen von -80°C bis -196°C bei gleichzeitiger Erhaltung der Vitalität der Zellen nach dem Auftauen. In vielen Schwerverbrennungszentren erfolgt die temporäre Deckung tiefermal verbrannter Wunden mittels allogenen Keratinozytentransplantaten. Diese stehen dem Patienten in Form von Hautbanken kryokonserviert zur Verfügung. In vivo scheinen diese allogenen, sogenannten Sheets die Überlebensrate schwerst verbrannter Patienten und die Heilung thermischer Wunden positiv zu beeinflussen (Mühlbauer et al., 1995; Nunez-Gutierrez et al., 1996; Rivas-Torres et al., 1996; Koller et al. 1999; Brychta et al. 2001). Verantwortlich für die lokalen, teilweise auch systemischen Effekte, werden von Keratinozyten exprimierte, Zytokine und

Wachstumsfaktoren gemacht, die beim Zerfall der allogenen Keratinozytentransplantate freigesetzt werden (Przybilski et al., 2004). Um den Einfluss der Kryokonservierung auf das Sekretionsverhalten der Keratinozyten in Kultur zu erfassen, bestimmten wir die Konzentrationen der ausgewählten Mediatoren in den Überständen nach jeweils 24-stündiger Kultur vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen. Dabei konnten wir die Mediatoren IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra in deutlich erhöhten Konzentrationen in den Überständen beider Fallgruppen nach Kryokonservierung nachweisen. Unter physiologischen Bedingungen wird IL-1 α jedoch nicht aktiv sezerniert und ist ohne entsprechenden Stimulus in Überständen humaner Keratinozytenkulturen nur in minimalen Mengen nachweisbar (Nashan und Luger, 1999; Kupper et al., 1988). Die massive Freisetzung der intrazellulär gespeicherten Mediatoren könnte auf einer Schädigung der tiefgekühlten Zellen beruhen. Über das Ausmaß der Kryokonservierung auf verschiedene Gewebe und die möglichen Schädigungsmechanismen existieren diverse Studien (Karlsson et al., 1996; Zieger et al., 1996; Zieger et al., 1997). Der Einfluß der Kryokonservierung auf das in-vitro-Sekretionsverhalten kultivierter Zellen ist bisher jedoch weitgehend unerforscht. Interessanterweise waren die von Keratinozyten sezernierten Mediatoren in der 24-stündigen Kultur nach Kryokonservierung in deutlich geringeren Konzentrationen als in denen vor dem Einfrieren nachweisbar. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv. Bekannterweise ist der Stoffwechsel humaner Zellen bei Temperaturen um -80°C soweit herabgesetzt, daß er praktisch zum Stillstand kommt (Mazur 1966). Um umfassende Aussagen über den Einfluß der Kryokonservierung auf die Sekretionskapazität kultivierter Keratinozyten zu treffen, sind längere Kultivierungszeiten notwendig.

6.6 Schlussfolgerungen/Ausblick

Kryokonservierte autologe und allogene Keratinozytentransplantate haben das Spektrum der Behandlungsmöglichkeiten bei tiefdermalen, aber auch drittgradigen Verbrennungen in den vergangenen Jahren deutlich erweitert und sind auch heute noch von großer Bedeutung in der Therapie Schwerstbrandverletzter. Grosses Interesse galt bisher den von kultivierten Keratinozyten sezernierten Zytokinen und Wachstumsfaktoren und ihren Auswirkungen auf die Wundheilung oberflächlicher und tiefermalen Wunden (Mühlbauer et al., 1995; Nunez-Gutierrez et al., 1996; Rivas-Torres et al., 1996; Brychta et al., 2001). In Anbetracht spektakulärer rezenter Forschungsberichte zur Plastizität von Stammzellen stehen heute neben fötalen auch adulte Stammzellen im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses und haben Ansätze wie z.B. eine Wachstumsfaktorentransfektion kultivierter Zellen oder eine molekulargenetische Reduktion der Immunogenität allogener Zellen teilweise verdrängt (Boyce, 2001; Hunzinger et Limat, 1999). Praxisnahe Aspekte wie innovative, biologische oder synthetische Applikationssysteme bzw. poröse regenerative Matrixstrukturen werden weiter bearbeitet (Hunzinger, 2004). Die derzeitige Haltung durch den Gesetzgeber gibt Letzteren eine größere Chance einer baldigen Umsetzung in den klinischen Alltag.

7 Zusammenfassung

Die Rekonstruktion ausgedehnter Hautdefekte und Korrektur funktioneller und ästhetischer Defizite nach thermischem Trauma, sind Kerngebiete der Plastischen Chirurgie. Heute verfügbare Techniken umfassen neben der autologen Hauttransplantation eine Vielzahl von Nah- und Fernlappenplastiken, mit oder ohne Präexpansion des verwendeten Areals. Alle diese Methoden basieren jedoch auf dem Vorhandensein von genügend Eigengewebe. Die Notwendigkeit einer temporären Defektdeckung wird besonders deutlich bei Verbrennungen, die über 60% der Körperoberfläche betreffen, da hier ein rascher Verschluss der Wunde mit autologer Spalthaut aufgrund limitierter Spenderareale nicht mehr möglich ist. 1975 veröffentlichten Rheinwald und Green erstmals eine Methode zur Serienkultivierung humaner Keratinozyten. O'Connor etablierte 1981 deren autologe Transplantation auf Verbrennungswunden. Seitdem werden diese kultivierten epithelialen Transplantate (KETs) zur Behandlung von Brandverletzten eingesetzt. Neben autologem Material, das erst spät verfügbar ist, erlangen kryokonservierte allogene Keratinozytentransplantate, in der Therapie von Schwerbrandverletzten, zunehmend an Bedeutung. Diese stehen dem schwerstverbrannten Patienten in Form von Hautbanken jederzeit zur Verfügung, bis eine endgültige Wunddeckung mit autologer Haut erfolgen kann. Einige Verbrennungszentren, so auch die Abteilung für plastische- und Verbrennungschirurgie des Klinikums Bogenhausen, nutzen für die Herstellung dieser allogenen Transplantate Hautmaterial aus Mammareduktionsplastiken. Obwohl diese allogene Keratinozytentransplantate nur kurzzeitig auf der Wunde verbleiben, scheinen sie die Überlebensrate schwerst verbrannter Patienten positiv zu beeinflussen und die Heilung thermischer Wunden zu beschleunigen. Verantwortlich für diese lokalen, teilweise auch systemischen Effekte werden, von Keratinozyten sezernierte, Zytokine und Wachstumsfaktoren gemacht. Die Zytokinexpression humaner epidermaler Keratinozyten wird derzeit umfassend untersucht. Inzwischen weiß man, dass Keratinozyten auf eine Noxe hin eine Vielzahl biologisch bedeutsamer Moleküle sezernieren können, mit denen sie aktiv an vielen, insbesondere entzündlichen und immunologischen Reaktionen mitwirken.

Im Rahmen dieser Studie verglichen wir die zelluläre Zusammensetzung allogener KETs aus Mammareduktionsmaterial mit autologen Keratinozytentransplantaten aus der unmittelbaren Umgebung tieferdermal verbrannter Haut. Die beiden Untersuchungskollektive stellten 17 Verbrennungspatienten mit > 25% TBSA, Grad II und/oder III und 17 zufällig ausgewählten Patientinnen, die sich einer Brustverkleinerung unterzogen. Ausserdem wurden funktionelle Veränderungen hinsichtlich des in vitro Sekretionsmusters ausgewählter Mediatoren nach 3-, 10- und 15-tägiger Kultur, sowie nach Kryokonservierung charakterisiert und mit dem klinischen Verlauf der ausgewählten Patienten korreliert. Die Erhebung der immunhistologischen Befunde erfolgte anhand gefärbten Zytospins nach der Hämalaun-Eosin- bzw. (Strept-)ABC-Methode. Die verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren in den Überständen der Keratinozytenkulturen wurden mit Bioplex Immunoassays quantifiziert.

Eine exemplarisch durchgeführte Histologie allogener KETs aus Mammareduktionsmaterial zeigte morphologisch heterogene Keratinozyten mit einem deutlich erhöhten Anteil terminal differenzierter suprabasaler Zellen, verglichen mit autologen aus Patientenmaterial (CK 10, 11 positiv). In den autologen Transplantaten waren gegenüber den allogenen vermehrt teilungsaktive Basalzellen nachweisbar (CK 5, CK 6, Vimentin positiv). Leukozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten konnten in autologen und allogenen KETs nicht nachgewiesen werden.

Die von uns in den Überständen allogener und autologer KETs bestimmten Mediatoren IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, INF- γ und TNF- α waren in nur verhältnismäßig geringen, teils kaum messbaren Mengen nachweisbar. IL-8 und IL-1Ra dagegen konnten in den Kulturen beider Fallgruppen in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden, wobei IL-8 aufgrund deutlicher Überschreitung des Meßbereiches nicht quantifizierbar war. Die Sekretionsleistung von IL-6 und GM-CSF (Proliferationsschub der Keratinozyten, Chemotaxin) nach Verbrennungstrauma war während der ersten 15 Kultivierungstage gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Insbesondere die Gruppe der verstorbenen Patienten zeigte deutlich höhere Konzentrationen dieser Mediatoren in den Kulturüberständen während der ersten 15 Kulturtage im Vergleich zur Gruppe der überlebenden Patienten. VEGF, FGF-basic, TGF- β und G-CSF zeigten in ihrem Sekretionsverhalten nur vergleichsweise minimale Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven. Die Kryokonservierung führte zu einer verminderten Mediatorensynthese, mit Ausnahme signifikant erhöhter Konzentrationen der intrazellulär gespeicherten Mediatoren IL-1 α , IL-1 β und IL-Ra in der 24-stündigen Kultur nach dem Auftauen. Sie sind offensichtlich das Ergebnis physikalischer Freisetzung durch Zelldestruktion.

Schweres Verbrennungstrauma führt zu einer erhöhten Teilungsaktivität von wundnahen epidermalen Basalzellen mit konsekutiv gesteigerter Mediatorenfreisetzung. Insbesondere die signifikant erhöhte in vitro Freisetzung des potenten Mitogens und inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 aus Keratinozyten nach schwerer Verbrennungsverletzung, verglichen mit solchen aus Mammareduktionsmaterial, ist ein deutlicher Hinweis, sowohl auf das entzündliche Geschehen, als auch auf die erhöhte Aktivität der thermisch beeinträchtigten Epithelzellen mit auto-, parakrinen und systemischen Wirkungen.

8 Abkürzungen

AKT	Allogene Keratinozytentransplantate
CLA	Cutaneous Lymphocyte Antigen
CK	Cytokeratin
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DZ	Dendritische Zellen
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF basic	Fibroblast Growth Factor basic
G-CSF	Granulocytes Colony Growth Factor
GM-CSF	Granulocytes/Macrophages Colony Growth Factor
INF- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
INF	Insulin-like Growth Factor
KET	Kultivierte Epitheliale Transplantate
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LZ	Langerhans Zellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
NKZ	Natürliche Killerzellen
PDGF	Platelet-Derived-Growth Factor
SALT	Skin Associated Lymphoid Tissue
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
TGF- α / β	Transforming Growth Factor alpha/-beta
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TZR	T-Zell-Rezeptor
VEGF	Vascular Epithelial Growth Factor
ZTL	Zytotoxische T-Zellen

9 Literaturverzeichnis

Aktas G, Kayton R, (2000): Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor in fibroblasts and extracellular matrix. *Histochemistry & Cell Biology*, 113:227-233

Albertson S, Hummel RP, Breeden M, Greenhalgh DG, (1993): PDGF and FGF reverse the healing impairment in protein-malnourished diabetic mice. *Surgery* 114:368-373

Alexander JW: (1990): Mechanism of immunologic suppression in burn injury. *J Trauma* 30: 70-75

Allgöwer M, (1963): Toxicity of burned mouse skin in relation to burn temperature. Surg Forum 14: p.37

Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C, (1998): Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology, Department of Medicine, University of Colorado Health Sciences Center, Denver 80262, USA

Barker JN, Mitra RS, Griffiths CEM, Eixit VM, Nickoloff BJ, (1991): Keratinocytes as initiators of inflammation, Lancet 337: 211-4

Bauer C, (1996): Lehrbuch der Physiologie, 2.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, p.194

Beer HD, Longaker MT, Werner S, (1997): Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. J Invest Dermatol 109:132-138

Benett NT, Schultz S, (1993): Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. Am J Surg 165: 728–737

Benninghoff, Lehrbuch für Anatomie, 15. Auflage, 1994; Verlag Urban und Schwarzenberg, ISBN 3541002557, p.125

Bernstein EF, Salomon GD, Harisiadis L, Talbot T, Harrington F, Russo A, Uitto J, (1993): Collagen expression and wound strength in normal and radiationimpaired wounds. J Dermatol Surg Oncol 19: 564–570

Bigler CF, Norris DA, Weston WL, Arend WP (1992): Interleukin-1 receptor antagonist production by human keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology 98: 38-44

Blackwell TS, Christman JW, (1996): Sepsis and cytokines: current status, Br J Anaesth 77: 110-117

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical CareMedicine, Chest 101: 1644-55

Bone RC, Fisher C.J., Jr., Clemmer T.P. (1989) Sepsis syndrome: A valid clinical entity. Crit Care Med 17(5): 389-393

Bonewald LF, (1999): Regulation and regulatory activities of Transforming growth factor beta. Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression 9: 33–44

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE, (1988): Normal Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid Human Keratinocyte Cell Line The Journal of Cell Biology 106: 761 – 771

Boyce ST, Ham RG, (1983): Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. J. Invest. Dermatol. 81(s): 33-40

Brain A, Parkins P, Coates P, Hackett M, Navsaria H, Leigh I, (1989): Survival of cultured allogeneic keratinocytes transplanted to deep dermal bed assessed by a probe of specific for y-chromosomes. Br Med J 298: 917-919

Brandes K, (1999): Untersuchungen zur Wachstumsmodulation und Strahlenwirkung an Plattenepithelkarzinomzellen in der organotypischen Co-Kultur. Dissertation im Fachbereich Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät, LMU München

Breitkreuz D, Schopp VM, Mirancea N, Baur M, Stark HJ, Fusenig NE, (1998): Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. Eur J Cell Biol 75: 273–283

Brychta P, Adler J, Rihova H, Suchanek I, Kaloudova Y, Koupil J, (2001): Cultured epidermal allografts strongly stimulate reepithelialisation in deep dermal burns. In: Horch RE, Münster AM and Achauer BM (eds) Cultured Human Keratinocytes and Tissue Engineered Skin Substitutes. Pp.183-195. Thieme Stuttgart

Burgess AW (1989): Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. Br Med Bull 45: 401-424

Cianfarani F, Tommasi R, Failla CM et al, (2005): GM-CSF treatment of human chronic ulcers promotes angiogenesis associated with de novo vascular endothelial growth factor transcription in the ulcer bed. British Journal of Dermatology 154: 34-41

Cohen IK, (2000): The Biology of Wound Healing. A supplement to Contemporary Surgery: Dowden Health Media, Inc. p. 4-8

Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA, (1999): VEGF is more important than bFGF during ischemic wound healing. Arch Surg 134: 200-205

Curfs JHAJ, Meis JFGM, Hoogkamp Korstanje JAAH (1997): A primer on cytokines: sources, receptor, effects and inducers. Clin Microbio Rev 10(4): 742-780

Da Costa RM, Ribeiro Jesus FM, Aniceto C, Mendes M, (1999): Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose ranging study of granulocyte-makrophage colony stimulating factor in patients with chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 94: 1479-80

Decker T, Lohmann-Matthes ML, Gifford GE, (1987): Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages; *J Immunol*; 138: 957ff

Debus ES, Schmidt K, Ziegler UE, Thiede A, (2000): Die Rolle der Wachstumsfaktoren in der Wundheilung. *Zentralbl Chir, Suppl* 1 125: 49–55

Deitch EA, (1990): The management of burns. *N. Engl. J. Medicine* 323: 11-42

Demling RH, LaLonde C, (1989): *Burn Trauma*. Thieme, Stuttgart-New York

Demczuk S, Baumberger D, Mach B, (1987): Expression of human IL-1alpha and beta messenger RNAs and IL-1 activity in human peripheral blood mononuclear cells; *J Moll Cell Immunol*; 3: 255ff

Didierjean L, Groves RW, Saurat, JH, (1991): Interleukin 1a in normal skin. *J Invest Dermatol* 2: 294-295

Dirks B, Büttner J (1999): *Verbrennung, Verbrühung, Notfall&rettungsmedizin* 2: 387-398 Springer Verlag

Donnersmarck v. G, Mühlbauer W,(1995): Die Verwendung von Keratinozytenkulturen in der Schwerbrandverletztenbehandlung – bisherige Erfahrungen, *Unfallchirurg*, 98: 229-232

Dries DJ, (1998): Interferon-gamma Therapy for infectious complications of injury : a called third strike? *Crit Med Care* 26(3): 419-20

Drössler K, Gemsa D (2000): *Wörterbuch der Immunologie: allgemeine und klinische Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. Berlin. p154

Eichner R, Bonitz P, Sun TT, (1984): Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression *J cell Biol* 98: 1388-1396

Eller MS, Yaar M, Ostrom K, Harkness DD, Gilcrest BA, (1995): A role for interleukin-1 in epidermal differentiation: regulation by expression of functional versus decoy receptors. *Journal of Cell Science* 108: 2741-2746

Enk A, Knop J, (2002): The skin's Immune System. *Die Gelben Hefte*. 42: 1-11

Ertel W, Faist E, Nestle C, Hueltner L, Storck M, Schildberg FW (1990): Kinetics of interleukin-2 and interleukin-6 synthesis following major mechanical trauma. *Journal of Surgical Research*. 48: 622-628

Evans RM, (1998): Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *Bioessays*, 20: 79-86

Faunce DE, Llanas JN, Patel PJ, Gregory MS, Duffner LA, Kovacs EJ, (1999): Neutrophil chemokine production in the skin following scald injury. *Burns* 25(5): 403-10

Flach R, Majetschak M, Heukamp T, Jennissen V, Flohe S, Borgermann J, Obertacke U, Schade FU (1999): Relation of ex vivo stimulated blood cytokine synthesis to posttraumatic sepsis. *Cytokine*. 11(2): 173-178

Franke WW, Schmid E, Schiller DL, Winter S, Jarasch ED, Moll R, Denk H, Jackson BW, Illmensee K (1982): Differentiation-related patterns of expression of intermediate-sized filaments in tissues and cultured cells. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 46: 431-453

Fritsch P, (2004): *Dermatologie, Venerologie*. ISBN 3-540-00332-0 Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, p.10-72

Fujisawa H, Wang B, Sauder DN, Kondo S, (1997): Effects of interferons on the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human keratinocytes. *Journal of Interferon Cytokine Research* 17: 347-353

Fuller BJ, Grout BWW, (1991): *Clinical applications of cryobiology*. CRC Press, Boca Raton, USA.

Gallucci RM, Sloan DK, Heck JM, Murray AR, O'Dell SJ (2004): Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J invest Dermatol* 122: 764-772

Garner WL, Rodriguez JL, Miller CG, Till GO, Rees RS, Smith DJ, Remick DG, (1994): Acute skin injury releases neutrophil chemoattractants. *Surgery Jul*;116(1): 42-8

Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H, (1987): Interferon β 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 84: 7251- 7255

Germann G, Steinau HU, (1993): Aktuelle Aspekte der Verbrennungsbehandlung. *Zentralbl. Chirurgie* 118: 290–302

- Gold LI, Jussila T, Fusenig NE, Stenbäck F, (2000):** TGF- β isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis. *J Pathol* 90: 579–588
- Green H, Kehinde O, Thomas J, (1979):** Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Cell Biol.* 76: 5665-5668
- Grinnell F, (1992):** Wound repair keratinocyte activation and integrin modulation. *J Cell Sci* 101:1-5
- Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, (1998):** Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6367-6371
- Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H, (1984):** Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* 311: 448-451
- Gallico GG, (1990):** Biologic skin substitutes. *Clinics in Plast. Surg.* 7: 519-526
- Hammerberg C, Arend WP, Fisher GJ, Chan LS, Berger AE, Haskill JS, Voorhees JJ, Cooper KD, (1992):** Interleukin-1 receptor antagonist in normal and psoriatic epidermis. *Journal of Clinical Investigation* 90: 571-83
- Hansson A, Bloor BK, Sarang Z, Haig Y, Morgan PR, Stark H-J, Fusenig NE, Ekstrand J, Grafström RC (2003):** Analysis of proliferation, apoptosis and keratin expression in cultured normal and immortalized human buccal keratinocytes, *European Journal of Oral Sciences* 111: 34-41
- Hatz RA, (1994):** Wound Healing and Wound Management. Berlin, Heidelberg. Springer Verlag
- Hausstein UF, (1987):** The Immune System of the Skin. *Dermatol. Monatsschr.* 173: 173-182
- Hegeness MH, Ash JF, (1977):** Use of the avidin-biotin complex for the location of actin and myosin with fluorescence microscopy *J Cell Biol* 73: 783-8
- Hernandez-Quintero M, Kuri-Harcuch W, Gonzalez A, (2006):** Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res* DOI 10.1007/s00441-006-0173-9 Springer Verlag
- Herzog SR, Meyer A, Woodley D, (1988):** Wound coverage with cultured autologous keratinocytes: use after burn wound excision, including biopsy follow-up. *J. Trauma.* 28: 195-198

Hsu SM, Raine L, Fanger H, (1981): The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 29: 577-580

Hunzinger T, (2004): Autologer kultivierter Hautersatz; *Hautarzt*, 55: 1077-1085

Hunzinger T, Limat A, (1999): Cultured keratinocyte grafts in Management of leg ulcers. *Curr Probl Dermatol* 27: 57-64

Jaschke E, Zabernigg A, Gattringer C, (1999): Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor applied locally in low doses enhances healing and prevents recurrence of chronic venous ulcers. *Int J Dermatol* 38: 380-386

Jauch KW, Heiss M, (1994): Der Brandverletzte. In: Madler, C.: NAW-Buch. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore

Jiu-Hong, Liu, (2003): Das intrazelluläre Zytokinmuster bei kritisch Kranken, p.130

Johnson SA, (1995): Prehospital management of burn patient. *Top Emergency Medicine* 17(1):1-7

Kammüller ME, (1995): Recombinant human interleukin-6: safety issues of a pleiotropic growth factor receptor. *Toxicology* 105: 91-107

Karlsson JOM, Toner M, (1996): Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 17: 243-256

Kartasova T, Roop, DR, Holbrook KA, Yuspa SH, (1993): Mouse differentiation – specific keratins 1 and 10 require a preexisting keratin scaffold to form a filament network. *J Cell Biol* 120: 1251-1261

Kawada A, Hiruma M, Noguchi H, Ishibashi A, Motoyoshi K, Kawada I, (1997): Granulocyte and macrophage colony-stimulating factors stimulate proliferation of human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 289: 600-602

Kishimoto T, Akira S, Taga T, (1992): Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258: 593-597

Knapp U, HansisM, (1999): Die Wunde: Pathophysiologie, Behandlung, Stuttgart, New York: Thieme.

Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH, (1982): Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg*, 196(4): 379-88

Knighton DR, Halliday B, Hunt TK, (1984): Oxygen as an antibiotic. The effect of inspired oxygen on infection. Arch Surg. 119(2): 199-204

Koller R, (1999): Rückblick auf 20 Jahre Erfahrung in der Behandlung von Starkstromverbrennungen. Acta Chir Austr 31: 95-103

Konur A., Schulz U, Eissner G, Andreesen R, Holler E, (2005) Interferon (IFN)- γ is a main mediator of keratinocyte (HaCaT) apoptosis and contributes to autocrine IFN- γ and tumour necrosis factor- α production. Brit J Dermatol; 152: 1134-1142

Komarcevic A, (2000): The modern approach to wound treatment. Med Pregl 53: 363- 368

Kopan R, Fuchs E, (1988): A new look into an old problem: keratins as tools to investigate determination, morphogenesis and differentiation in skin. Genes develop 3: 1-15

Köveker GB, (1999): Physiology of wound healing. in 3rd Joint Meeting of the European Tissue Repair Society & The Wound Healing Society. Bordeaux, France

Kramer MD, (1997): Immunologie und Immunpathologie. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart. 60-61

Kriegler M, Perez C, De Fay K, (1998): A novel form of TNF/chachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF; Cell; 53: 45-53

Krüger J, Ray A, Tamm I, Sehgal PB, (1991): Expression and function of interleukin-6 in epithelial cells. Journal of Cell Biochemistry 45: 327-334

Kupper TS, Lee F, Birchall N, Clark S, Dower S, (1988): Interleukin 1 binds to specific receptors on human keratinocytes and induces granulocyte macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein. J. Clin. Invest. 82: 1787-1792

Kupper TS, (1990): Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues: Mechanisms and speculations. J. Invest. Dermatol., 94: 146S-150S

Lawrence WT, (1998): Physiology of the acute wound. Wound Healing 25: 321–340

Leibowich SJ, Ross R, (1975): The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. Am J Pathol. Jan;78(1): 71-100.

Leigh IM, Lane EB, Watt FM, (1994): The Keratinocyte Handbook, Cambridge University Press, Cambridge

Leizer T, Cebon J, Layton JE, Hamilton JA, (1990): Cytokine Regulation of Colony-Stimulating Factor Production in cultures human synovial fibroblasts: In duction of GM-CSF and G-CSF production by Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor. *Blood*, Vol 76. 10: 1989-1996

Leuwer M, (199): Checkliste Interdisziplinäre Intensivmedizin, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Le Voyer T et al. (1992): Alterations in intestinal permeability after thermal injury. *Arch Surg* 127(1): p.26-9; discussion 29-30

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, (2003); SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, *Crit Care Med* 31: 1250-1256

Luger TA, Schwarz T, Krutmann J, Kirnbauer R, Neuener P, Köck A., Urbanski A, Borth W, Schauer E, (1989): Interleukin-6 is produced by epidermal cells and plays an important role in the activation of human T-lymphocytes and natural killer cells. *Annals New York Academy of Sciences* 557: 405-414.

Maas-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig NE, (2000): Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1 induced keratinocyte growth factor expression in resting-fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 114 (6): 1075-1084

Maciag T, Nemore RE, Weinstein R, Gilchrest BA, (1981): An endocrine approach to the control of epidermal growth: Serum-free cultivation of human keratinocytes. *Science* 211: 1452-1454

Mann A, Breuhahn K, Schirmacher P, Blessing M, (1998): Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: stimulation of ceratinocyte proliferation, granulation tissue formation and vascularisation. *J Invest Dermatol*; 117: 1382-90

Marenholz I, (2001): Molekulargenetische Charakterisierung des Epidermalen Differenzierungs-komplex (EDC) auf Chromosom 1 des Menschen. Marenholz I., Dissertation im Fachbereich Biologie Chemie Pharmazie der Freien Universität Berlin

Mazur P, (1966): Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing, in: *Cryobiology*, Meryman, H.T. (ed.), pp. 213-315. Academic Press, London

Mazzlupo S, Wong P, Martin P, Coulombe PA, (2003): Role of keratins 6 and 17 during wound closure in embryonic mouse skin. *Dev Dyn* 226: 356-365

Mc Kay IA, Leigh IM, (1991): Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing, Br. J. Dermatol., 124: 513-518

MedOCT-group at the Centre of biomedical Technology and Physics, Medical University Vienna (2005)

Mery L, Girot R, Aractingi S, (2004): Topical effectiveness of molgramostim (GM-CSF) in sickle cell disease leg ulcers. Dermatology 204: 135-7

Miossec P, (1995): Pro- and antiinflammatory cytokine balance in rheumatoid arthritis, Clin Exp Rheumatol 13 (12): 13-16

Moonis M, Ahmad I, Bachhawat BK, (1992): Macrophages in host defence—an overview. Indian J Biochem Biophys 29 (2): 115-22

Moss J, Lane MD, (1971): The biotin - dependend enzymes Adv. Enzymol.; 35: 321-442

Mühlbauer W, Donnersmarck v. G, Hoefter E, Hartinger A, (1995): Keratinozytenzüchtung und –transplantation bei Verbrennungen. Chirurg 66: 271-276

Muller MJ, Nicolai M, Wiggins R, (1996): Modern treatment of a burn wound. Herndon DN (ed) Total Burn Care: WB Saunders, pp 136-147

Murray HW, (1996): Current and future clinical applications of interferon-gamma in host antimicrobial defense. Intensive Care Med 22(4): 456-461

Nanney LB, King LEJ, (1996): Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha. The molecular and cellular biology of wound repair, ed. R.A. Clark. Vol. 2 nd., New York: Plenum Press. 171-194.

Nashan D, Luger TA, (1999): Interleukin 1, Wirkungsmechanismen und therapeutische Möglichkeiten, der Hautarzt, 50: 756-763

Neta R, (1997): Modulation with cytokines of radiation injury: suggested mechanisms of action. Envir Health Perspect Suppl 106: 1463–1465

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z, (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J., 13(1): 9–22

Nickoloff BJ, Naidu Y, (1994): Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. Journal of the American Academy of Dermatology 30: 535-546

Nunez-Gutierrez H, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuchw, (1996): Combined use of allograft and autograft epidermal cultures in therapie of burns. *Plast Reconstr. Surg* 98: 929-941

O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H, (1981): Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*: 75-78

Ohta Y, Nishiyama S, Nishioka K, (1994): In situ expression of interleukin-6 in psoriatic epidermis during treatment. *Journal of Dermatology* 21: 301-307

O'kane S, Ferguson MWJ, (1997): Transforming growth factor beta's and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 63-78

Ono I, Gunji H, Zhang JZ, Maruyama K, Kaneko F, (1995): A study of cytokines in burn blister fluid related to wound healing. *Burns* 21(5): 352-355

Ono I, (1999): Roles of cytokines in wound healing processes. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 100: 522-528

Otto WR, Nanchahal J, Lu Q-L, Boddy N, Dover R, (1995): Survival of allogenic cells in cultured organotypic skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 96: 166-167

Owsianowski M, Busch FW, Bonnekoh B, Orfanos CE (1991): Long-term cultured adult human keratinocytes secrete granulocyte-macrophage colonystimulating factor but not interleukin-3 after cytokine exposure in vivo. *Skin Pharmacology* 4: 158-164

Pallua N, Bülow v. S, (2002): Immunologische Reaktionen nach thermischem Trauma, *Handbuch der Verbrennungstherapie*, Bruck/ Müller/ Steen, ecomed, s.96-100, ISSN 3-609-51800-6

Pallua N, (1997): Burn injury. Staged management and prognosis in the burn center. *Z Arztl. Fortbildung Qualitätsicherung* 91 (5): 429-436

Pallua N, Bülow v. S, (2006): Behandlungskonzepte bei Verbrennungen. *Chirurg* 77: 179-188

Pastore S, Fanales-Belasio E, Albanesi C, Chinni LM, Gianetti A, Girolomoni G, (1997): Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *Journal of Clinical Investigation* 99: 3009-3017

Peters JH, Baumgarten H, Schulze M, (1985): Monoklonale Antikörper Herstellung und Charakterisierung Springer -Verlag: 9: 154-158; 209-212

Polk HC, (1992): A randomized prospective clinical trial to determine the efficacy of interferon-gamma in severely injured patients. *Am J Surg* 163(2): 191-196

Przybilski M, Deb R, Erdmann D, Germann G, (2004): Aktuelle Trends in der Entwicklung von Hautersatzmaterialien. *Chirurg* 75: 679-587

Rheinwald JG, Green H, (1975): Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331- 344

Rennekampff HO, Berger A, (2002): Pathophysiologie der Verbrennungswunde, *Handbuch der Verbrennungstherapie*, Bruck/ Müller/ Steen, ecomed, p.43

Richard JL, Parer-Richard C, Daures JP, Clouet S, Vannereau D, Bringer J, Rodier M, Jacob C, Comte-Bardonnet M (1995): Effect of topical basic fibroblast growth factor on the healing of chronic diabetic neuropathic ulcer of the foot. A pilot, randomized, doubleblind, placebo-controlled study. *Diabetes Care* 18: 64-69

Rivas-Torres MT, Amato D, Arambula-Alvarez H, Kuri-Harcuch W, (1996): Controlled clinical study of skin donor sites and deep partial-thickness burns treated with cultured epidermal allografts. *Plast Reconstr. Surg* 98: 278-287

Robson MCS, Heggens BD, (1990): Wound Healing alterations caused by infection. *Clinical Plastic Surgery*, 17: 485-492

Schönfeld M, Moll I, Maier K, Jung EG, (1993): Keratinozyten aus der Zellkultur zur Therapie von Hautdefekten. *Der Hautarzt* 44: 281-289.

Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE, (1999): Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic cocultures with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 112: 343–353

Singer AJ, Clark RAF, (1999): Cutaneous wound healing. *J Pathol* 5-10

Smiley A, Klingenberg J, Boyce S, Supp D, (2006): Keratin expression in cultured skin substitutes suggests that the hyperproliferative phenotype observed in vitro is normalized after grafting. *Burns* 32: 135-138

Smola H, Eming SA, Hess S, Werner S, Krieg T, (2001): Wundheilung und Wundheilungsstörungen: Moderne Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 98/43 A-2802/B-2387/C-2235

Sociinski MA, Cannistra SA, (1988): Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1: 1194-1198

Stark HJ, Baur M, Breitzkreuz D, Mirancea N, Fusenig NE (1999): Organotypic keratinocyte Cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *J Invest Dermatol* 112: 681–691

Streilein JW, (1983): Skin associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J. Invest. Dermatol.* 80: 12-16

Sugawara T, Galluci RM, Simeonova PP, Luster IM, (2001): regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes. *Cytokine* 15: 328-336

Tateshita T, Ono I, Kaneko F, (2001): Effects on collagen matrix containing transforming growth factor TGF β 1 on wound contraction. *J Dermatol Science* 27: 104-113

Terui T, Hirao T, Sato Y, Uesugi T, Honda M, Iguchi M, Matsumura N, Kudoh K, Aiba S, Tagami H, (1998): An increased ratio of interleukin-1 receptor antagonist to interleukin-1alpha in inflammatory skin diseases. *Experimental Dermatology* 7: 327-334

Thews G, Mutschler E, Vaupel P, (1999): Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

Traidl-Hoffmann C, Münster I, Ring J, Behrendt H, (2006): Impact of Desloratadine and Loratadine on the Crosstalk between Human Keratinocytes and Leucocytes: Implications for Anti-Inflammatory Activity of Antihistaminics. *Int Arch Allergy Immunol*; 140: 315-320

Tsao MC, Waltham BJ, Ham RG, (1982): Cloned growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. cell Physiol.* 110: 219-229

Vindenes H, Ulvestad E, Bjerknes R, (1995): Increased levels of circulating interleukin-8 in patients with large burns: relation to burn size and sepsis. *J Trauma* 39(4): 635-40

Walcher F (2004): Unfallchirurgische Notfälle; Frakturen, Luxationen und Weichteilverletzungen. Unfallchirurgie Uniklinik Frankfurt

Wang P, Ba ZF, Chaudry IH, (1997): Severe hypoxemia in the absence of blood loss depresses hepatocellular function and up-regulates IL-6 and PGE2. *Biochim Biophys Acta*, 10; 1361(1): 42-8

Waltman M, (1995): Assessing the severity of the burn injury. *Top Emergency Medicine* 17(1): 17-24

Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT, (1994): The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*. 266(5186): 819-22

Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR (1992): Kutanous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *Journal of Clinical Investigation* 90: 482-487

Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR, (1996): Barrier disruption stimulates interleukin-1 α expression and release from a preformed pool in murine epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 106: 397- 403

Yanaga H, Udoh I, Yamauchi T, Yamamoto, Kiyokawa K, Inoue Y, Tai Y, (2001): Cryopreserved cultured epidermal allografts achieved early closure of wounds and reduced scar formation in deep partial thickness burn wound and split-thickness skin donor sites of pediatric patients. *Burns* 27: 689-698

Yoshizaki K, Nishimoto N, Matsumoto K, Tagoh H, Taga T, Deguchi Y, Kuritani T, Hirano T, Hashimoto K, Okada N, Hishimoto T (1990): Interleukin 6 and expression of its receptor on epidermal keratinocytes. *Cytokine* 2: 381-387

Zellweger G, (1995): Verbrennungen. In: Rüter, A. et al.: Unfallchirurgie. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore

Zhi-yang F, Zhi-yong S, Ngao L, Sheng-de G, (1992): Modern treatment of severe burns. Springer, Berlin-Heidelberg-New York

Zieger MAJ, Tredget EE, McGann LE, (1996): Mechanisms of cryoinjury and cryoprotection in split-thickness skin. *Cryobiology* 33: 376-389

Zieger MAJ, Tredget EE, Sykes BD, McGann LE, (1997): Injury and protection in split-thickness skin after very rapid cooling and warming. *Cryobiology* 35: 53-69

Zucali JR, Dinarello CA, Oblon DJ, Gross MA, Anderson L, Weiner RS, (1986): Interleukin 1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E₂. *J Clinical Invest* 77:1875

Zucehlen R, Walz A, Rot A, (1993): In vitro and in vivo activity of pathophysiology of human IL-8 and retarded peptides. *Int Rev Exp Path*, 34B: 27-42

10 Danksagung

Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

(Johann Wolfgang von Goethe)

Ich möchte mich hiermit sehr herzlich bei den zahlreichen Menschen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. med. Eugen Faist für seine motivierende Unterstützung und seine ausgezeichnete Betreuung meiner Studie. Ganz besonderen Dank schulde ich ihm für seine Hilfe bei der Planung meiner beruflichen Zukunft.

Meinem Betreuer Dr. Siegfried Zedler möchte ich ganz herzlich für seinen Beistand bei der Durchführung meiner Messungen, für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für die Hilfe bei Vorbereitung meiner Vorträge danken. Sein Optimismus half mir auch in weniger erfolgreichen Wochen nie die Freude und Motivation an dieser Arbeit zu verlieren.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei Frau Maren Klein bedanken. Sie war mir bei der Durchführung meiner Messungen eine große Unterstützung. Mit ihrer freundlichen Art stand sie mir jeder Zeit helfend zur Seite.

Des Weiteren danke ich sehr herzlich den Mitarbeitern der Intensivstation des Zentrums für Schwerbrandverletzte unter der Leitung von Herrn Dr. Guido Henkel von Donnersmarck und der Abteilung für Mikrobiologie unter der Leitung von Herrn Dr. Blaufuss, Städtisches Krankenhaus München-Bogenhausen. Ohne die aufgewendete Geduld, Mithilfe und Zeit der dort arbeitenden Schwestern und Ärzte wäre die Durchführung des klinischen Teils dieser Studie nicht möglich gewesen. Besonders hervorheben möchte das große Engagement von Frau Manuela Fricker aus der Abteilung für Mikrobiologie. Ohne ihre tatkräftige Hilfe rund um die Uhr wäre der praktische Teil dieser Arbeit kaum zu realisieren gewesen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Guido Henkel von Donnersmarck bedanken, der mir trotz seines vollen Terminkalenders jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meinen Eltern, meinen Großeltern und Michael für ihre unermüdliche Unterstützung und Zeit bedanken, die sie in diese Arbeit investiert haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum/-ort	15.02.1979, Tübingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. med. Inge Gauglitz und Prof. Dr. rer. nat. Günter Gauglitz
Geschwister	Antje Gauglitz (Zwillingschwester) und Stephan Gauglitz (10.09.1985)

Berufliche Tätigkeit

seit 10/06	Research fellow an der University of Texas Medical Branch, Shriners Hospital for Children, Department of Trauma and Burns, Galveston, Texas, USA
07/06– 09/06	Research fellow an der National University of Singapore, Department of Cellbiology – Stem Cell Research Facility, Singapore

Studium und Schule

10/02 – 04/06	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
10/99 – 10/00	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
1989 – 1998	Besuch des Naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Tübingen
1998	Abitur (Hauptfächer: Mathematik, Biologie und Geschichte)

Examina

04/2006	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2004	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2002	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2001	Ärztliche Vorprüfung

Praktisches Jahr

11/06 – 03/06	Dermatologie: Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, LMU München
10/06 – 11/05	Innere Medizin: Angiologie im Krankenhaus München Schwabing
08/05 – 10/05	Kardiologie im Concord Repatriation General Hospital in Sydney, Australien
06/05 – 08/05	Chirurgie: Traumatologie und Viszeralchirurgie im Krankenhaus München Schwabing
04/05 – 06/05	Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Famulaturen

03/04 – 04/04	Allgemeinmedizin: Dr. med. Th. Weidlich, Erkheim
08/03 – 08/03 u. 02/03 – 04/03	Chirurgie: Städt. Krankenhaus Bogenhausen - Abt. für Plastische und Handchirurgie, Zentrum für Schwerbrandverletzte, München
02/02 – 03/02	Innere Medizin: Hämatologie und Onkologie Medizinische Klinik und Poliklinik III Großhadern, LMU München

Veröffentlichungen/Vorträge/Poster

Gauglitz G, Finnerty CC, Song J, Herndon DN, Boehning D, Jeschke MG. Insulin improves hepatic mitochondrial function and structure, decreases hepatocyte apoptosis and ER stress after burn via PI3K/Akt signaling. Singleton Surgical Society, University of Texas, Galveston, TX

GG Gauglitz, MG Jeschke, GH v. Donnersmarck, E Faist, DN Herndon, S Zedler. A comparison of functional characteristics of cultured keratinocytes following severe burn compared to non-burned controls. Oral Presentation at the 17th Annual Meeting of the Wound Healing Society, Tampa, FL

C. Finnerty, D. Herndon, **G. Gauglitz***, M. Jeschke. Insulin attenuates the hyperinflammatory state of hypertrophic scar cells. Thirties Annual Conference on Shock, Baltimore, Maryland

Gerd Gauglitz, David N Herndon, Gabriela Kulp, Celeste C Finnerty, Marc G Jeschke. Does stress induced insulin resistance and hyperglycemia lead to chronic glucose intolerance in severely burned pediatric patients. Oral Poster at the 7th World Congress of Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis – TSIS 2007, Munich, Germany

Jeschke MG, Finnerty CC, **Gauglitz G**, Song J, Herndon DN, Boehning D. Insulin improves hepatic mitochondrial function and structure, decreases hepatocyte apoptosis and ER stress after burn via PI3K/Akt signaling. Oral Presentation at the 7th World Congress of Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis – TSIS 2007, Munich, Germany

Gerd Gauglitz, David N Herndon, Gabriela Kulp, Celeste C Finnerty, Marc G Jeschke. Does stress induced insulin resistance and hyperglycemia lead to chronic glucose intolerance in severely burned pediatric patients. Oral Poster at the Surgical Infection Society Toronto, Canada

Zedler S., **Gauglitz G.**, Klein M., Spiegel F., Fuhr J., H. v. Donnersmarck G., Faist E. Functional characterization of cultured cutaneous Keratinocytes removed to the inflammatory site of severely burned patients. Oral Presentation at the American College of Surgeons' 92nd Annual Clinical Congress Meeting. Chicago Illinois, USA

Zedler S., **Gauglitz G.**, Klein M., Spiegel F., Fuhr J., H. v. Donnersmarck G., Faist E. Functional Characterization of cultured cutaneous Keratinocytes removed to the inflammatory site of severely burned patients. Oral Presentation at the 19th European Congress of Surgical Infections of Surgical Infection Society. Europe, Athens, Greece

Gauglitz G., Zedler S., Klein M., Spiegel F., Fuhr J., H. v. Donnersmarck G., Faist E. Histologische und funktionelle Charakterisierung von Keratinozytenkulturen aus dem Läsionsgebiet schwerstverbrannter Patienten 24. Jahrestagung der deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Verbrennungsbehandlung 2006, Mayrhofen, Tirol, Austria

Ersatzdienst

09/98 – 10/99 Zivildienst in der kinderchirurgischen Ambulanz und dem kinderchirurgischen OP in der Kinderklinik an der Lachnerstrasse, München

Tätigkeiten neben dem Studium

02/05 – 04/05 Organisatorische Tätigkeiten und Vorbereitung des 6th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis

09/03 – 10/03 Lehrtätigkeit in dem Fach Anatomie als Co-Assistent im Kursus der Makroskopischen Anatomie (Präparierkurs) an der LMU München

11/00 – 10/02 Werkstudent und Mitarbeiter bei der Bausparkasse „Vereinsbank-Victoria-Bauspar-AG“ (Hypovereinsbank) im Bereich der telefonischen Beratung von Kunden und Vertriebspartnern

11/99 – 09/00 Pflegerische Tätigkeit an der Universitätsklinik Tübingen in der Abteilung für Onkologie/Hämatologie