

Aus dem Institut für Medizinische und Marine
Biotechnologie an der Fraunhofer-Einrichtung für
Marine Biotechnologie und Zelltechnik



Auswirkungen von Gentamicin und Fusidinsäure auf humane Schweißdrüsen-abgeleitete
Stammzellen *in vitro* und auf deren wundheilungsfördernde Eigenschaften in einem
humanen *Ex-vivo*-Modell

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -
vorgelegt von
Inga Maria Brockmann
aus Nachrodt-Wiblingwerde

Lübeck 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Thorns

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2024

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.03.2024

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
2	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>1</i>
3	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>3</i>
4	<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>5</i>
5	<i>Einleitung und Fragestellung</i>	<i>6</i>
5.1	Die Haut	6
5.1.1	Funktionen und Aufbau der Haut	6
5.1.2	Hautdrüsen.....	8
5.2	Kutane Wunden	9
5.2.1	Phasen der kutanen Wundheilung	10
5.2.2	Chronische Wunden	11
5.2.3	Verbrennungen	12
5.3	Wundversorgung	13
5.3.1	Beurteilung der Wunde & Wundversorgung.....	13
5.3.2	Wundauflagen.....	14
5.3.3	Weiterführende chirurgische Interventionen.....	14
5.3.4	Einsatz von natürlich vorkommenden (Stamm-)Zellen in der Wundversorgung.....	15
5.4	Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen	17
5.4.1	Charakterisierung.....	17
5.4.2	Kapazitäten Schweißdrüsen-abgeleiteter Stammzellen in der Wundheilung.....	18
5.5	Keimspektrum chronischer Wunden und antimikrobielle Behandlung	19
5.5.1	Wundinfektionen und Behandlung von Wundinfektionen.....	19
5.5.2	Keimspektrum chronischer Wunden und Verbrennungen	20
5.5.3	Entwicklung der Idee einer antimikrobiellen Prophylaxe	21
5.6	Fragestellung	26
6	<i>Material und Methoden</i>	<i>27</i>
6.1	Material	27
6.1.1	Reagenzien und Chemikalien	27
6.1.2	Kits	28
6.1.3	Verbrauchsmaterial.....	28
6.1.4	Geräte.....	29

6.1.5	Software.....	30
6.1.6	Puffer und Lösungen	31
6.1.7	Medien.....	31
6.1.8	Verwendete Zelllinien	32
6.2	Methoden	32
6.2.1	Auswahl der Zellen.....	32
6.2.2	Zellkultur	33
6.2.3	Medien.....	34
6.2.4	Zellzahlbestimmung am bildbasierten Zytometer für die <i>In-vitro</i> -Versuche.....	34
6.2.5	Zellzahlbestimmung am NucleoCounter® für die <i>Punch-in-a-Punch</i> -Versuche	35
6.2.6	Apoptose-Nekrose-Assay mit Annexin V und Propidiumiodid.....	36
6.2.7	Proliferationsassay.....	37
6.2.8	Impedanzmessung	38
6.2.9	MTT-Assay.....	39
6.2.10	Gewinnung und Kultivierung der Hautstanzen	40
6.2.11	Setzen der inneren Wunde mittels Laser	41
6.2.12	Einsaat von Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen in den inneren <i>Punch</i>	42
6.2.13	Kryokonservierung der Hautstanzen und HE-Färbung von Kryoschnitten.....	42
6.2.14	Bildanalyse der inneren Wunde.....	43
6.2.15	Zytotoxizitäts-Assay.....	44
6.2.16	Statistische Auswertung	45
7	Ergebnisse.....	48
7.1	Antibiotika in klinischer Dosierung	48
7.1.1	Allgemein	48
7.1.2	Morphologie	48
7.1.3	Wachstumskinetiken.....	50
7.1.4	Metabolische Aktivität	51
7.1.5	Impedanzmessungen.....	53
7.1.6	Durchflusszytometrische Analysen	55
7.2	Dosisanpassungen der Antibiotika	58
7.2.1	Gentamicin.....	58
7.2.2	Fusidinsäure.....	61
7.3	<i>Ex-vivo</i>-Wundheilungsmodell.....	64
7.3.1	Vitalität der Stanzen während der Kultivierung.....	65
7.3.2	Mikroskopie-Aufnahmen zur Verlaufskontrolle der Wundheilung	67
7.3.3	Auswertung der HE-Schnitte.....	69

8	<i>Diskussion</i>	73
8.1	Einfluss der Antibiotika Gentamicin und Fusidinsäure <i>in vitro</i>	73
8.2	Gentamicin	73
8.2.1	Klinische Dosierung	73
8.2.2	Dosisanpassung von Gentamicin.....	79
8.3	Fusidinsäure	81
8.3.1	Klinische Dosierung	81
8.3.2	Dosisanpassung von Fusidinsäure	83
8.4	Antibiotika und Stammzellen in einem <i>Ex-vivo</i>-Hautmodell	83
9	<i>Zusammenfassung</i>	90
10	<i>Literaturverzeichnis</i>	91
11	<i>Anhang</i>	<i>i</i>
12	<i>Danksagung</i>	<i>xxi</i>
13	<i>Lebenslauf</i>	<i>xxii</i>

2 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ASC	<i>adipose tissue-derived stem cell</i>
BM-MSC	<i>bone marrow-derived mesenchymal stem cell</i>
CEA	<i>Cultured-Epidermal-Autograft</i>
CI	<i>cell index</i>
DMEM.....	Kontrollmedium/Standard-Zellkulturmedium
DMEM (1X)	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium (1X)</i>
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli.....	Escherichia coli
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
Epi-SC	<i>epidermal stem cell</i>
FITC.....	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Gentamicin.....	Gentamicinsulfat
Hf-SC.....	<i>hair follicle stem cell</i>
HIF1a	Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha
hSGSC	<i>human sweat gland stroma-derived stem cell</i>
IE	internationale Einheiten
INT.....	2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid
LAMB3.....	<i>Laminin Subunit beta 3</i>
LDH.....	Laktatdehydrogenase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MSC.....	<i>mesenchymal stem cell</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD.....	Nicotinamidadenindinukleotid
pAVK.....	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate-buffered Saline</i>
Pen/Strep.....	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumiodid

Abkürzungsverzeichnis

S. aureus.....	Staphylococcus aureus
UC-MSC.....	<i>umbilical cord-derived stem cell</i>
vWF.....	von-Willebrand-Faktor
WEM.....	<i>William's Medium E (IX)</i>
WEM-Medium.....	Kulturmedium Hautstanzen

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aufgaben der Haut.....	6
Abbildung 2: Aufbau der Haut	7
Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahme einer Hautstanze aus dem Gesichtsbereich (Querschnitt).....	8
Abbildung 4: Ablauf <i>Punch-in-a-Punch-ex-vivo</i> -Wundheilungsmodell.....	40
Abbildung 5: Parameter der <i>Punch-in-a-Punch</i> -Bildanalyse der HE-Schnitte	44
Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen der hSGSC 36 (klinische Dosierungen)..	49
Abbildung 7: Wachstumskinetiken der hSGSCs (klinische Dosierungen)	51
Abbildung 8: Metabolische Aktivität der hSGSCs (klinische Dosierungen)	52
Abbildung 9: Impedanzmessungen der hSGSCs (klinischen Dosierungen)	54
Abbildung 10: Mittlere Fluoreszenzintensität Proliferationsassay über neun Tage	56
Abbildung 11: Vitalitätsassay Annexin V und PI (klinische Dosierung).....	57
Abbildung 12: Wachstumskinetiken hSGSC 14 (Dosisanpassung Gentamicin)	59
Abbildung 13: Impedanzmessung hSGSC 14 (Dosisanpassung Gentamicin)	61
Abbildung 14: Wachstumskinetiken hSGSC 14 (Dosisanpassung Fusidinsäure).....	62
Abbildung 15: Impedanzmessungen hSGSC 14 (Dosisanpassung Fusidinsäure).....	64
Abbildung 16: Ergebnisse der LDH-Assays (<i>Punch-in-a-Punch</i>)	66
Abbildung 17: Aufnahmen am Auflichtmikroskop (<i>Punch-in-a-Punch</i>).....	68
Abbildung 18: Wunddurchmesser (<i>Punch-in-a-Punch</i>).....	69
Abbildung 19: Zungenlänge (<i>Punch-in-a-Punch</i>).....	70
Abbildung 20: Zungenfläche & Residuale Wundfläche (<i>Punch-in-a-Punch</i>)	72
Abbildung 21: Genehmigung Ethikantrag — Aktenzeichen 06-109	iv
Abbildung 22: Genehmigung erstes Amendment Ethikantrag — Aktenzeichen 06-109	v
Abbildung 23: Genehmigung zweites Amendment Ethikantrag — Aktenzeichen 06-109..	vi
Abbildung 24: Datengrundlage Zellzahlbestimmungen (klinische Dosierung)	vii
Abbildung 25: Statistische Grundlagen Gentamicin Hypothese 1a (Proliferation)	viii
Abbildung 26: Statistische Grundlagen Fusidinsäure Hypothese 1a (Proliferation).....	ix
Abbildung 27: Datengrundlage MTT (klinische Dosierung)	x
Abbildung 28: Statistische Grundlagen Gentamicin Hypothese 1b (MTT).....	xi
Abbildung 29: Statistische Grundlagen Fusidinsäure Hypothese 1b (MTT)	xii
Abbildung 30: Datengrundlage Impedanzmessungen (klinische Dosierung)	xiii
Abbildung 31: <i>Repeated-Measurement</i> -Korrelationen für Hypothese 2a & 2b.....	xiv

Abbildung 32: Statistische Grundlagen der Zellzahlbestimmung Gentamicin & Fusidinsäure
Hypothese 3 (Dosisanpassungen) xv

Abbildung 33: Boxplots Gentamicin & Fusidinsäure Hypothese 4 (Dosisanpassungen) .. xvi

4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einsaatdichten der hSGSCs für die unterschiedlichen Versuche	34
Tabelle 2: Verbrennungsgrade und ihre Charakteristika	i
Tabelle 3: Übersicht natürlich vorkommender Zellen zur Zelltherapie	ii
Tabelle 4: Zellzahlbestimmungen im Rahmen des Zellproliferationsassay via Durchflusszytometrie.....	xvii
Tabelle 5: Daten LDH-Bestimmung <i>Punch-in-a-Punch</i> -Versuche.....	xvii
Tabelle 6: Daten der <i>Punch-in-a-Punch</i> -Wundheilungsversuche	xviii
Tabelle 7: Normalisierte Daten der <i>Punch-in-a-Punch</i> -Wundheilungsversuche	xx

5 Einleitung und Fragestellung

5.1 Die Haut

5.1.1 Funktionen und Aufbau der Haut

Die Haut erfüllt umfassende Barriere- und somit Schutzfunktionen. Diese sind in Abbildung 1 dargestellt (Abb. 1) (Singer und Clark 1999, Abdo et al. 2020).

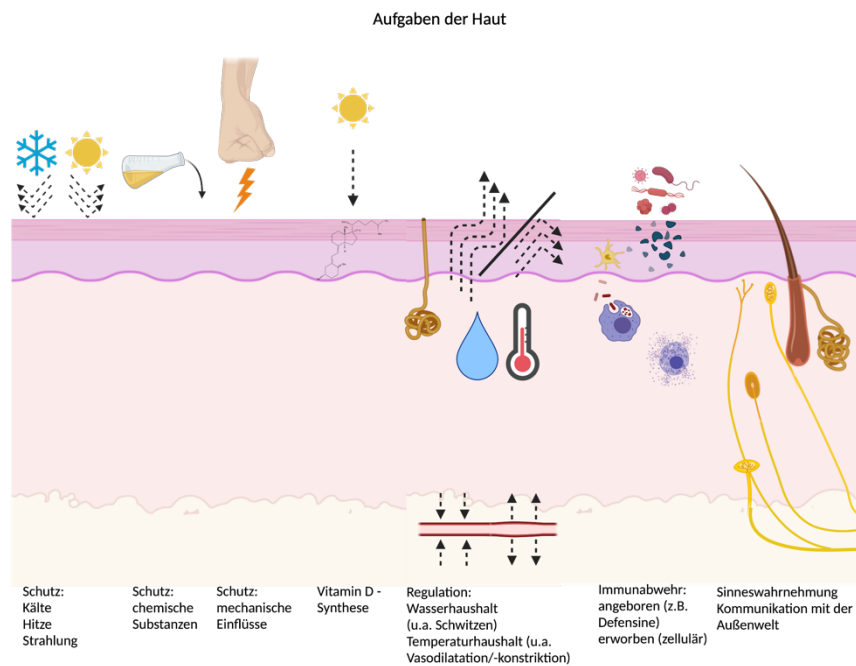


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aufgaben der Haut

Die Aufgaben der Haut umfassen den Schutz des Körpers vor thermischen, chemischen und mechanischen Einflüssen. Außerdem erfolgt ein Anteil der Vitamin-D-Synthese und die Regulation des Wasser- und Temperaturhaushaltes über die Haut. Sinneswahrnehmung und Immunabwehr stellen ein weiteres Aufgabengebiet der Haut dar (Abdo et al. 2020). Daneben können ebenfalls Wirkstoffe über die Haut aufgenommen werden (Abbildung erstellt mit Biorender.com).

Die Anordnung der Zellen in der Epidermis spiegelt die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Keratinozyten wider (Abb. 2b/c). Im innersten Stratum basale befinden sich Stamm- und Vorläuferzellen der Keratinozyten auf einer Basalmembran. Des Weiteren liegen hier auch Melanozyten, die für die Hautpigmentierung verantwortlich sind. Sie produzieren Melanin, das an die Keratinozyten abgegeben wird.

In den folgenden Schichten zur Außenwelt differenzieren die Keratinozyten und verhornen. Dem Stratum basale schließen sich das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und in der Leistenhaut zusätzlich das Stratum lucidum, an (Abb. 2b/c). Das Stratum corneum bildet

die abschließende Schicht, an der verhornte Zellen abgeschilfert werden.

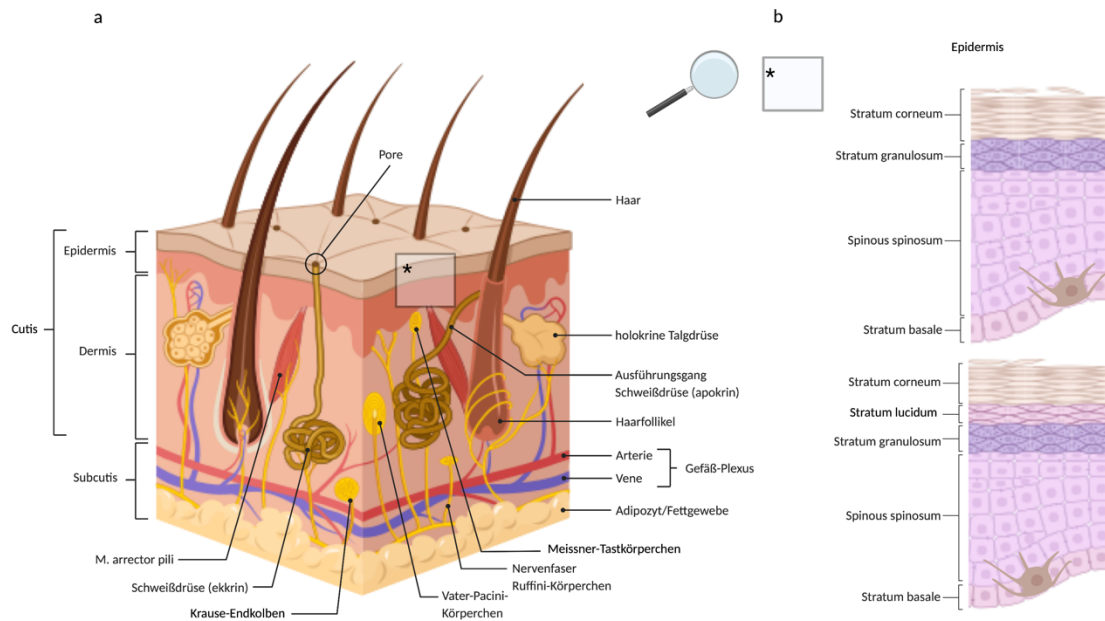


Abbildung 2: Aufbau der Haut

Die Schichten der Haut mit ihren Anhangsgebilden sind in der Abbildung 2a zu sehen. Die zur Umwelt gelegene Schicht ist die Epidermis, die aus einem mehrschichtig verhornendem Plattenepithel besteht, gefolgt von der Dermis, einer kollagenreichen Schicht mit versorgenden Gefäßen für die Epidermis und zahlreichen Hautanhangsorganen, wie zum Beispiel Haaren und Schweißdrüsen. In der Detailansicht rechts (Abb. 2b/c) ist der mikroskopische Aufbau der Epidermis von Leisten- und Felderhaut zu sehen. Die behaarte Felderhaut (Abb. 2b) bedeckt den Großteil des Körpers, während die Leistenhaut (Abb. 2c) an Handflächen und Fußsohlen zu finden ist (Abbildung erstellt mit BioRender.com).

Weitere Zellen in der Epidermis sind die Langerhans- und Merkel-Zellen. Die Langerhans-Zellen befinden sich vor allem im Stratum spinosum. Es handelt sich um antigenpräsentierende Zellen, die nach Antigenaufnahme in lymphatische Gewebe wandern und dort T-Lymphozyten aktivieren. In der Epidermis befinden sich ebenfalls vereinzelt Lymphozyten. Bei den Merkel-Zellen handelt es sich um Mechano-Druck-Rezeptoren.

Die Dermis besteht aus Stratum reticulare und Stratum papillare. Erstere stellt die tiefe, kollagenreiche Schicht dar, während Letztere die Verknüpfung mit der Epidermis an der dermo-epidermalen Junctionszone bildet. Im Stratum papillare verlaufen Blutgefäße und zudem kann es Meißner-Tastkörper enthalten.

Unterhalb der Dermis liegt die Subkutis. Diese besteht vor allem aus Bindegewebssepten und Bau- beziehungsweise Depotfett. Außerdem enthält sie Blutgefäße, Nerven und Endstücke der Schweißdrüsen. Auch die Vater-Pacini-Körperchen, die Mechanorezeptoren darstellen, sind dort zu finden (Welsch und Deller 2010, Abdo et al. 2020).

5.1.2 Hautdrüsen

Zu den Hautanhangsgebilden des Menschen zählen Haare, Nägel und die Hautdrüsen (Abb. 3) (Welsch und Deller 2010). In diesem Abschnitt erfolgt eine kurze Übersicht über die Schweißdrüsen als Fraktion der Hautdrüsen. Im menschlichen Körper existieren drei verschiedene Arten von Schweißdrüsen: ekkrine, apokrine und apoekkrine Schweißdrüsen (Kobiela et al. 2015).

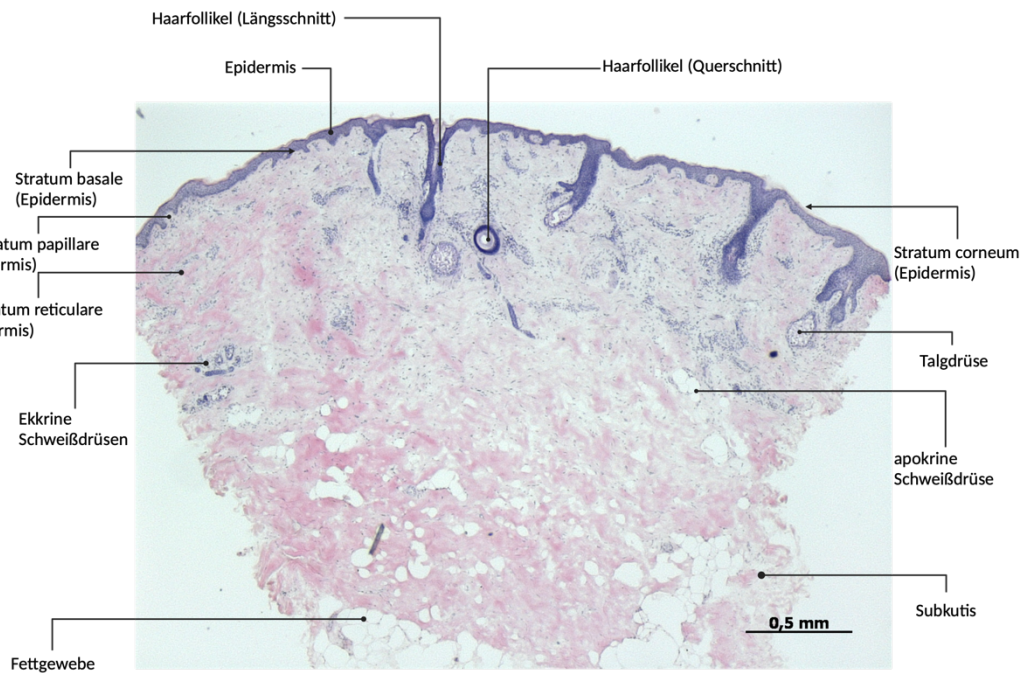


Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahme einer Hautstanze aus dem Gesichtsbereich (Querschnitt)
 Am Bildoberrand ist das mehrschichtig verhornende Plattenepithel der Epidermis identifizierbar. Die verhornte Schicht ist als hell-rosafarbenes Band auf den violett eingefärbten Keratinozyten vor der Verhornung zu sehen. Das Stratum basale ist als etwas dunkleres Band in Abgrenzung zum Stratum papillare der Dermis zu erkennen. Danach folgt das Stratum papillare der Dermis und die Subkutis mit teils ausgelösten Adipozyten. Des Weiteren sind Anhangsgebilde der Haut angeschnitten. Es finden sich Haare, Talgdrüsen, ekkrine Schweißdrüsen und apokrine Drüsen in diesem Hautschnitt (HE-Färbung, Aufnahme mit 50-facher Vergrößerung, Maßstab 0,5 mm, Abbildung beschriftet mit Biorender.com).

Ekkrine Schweißdrüsen (Abb. 3) sind sehr zahlreich und existieren unabhängig von Haaren in hoher Dichte an Händen, Füßen und der Stirn (Welsch und Deller 2010, Cui und Schlessinger 2015). Ekkrine Schweißdrüsen stellen den höchsten Anteil von Hautanhangsgebilden (Rittié et al. 2013). Sie sind sowohl am thermischen und emotionalen als auch am gustatorischen Schwitzen beteiligt. Das thermische Schwitzen dient der Regulation der Körpertemperatur mittels Verdunstung. Diese Form des Schwitzens geschieht am ganzen Körper (Welsch und Deller 2010, Cui und Schlessinger 2015). Emotionales Schwitzen erfolgt vor allem an Händen und Füßen. Das gustatorische Schwitzen indes findet im Kontexte der Nahrungsaufnahme im Gesichtsbereich statt (Cui

und Schlessinger 2015). Des Weiteren sind die ekkrinen Schweißdrüsen am Ausgleich des Flüssigkeitshaushaltes der Haut und der Immunabwehr beteiligt (Cui und Schlessinger 2015). Apokrine Schweißdrüsen werden auch als apokrine Duftdrüsen bezeichnet und befinden sich in Assoziation zu Haaren, in den Achselhöhlen, den Leistenbeugen, um den After und im Genitalbereich (Abb. 3). Die apokrinen Drüsen sezernieren ein öliges Sekret und Duftstoffe, die eine Rolle bei der olfaktorischen Kommunikation spielen (Kobiela et al. 2015). Apokrine Schweißdrüsen befinden sich in den gleichen anatomischen Bereichen wie die ekkrinen Drüsen und bilden ein eher wässriges Sekret, das dem der ekkrinen Schweißdrüsen ähnelt (Kobiela et al. 2015). Holokrine Talgdrüsen münden meistens in einen Haartrichter und sind Teil der Haartalgdrüseneinheit (Abb. 3) (Welsch und Deller 2010, Marks und Miller 2019). Sie kommen außer an den Hand- und Fußflächen ubiquitär vor und produzieren das Sebum, das Sekret der Talgdrüse, welches in den Haartrichter sezerniert wird und den Lipidfilm der Haut bildet (Welsch und Deller 2010, Marks und Miller 2019).

Schweißdrüsen und holokrine Talgdrüsen, beziehungsweise die Haartalgdrüseneinheit, tragen außerdem in einem erheblichen Maße zur epithelialen Regeneration nach epidermalen Verletzungen bei (Rittié et al. 2013). Oberhalb der Drüsen bilden sich Epithel-Inseln aus, die abschließend verschmelzen (Rittié et al. 2013).

5.2 Kutane Wunden

Im Allgemeinen stellen Wunden einen Integritätsverlust von Schleimhäuten, der Haut oder Organen dar (Kujath und Michelsen 2008).

Es gibt verschiedene Ursachen für kutane Wunden. Dazu gehören äußere Gewalteinwirkungen wie mechanische Gewalt, chemische Noxen, thermische Einflüsse oder Strahlung (Kujath und Michelsen 2008). Ebenfalls von Bedeutung sind Wunden, die auf einer Grunderkrankung des Patienten oder der Patientin beruhen. Eine besonders große Rolle spielen Gefäßkrankheiten (chronisch venöse Insuffizienz, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)), Diabetes mellitus aber auch immunologische und dermatologische Krankheiten (Kujath und Michelsen 2008).

5.2.1 Phasen der kutanen Wundheilung

Die Wundheilung kann in mehrere Phasen unterteilt werden. Diese verlaufen nicht sequenziell, sondern parallel zueinander ab (Singer und Clark 1999).

Die exsudative Phase setzt direkt nach der Verletzung ein. Blutstillung und Blutgerinnung sind ein Teil dieser Phase. Die nach einer Verletzung einsetzende Inflammation wird durch zahlreiche Mediatoren und Zytokine sowie Interaktionen mit freiliegenden Oberflächen vermittelt. Aber auch Vasodilatation mit Austritt von Blutbestandteilen und Lymphe sowie die konsekutive Auswanderung von Leukozyten aus dem Plasma in das umgebende Gewebe vollziehen sich in dieser Phase. Diese Zellen sorgen während der Resorptionsphase für die Phagozytose, beispielsweise von Zelldetritus oder Fremdstoffen, sowie ein antimikrobielles Wundmilieu. Diese erste Phase spielt sich etwa innerhalb der ersten drei Tage nach der Verletzung ab (Singer und Clark 1999, Scheithauer und Riechelmann 2003, Kujath und Michelsen 2008, Aust et al. 2011).

Während der sich anschließenden Proliferations- oder Granulationsphase werden neue Blutgefäße gebildet und der Defekt wird mit Granulationsgewebe gefüllt. Das Granulationsgewebe wird von Fibroblasten, Makrophagen, Keratinozyten und Angioblasten gebildet. Die Einwanderung von Zellen durch Chemotaxis erfolgt zwischen dem dritten und dem siebten Tag nach der Schädigung. Während dieser Phase ist das entstehende Gewebe sehr vulnerabel (Singer und Clark 1999, Scheithauer und Riechelmann 2003, Kujath und Michelsen 2008, Aust et al. 2011).

Die Regenerations- und Remodellierungsphase umfasst die Bildung von Narbengewebe, Wundkontraktion und Re-Epithelisierung. Das Narbengewebe wird im Laufe der Zeit mit Reifung der gebildeten Kollagenfasern reißfester, erreicht allerdings nur eine Zugfestigkeit von etwa 70 % des Ausgangsgewebes (Han und Ceilley 2017). Die Remodellierungsphase kann sich über den Zeitraum von einem Jahr erstrecken.

Oberflächliche Schürfwunden, keimfreie und primär heilende Wunden können ohne sichtbare Narbe abheilen. Bei tieferen oder kontaminierten Wunden erfolgt ein Ersatz durch Granulationsgewebe und mittels Kontraktion. Dies spiegelt sich in Narbenbildungen wider. Hautanhangsgebilde können vom Körper nicht ersetzt werden. Auch Melanozyten wandern nicht erneut in das Gewebe ein. Daher bleibt das Narbengewebe heller (Singer und Clark 1999, Scheithauer und Riechelmann 2003, Kujath und Michelsen 2008, Aust et al. 2011).

Wenn der Ablauf der Wundheilung gestört ist, was häufig durch Grunderkrankungen begünstigt wird, können chronische Wunden entstehen (Aust et al. 2011, Han und Ceilley 2017). Ein gestörter Übergang von Inflammation zu Proliferation scheint hier eine Schlüsselrolle zu spielen. In diesem Zusammenhang stehen unter anderem die Beobachtungen, dass Makrophagen nicht vom pro-inflammatorischen Phänotyp (M1) zu dem anti-inflammatorischen Phänotyp (M2) wechseln und dass eine Dysbalance bei den eingewanderten T-Zellen vorliegt (Loots et al. 1998, Sindrilaru et al. 2011). Des Weiteren werden eine andere Zusammensetzung der extrazellulären Matrix sowie unterschiedliche Enzymaktivitäten beobachtet (Loots et al. 1998, Hyldig et al. 2017).

5.2.2 Chronische Wunden

Es existiert keine einheitliche Definition des Begriffes der chronischen Wunde, was wiederum eine eindeutige Kommunikation und die Vergleichbarkeit von Studien erschwert (Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. 2012, Klein et al. 2013, Kyaw et al. 2018).

In der S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. zur „Lokaltherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz“ wird eine chronische Wunde „als Integritätsverlust der Haut und einer oder mehrerer darunter liegenden Strukturen mit einer fehlenden Abheilung innerhalb von acht Wochen“ definiert (Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. 2012). Allerdings werden in dieser Definition auch nur die oben bereits genannten Grunderkrankungen berücksichtigt. Die häusliche Krankenpflegerichtlinie definiert eine Wunde, die „nicht komplikationslos innerhalb von maximal 12 Wochen unter fachgerechter Therapie“ abheilt als „chronisch“ beziehungsweise „schwer heilend“ (Hecken 2019).

Die Ätiologie chronischer Wunden ist vielfältig und eine Zuordnung kann in sechs Kategorien erfolgen: Gefäßsystem (z.B. chronisch venöse Insuffizienz, pAVK), Inflammation (z.B. Pyoderma gangrenosum), Tumore und Hämatologie (z.B. Hauttumoren, Thalassämien), physikalische Einflüsse (z.B. Dekubiti, neuropathische Ulzera, Verbrennungen), Infektionen (z.B. bakterielle Infektionen), sonstige (z.B. Lichen ruber, Selbstschädigung) (Aust et al. 2011).

In Deutschland wurde basierend auf den Daten einer Krankenkasse eine Studie zu Wundpatient*innen angefertigt. Die Anzahl an Wundpatient*innen wurde auf 2,7 Millionen

Menschen hochgerechnet, wobei hiervon ein Drittel (etwa 890.000 Patient*innen) eine chronische Wunde entwickelte (> 8 Wochen Wundbehandlung). Die Studie verzeichnete Ulcus cruris (39 %), posttraumatische Wunden (21 %), diabetisches Fußsyndrom (13 %) und Dekubiti (11 %) als häufigste Wundursachen. Eine Chronifizierung innerhalb dieser Gruppen trat bei Dekubiti (52 %), diabetischem Fußsyndrom (50 %) und Ulcus cruris (37 %) besonders häufig auf. Die Prävalenz für eine chronische Wunde stieg ab dem 60. Lebensjahr deutlich an (Köster und Schubert 2015).

Die Sachkosten der gesetzlichen Krankenkassen für die Versorgung von Wundpatient*innen mit einem Dekubitus, Ulcus cruris oder diabetischem Fußulkus belaufen sich auf etwa drei Milliarden Euro pro Jahr (Horch et al. 2008). Die Therapiekosten insgesamt werden mit fünf bis acht Milliarden Euro betitelt. Dies stellt eine beträchtliche ökonomische Belastung dar (Klein et al. 2013).

5.2.3 Verbrennungen

Die Verbrennung ist per Definition eine Gewebsschädigung durch eine thermische Verletzung, wobei Verletzungen durch chemische Substanzen, wie z.B. Säuren und Laugen, ähnliche Charakteristika aufweisen (Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin (DGV) 2021). Drei Prozent aller Wundpatient*innen wiesen eine Verbrennungsverletzung auf. Bei 18 % aller Patient*innen mit Verbrennungsverletzungen zeigte sich ein chronischer Verlauf (Köster und Schubert 2015). Schwere Verbrennungen weisen eine Inzidenz von 1/50.000–1/60.000 Einwohner pro Jahr auf (Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin (DGV) 2021).

Verbrennungen werden je nach Tiefe und somit den geschädigten Schichten in verschiedene Grade klassifiziert (Tabelle 2 im Anhang) (Spanholtz et al. 2009, Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin (DGV) 2021). Sie bilden bezogen auf die Tiefe sowie Ausdehnung der Verletzung und damit auch auf die Abheilung eine sehr heterogene Gruppe. Ab dem zweiten Grad (2b) benötigen Verbrennungen chirurgische Interventionen wie zum Beispiel Nekroseabtragungen und Hauttransplantationen. Durch die Ausmaße der Schädigung kann die definitive Versorgung (beispielsweise durch autologe Hauttransplantationen) allerdings erschwert sein (Ronfard et al. 2000).

5.3 Wundversorgung

5.3.1 Beurteilung der Wunde & Wundversorgung

Für eine optimale Wundversorgung ist eine umfassende Beurteilung der (chronischen) Wunde grundlegend. Die Beurteilung sollte den Patienten oder die Patientin ganzheitlich berücksichtigen (Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. 2012). Ein individueller Behandlungsplan kann von einer Palliation mit stabilen Wundverhältnissen und Symptomkontrolle bis zu einer definitiven Versorgung und Abheilung der Wunde, teils mit Interventionen, reichen (Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. 2012). Die ausgewählten Materialien und Therapien werden auf die Wundheilungsphase und die Patientin oder den Patienten abgestimmt. Während der Dauer der Behandlung sollte eine Wunddokumentation geführt werden. So kann eine regelmäßige Re-Evaluation der Wunde, gegebenenfalls auch durch wechselnde Behandler, sowie der Nachweis der Leistungserbringung und Qualitätssicherung erfolgen (Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. 2012).

Das Wunddébridement und Entfernen von abgestorbenem Gewebe stellen einen ersten Schritt in der Wundbehandlung dar. Auf diese Weise bleibt vitales und proliferationsfähiges Gewebe erhalten, während das abgestorbene Gewebe und gegebenenfalls auch Verschmutzungen als mögliche Nährböden für pathogene Keime eliminiert werden (Han und Ceilley 2017). Durch das Wunddébridement soll außerdem ein Verharren in der inflammatorischen Phase verhindert und eine Transformation hin zu einer akuten Wunde gefördert werden. Dies soll ein erneutes Eintreten in den Zyklus der Wundheilung ermöglichen (Klein et al. 2013). Die Säuberung der Wunde kann dabei autolytisch, mechanisch, enzymatisch oder auch biologisch erfolgen (Klein et al. 2013, Han und Ceilley 2017). Die biochemischen Prozesse der Autolyse finden während der Wundheilung in einem feuchten Milieu statt, was die Notwendigkeit eines ausgeglichenen Feuchtigkeitshaushaltes erklärt (Klein et al. 2013). Das mechanische Débridement erfolgt chirurgisch, gegebenenfalls auch mit Narkoseverfahren (Klein et al. 2013). Für die enzymatische Säuberung der Wunde können bestimmte Produkte, die zum Beispiel Streptokinase (ein Fibrinolytikum) und Streptodornase (spaltet Desoxyribonukleinsäure-Moleküle (DNS)) enthalten, verwendet werden (Klein et al. 2013). Maden bilden schlussendlich eine biologische Möglichkeit der Wundsäuberung (Klein et al. 2013). Im Hinblick auf die Wundsäuberung sollte die Methodenauswahl in Zusammenschau aller Befunde erfolgen.

Dabei gilt, dass unter Umständen eine Kombination verschiedener Methoden in Betracht zu ziehen ist (Klein et al. 2013). Anschließend applizierte Wundauflagen schützen die Wunde unter anderem vor mechanischen, chemischen und mikrobiologischen Einflüssen (Aust 2011, Han und Ceilley 2017).

5.3.2 Wundauflagen

Es gibt eine Vielzahl an Wundauflagen auf dem Markt. Diese können in passive und aktive Wundauflagen unterteilt werden. Passive Wundauflagen besitzen eine hohe Saugkraft und decken die Wunde ab (Aust 2011, Han und Ceilley 2017).

Die Charakteristika von aktiven Wundauflagen sind umfangreicher. Sie sorgen je nach Material für ein feuchtes Wundmilieu, das Zellmigration, Zellproliferation und Zelldifferenzierung erleichtert, während zugleich Neovaskularisation und autolytisches Débridement gefördert werden. Schlussendlich muss auch eine aktive Wundauflage die entstehenden Wundflüssigkeiten aufnehmen (Aust 2011).

Als spezielle Methode sei noch die Vakuumtherapie genannt. Hierbei wird nach einem gründlichen Wunddébridement ein offenporiger Schwamm für die Wunde angepasst und anschließend mit einer keimdichten Folie verklebt. Eine Pumpe erzeugt im Anschluss einen negativen Druck auf die abgedeckte Wunde, was eine Ödemreduktion, Angiogenese und die Bildung von Granulationsgewebe unterstützt. Die Verbandswechsel erfolgen alle zwei bis vier Tage. Nach Abschluss der Therapie kann entweder eine Re-Epithelisierung des Areals oder eine chirurgische Intervention mit plastischer Deckung erfolgen (Aust 2011, Han und Ceilley 2017).

5.3.3 Weiterführende chirurgische Interventionen

Zur Deckung von Hautdefekten wird Patient*innen, falls möglich, eigene Haut transplantiert. Die Hauttransplantation kann als Spalthauttransplantat oder Vollhauttransplantat auf unterschiedlichen Wegen durchgeführt werden. Ein freies Transplantat wird entnommen und ohne vaskulären Anschluss transplantiert wobei die Versorgung bis zur Neovaskularisierung durch Diffusion erfolgt (Weyand 2011a). Ein Spalthauttransplantat besteht aus Epidermis und Stratum reticulare der Dermis. Durch die geringe Diffusionsstrecke nach der Transplantation wächst es meist gut an. Ein Vollhauttransplantat hingegen besteht aus Epidermis und vollständiger Dermis. Durch die höhere Dicke ist das Anwachsen an der Empfängerstelle erschwert. Die Entnahme von Spalthaut kann an unterschiedlichen Körperstellen erfolgen. Dabei gilt, dass kosmetische

Aspekte Beachtung finden. Das Abdecken eines größeren Areals wird aufgrund einer Ausdehnung durch die sogenannte *Mesh*-Technik möglich (Weyand 2011a, Brockmann et al. 2018). Eine erneute Entnahme von Spalthaut ist nach Re-Epithelisierung einer Spenderstelle wieder möglich (Weyand 2011a). Je nach Lokalisation, beispielsweise im Gesicht, oder Defekttiefe ist eine aufwendigere Rekonstruktion durch unterschiedlichste Lappenplastiken ebenfalls eine Option (Weyand 2011b).

5.3.4 Einsatz von natürlich vorkommenden (Stamm-)Zellen in der Wundversorgung

Da Patient*innen mit großflächigen Wunden (z.B. nach Verbrennungen) nur eine begrenzte Spenderoberfläche bieten, wurde eine Alternative zu den herkömmlichen Mitteln chirurgischer Interventionen gesucht. Im Jahr 1975 ließen sich erstmalig Keratinozyten als Epidermis-ähnlicher Verbund *in vitro* kultivieren (Rheinwald und Green 1975).

Erste Transplantationen von diesen sogenannten *Cultured-Epidermal-Autografts* (CEAs) wurden 1980 bei zwei Verbrennungspatienten durchgeführt (O'Connor et al. 1981). Im Laufe der Jahre folgten weitere Anwendungen bei großen Wundflächen beziehungsweise chronischen Wunden. Außerdem erfolgte die Entwicklung unterschiedlicher Produkte, beispielsweise Sprays mit Stammzellen als Alternative eines Zellverbundes (Gravante et al. 2007, Brockmann et al. 2018, Kaur et al. 2019). Des Weiteren wurden neben epidermalen Stammzellen andere Zellen bezüglich ihrer wundheilungsfördernden Kapazitäten untersucht (Kaur et al. 2019, Sierra-Sanchez et al. 2021). Fibroblasten beispielsweise fördern die Wundheilung durch Sekretion von Botenstoffen und Synthese von Kollagenen und Glykosaminoglykanen (Han und Ceilley 2017). Als mögliche Nebenwirkungen werden Abstoßungsreaktionen sowie Überempfindlichkeitsreaktionen diskutiert, jedoch bisher nicht beschrieben (Han und Ceilley 2017). Neben den Keratinozyten und Fibroblasten, die sich aus Hautproben isolieren lassen und bereits klinisch zum Einsatz kamen, wurde auch die Nutzung mesenchymaler Stammzellen (*mesenchymal stem cell* — MSC) für Wundheilungsprozesse untersucht (Kaur et al. 2019, Sierra-Sanchez et al. 2021). MSCs fördern die Wundheilung und Geweberegeneration in erster Linie durch parakrine Faktoren (Lopes et al. 2021, Sierra-Sanchez et al. 2021).

Als Weiterentwicklung zu den Produkten mit einer Zellart wurden Kombinationsprodukte entwickelt. Hier sind sowohl Kombinationen von Stamm- oder Vorläuferzellen mit Matrices zu nennen als auch die Kombination verschiedener Zell-Entitäten. So wurden beispielweise Fibroblasten von Neugeborenen in einer Matrix zur Unterstützung der Wundheilung

chronischer Wunden transplantiert (Phillips et al. 2002, Ichim et al. 2018). Eine Kombination von kultivierten Keratinozyten mit Fibroblasten in einer Rinderkollagenmatrix als sogenanntes *Bilayered-Skin-Substitute* erbrachte ebenfalls schon positive Resultate bei chronischen Wunden (Han und Ceilley 2017). Die Herstellung eines *Trilayered-Skin-Substitutes* soll durch den bisher fehlenden Ersatz der Subkutis eine höhere Plastizität der Transplantate gewährleisten und somit den Nachteil der geringen Plastizität aktuell geläufiger Transplantate negieren. Für ein solches Transplantat wurden beispielsweise Keratinozyten, Fibroblasten und Stammzellen aus Fettgewebe (*adipose tissue-derived stem cell* — ASC) oder Stammzellen aus dem Knochenmark (*bone marrow-derived mesenchymal stem cell* — BM-MSK) in Kombination mit einem Hydrogel genutzt, wobei hier auch die fehlende Blutversorgung des Transplantates zu beachten ist (Trottier et al. 2008, Monfort et al. 2013, Kober et al. 2015). Dieses Verfahren befindet sich allerdings noch nicht im Stadium der klinischen Anwendung.

Auch genetische Therapien fanden bereits Einzug in das Feld der Wundbehandlung. Transplantationen von genetisch modifizierten CEAs fanden im Jahr 2006 bei einem Epidermolysis-bullosa-junctionalis-Patienten statt. Mit einem retroviralen Vektor wurde zuvor komplementär DNS von *Laminin Subunit beta 3* (LAMB3) in die isolierten Keratinozyten integriert. LAMB3 ist ein Laminin, das zu den Proteinen der Basalmembran gehört. Dieses Vorgehen führte zu einer funktionalen und adhärenenten Epidermis nach der Transplantation. Eine solche Hauttransplantation wurde erneut 2017 bei einem pädiatrischen Patienten durchgeführt (Hirsch et al. 2017). Es wurden etwa 80% seiner Körperoberfläche transplantiert (Hirsch et al. 2017). In einer Kontrolluntersuchung nach über fünf Jahren zeigte sich eine stabile genetisch veränderte Epidermis an den Transplantationsstellen und der Junge hatte ein altersgerechtes Sozialleben (Kueckelhaus et al. 2021). Bei anderen Patienten ergaben sich auch 15 Jahre später stabile Wundverhältnisse, jedoch waren die Transplantationsbereiche nicht so umfangreich (Kueckelhaus et al. 2021).

Als erhebliche Nachteile der Zell-basierten Produkte werden die hohen Kosten genannt (Han und Ceilley 2017, Brockmann et al. 2018). Im Hinblick auf die Behandlungskosten lassen sich in der Literatur unterschiedliche Angaben finden. So werden beispielsweise Kosten für einen definitiven autologen Wundverschluss einer Verbrennungswunde (1 cm²) auf ca. 6.520 US-Dollar (Kinder) und ca. 13.000 US-Dollar (Erwachsene) beziffert (Meuli und Raghunath 1997). Eine Differenz von etwa 1.000 US-Dollar wurde bei Betrachtung der Behandlungstagesätze von Patient*innen mit einer herkömmlichen Hauttransplantation

(~3.500 US-Dollar) mit denen einer CEA-Versorgung (~4.500 US-Dollar) beschrieben (Meuli und Raghunath 1997). In Bezug auf chronische Wunden sind Kosten-Nutzen-Analysen aufgrund mehrerer Faktoren erschwert. Hierzu zählen beispielsweise inkonsistente Studiendesigns, fehlende Angaben zu Materialkosten und Unterschiede in den Gesundheitssystemen (Langer und Rogowski 2009). Für bestimmte Patient*innengruppen mit therapierefraktären Wunden wird ein positives Kosten-Nutzenverhältnis vermutet, da sich die initial hohen Kosten der Zelltherapie durch Einsparungen im Behandlungsverlauf ausgleichen (Langer und Rogowski 2009). Als Beispiel für Transplantatkosten sei hier Epidex® erwähnt (autologes CEA). Ein Epidex®-Transplantat (scheibenförmig, Durchmesser ~1 cm) kostete etwa 480 US-Dollar. Laut Literaturangaben war pro Wundbehandlung die Nutzung von sechs bis zwölf Epidex®-Transplantaten erforderlich (Brockmann et al. 2018). Im Laufe der Zeit gab es zahlreiche Anbieter regenerativer Hautprodukte. Aufgrund eines fehlenden Massenmarktes fand jedoch eine Konsolidierung am Markt statt (Brockmann et al. 2018).

Die bislang unzureichende Rekonstruktion von Hautanhangsgebilden und eine eingeschränkte Plastizität, die mit kosmetischen und funktionalen Problemen einhergeht, stellen eine weitere Herausforderung bisher erprobter Zelltherapien dar.

Eine Übersicht über (prä-)klinisch bereits genutzte Zelltypen in der Wundversorgung beziehungsweise deren Kombinationen findet sich in Tabelle 3 (Anhang).

5.4 Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen

5.4.1 Charakterisierung

Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen (*human sweat gland stroma-derived stem cell* — hSGSC) lassen sich aus adultem Schweißdrüsengewebe isolieren. Da der Axillarbereich eine hohe Dichte an Schweißdrüsen aufweist, wird dieser häufig als Isolationsort genutzt. Die Isolation erfolgt durch mechanische und enzymatische Präparationen des Gewebes. Anschließend werden einzelne Schweißdrüsen angefärbt und in einer kollagenbeschichteten Petrischale immobilisiert und inkubiert. Nach etwa zweitägiger Kultivierung wachsen die ersten hSGSCs aus (Petschnik et al. 2010, Nagel et al. 2013).

HSGSCs sind multipotent, exprimieren Nestin und weisen eine fibroblasten-ähnliche Morphologie auf (Petschnik et al. 2010, Danner et al. 2012, Nagel et al. 2013). Auf Polystyren-Oberflächen wachsen sie adhärent (Danner et al. 2012). Zellen, die spontan aus

Kolonien ausdifferenzieren, zeigen mesodermale (*α -Smooth-Muscle-Actin* (α -SMA), *Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor- γ* , *Runt-related-Transcription-Factor-2*), ektodermale (*β tubulin*, *Protein-Gene-Product-9.5*, Neurofilament-S110) und endodermale Marker (Albumin, Amylase und von-Willebrand-Faktor (vWF)), was auf ein vielfältiges Differenzierungspotenzial hindeuten könnte (Petschnik et al. 2010, Danner et al. 2012).

Das Potenzial zur mesodermalen Differenzierung konnte bei Induktionsversuchen gezeigt werden (Nagel et al. 2013). Bei Aussaat auf Matrigel® beschichteten Oberflächen ließen sich kapillar-ähnliche Strukturen nachweisen (Danner et al. 2012). Im Zusammenhang mit der Expression der endothelialen Marker vWF und α -SMA deutet dies potenziell auf eine Differenzierung zu Zellen des Gefäßsystems, wie zum Beispiel Endothelzellen, hin (Danner et al. 2012).

Die Proliferationsrate (Verdopplungszeit) wurde mit 2,8 bis 4,3 Tagen angegeben (Danner et al. 2012, Nagel et al. 2013). Innerhalb der ersten 13 Passagen wurde keine Reduktion des Wachstums oder Eintritt in eine Ausdifferenzierung beobachtet (Nagel et al. 2013). Aus einer Hautbiopsie mit den Maßen von etwa einem mal zwei Zentimetern können innerhalb von 30 Tagen etwa 10 Millionen Zellen gewonnen werden. Dies ist ausreichend für eine klinische Anwendungen (Nagel et al. 2013).

5.4.2 Kapazitäten Schweißdrüsen-abgeleiteter Stammzellen in der Wundheilung

In Zytokinarrays, die sowohl mit isolierten hSGSCs als auch mit durch hSGSC besiedelten *Scaffolds* durchgeführt wurden, zeigte sich eine mögliche indirekte Beeinflussung der Wundheilung. Es wurden Zytokine, die die Immunantwort modellieren (*Monocyte-Chemoattractant-Protein-1*, *Growth-Regulated-Oncogene-alpha*, Interleukin-6, Interleukin-8, Pentraxin3), die Vaskularisierung beeinflussen (Thrombospondin-1, *Vascular-Endothelial-Growth-Factor*) und in den Gewebeumbau eingreifen (Serin-Protease-Inhibitor-E1, *Tissue-Inhibitor-Of-Metalloproteinase-1*, *Urokinase-Type-Plasminogen-Activator*), nachgewiesen (Danner et al. 2012, Nagel et al. 2013).

Die bereits erwähnten Kapillar-ähnlichen Strukturen könnten des Weiteren ebenfalls einen direkten Beitrag durch Vaskularisierung des Transplantates leisten (Danner et al. 2012).

Bisherige Studien mit hSGSCs deuten auf ein hohes Potenzial der Zellen als unterstützende Zellpopulation bei der Wundheilung hin. So wurde in einem Maus-Modell ein Vollhautdefekt gesetzt, der mit hSGSCs in einem Kollagen-Scaffold abgedeckt wurde. Nach zwei Wochen ließ sich eine verbesserte Vaskularisierung der Wunde beobachten. Ob dies

auf eine indirekte Beeinflussung der Wundheilung durch Mediatoren oder auf die Ausbildung von Gefäßstrukturen zurückzuführen ist, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (Danner et al. 2012).

In einem Modell zur Regeneration peripherer Nerven förderten hSGSCs *in vitro* durch Ausschüttung von parakrinen Faktoren das Auswachsen von Nervenzellen und dienten als Leitstruktur für Nervenzellen (Mehnert et al. 2014).

Des Weiteren ließ sich in einem Wundheilungsmodell an humanen Vollhautproben *ex vivo* zeigen, dass die Epithelialisierung und Angiogenese von Hautwunden ebenfalls positiv durch hSGSCs beeinflusst wurden (Sturmheit et al. , Liao et al. 2019).

5.5 Keimspektrum chronischer Wunden und antimikrobielle Behandlung

5.5.1 Wundinfektionen und Behandlung von Wundinfektionen

Es existiert eine natürliche Keimbesiedelung der Haut, die sogenannte residente Hautflora. Während der Wundheilung kann es zu (opportunistischen) Infektionen kommen (Assadian und Kramer 2012). Zunächst kontaminieren die Erreger die Wunde, wobei es durch eine Vermehrung der Erreger zu einer Kolonisation der Wunde kommen kann, die noch keine immunologische Reaktion zur Folge hat (Assadian und Kramer 2012). Eine folgende kritische Kolonisation zeigt keine klassischen Entzündungszeichen, führt jedoch zu einer verzögerten Wundheilung (Assadian und Kramer 2012). Die lokale Infektion geht mit den klassischen Entzündungszeichen (Rötung, Schwellung, Schmerz, Erwärmung, Funktionseinschränkung) einher. Diese lokale Infektion kann sich klinisch durch eine Zunahme von Wundexsudaten und Wundheilungsstagnation präsentieren (Assadian und Kramer 2012).

Ein Schwellenwert, der zur Unterscheidung zwischen Kolonisation und Infektion eingeführt wurde, ist der Nachweis von mehr als 10^5 Kolonie-bildenden Einheiten pro Gramm Gewebe (Lipsky und Hoey 2009, Han und Ceilley 2017). Einen sicheren Nachweis einer Infektion stellt dies jedoch nicht dar. Ausschlaggebend ist für eine Verzögerung der Wundheilung wahrscheinlich nicht nur die Keimanzahl, sondern vor allem das Keimspektrum (Lipsky und Hoey 2009). Es kommt dementsprechend auch eine Verzögerung der Wundheilung ohne manifeste Infektion in Betracht, zum Beispiel durch Biofilme oder lokale bakterielle Toxine als mögliche Ursachen (Lipsky und Hoey 2009, Assadian und Kramer 2012). Die

systemische Infektion aufgrund einer Wundinfektion hat eine generalisierte Immunantwort zur Folge (Assadian und Kramer 2012).

Während der Wundversorgung erfolgt eine Reinigung und Dekontamination der Wunde mittels Spülung (z.B. Ringer-Lösung) und gegebenenfalls chirurgischem Débridement (Assadian und Kramer 2012, Klein et al. 2013). Bei Anzeichen einer Entzündung können des Weiteren antiseptische Substanzen wie zum Beispiel Octenidin oder Polyhexanid zum Einsatz kommen (Assadian und Kramer 2012, Klein et al. 2013). Zudem besteht die Möglichkeit, medizinischen Honig zu verwenden, der eine bakterizide Wirkung auf Keime aufweist (Assadian und Kramer 2012, Klein et al. 2013). Eine systemische Gabe von antimikrobiellen Substanzen stellt den letzten Schritt der Eskalationsmöglichkeiten dar und sollte kritisch erwogen werden (Dissemond 2014, Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin (DGV) 2021).

5.5.2 Keimspektrum chronischer Wunden und Verbrennungen

Je nach Ätiologie der Wunde ist ein unterschiedliches Keimspektrum zu erwarten.

In chronischen Wunden sind grampositive Kokken wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), sowohl Methicillin resistent als auch sensibel, Enterokokken und in venösen Ulzera auch Streptokokken zu finden. Außerdem umfasst das Keimspektrum die gramnegativen Stäbchen der Enterobakterien, beispielsweise *Escherichia coli* (*E. coli*), *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* Spezies und *Pseudomonas aeruginosa* (Lipsky und Hoey 2009, Jockenhofer et al. 2013, Dissemond 2014).

Nach Verbrennungen sind die entstandenen Wunden zunächst steril. Nach etwa zwei Tagen beginnt jedoch die Kolonialisierung des verwundeten Areals mit grampositiven Keimen der Hautflora, zum Beispiel *S. aureus* und koagulasenegativen Staphylokokken. Ab dem fünften Tag besiedeln endogene Keime wie *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* sowie exogen übertragene Keime wie *Pseudomonas aeruginosa* die Wunde (Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin (DGV) 2021). Die Keimbesiedelung stellt durch opportunistische Infektionen ein Problem für die Hauttransplantation dar.

Bei Verbrennungspatient*innen wurde ein sogenanntes *melting graft syndrome* beschrieben, bei dem zuvor gut angewachsene Hauttransplantate, Transplantatentnahmestellen oder Verbrennungsareale durch Infektionen geschädigt werden (Matsumura et al. 1998). Hierbei spielen sowohl Staphylokokken als auch Streptokokken eine Rolle (Matsumura et al. 1998). Auch in einer Studie zu Hauttransplantationen bei verschiedenen Indikationen wurden

Infektionen mit Transplantatuntergang beschrieben. Dazu gehören Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterobacter*, Enterokokken und *Acinetobacter* (Unal et al. 2005). Es wurde berichtet, dass vaskuläre Ulzera und Verbrennungen ein hohes Risiko für einen infektionsbedingten Transplantatuntergang hatten (Unal et al. 2005).

Bereits im Jahr 1981 wurde im Rahmen einer Publikation über CEAs zur Diskussion gestellt, dass das fehlende Anwachsen eines CEAs auf eine Infektion des Wundrandes zurückzuführen sein könnte (O'Connor et al. 1981). Der Nachweis von *Staphylococcus hemolyticus* gelang bei zwei Patient*innen, die nach einer Behandlung mit CEAs einen Transplantatuntergang zeigten (Ronfard et al. 2000).

5.5.3 Entwicklung der Idee einer antimikrobiellen Prophylaxe

Die Behandlung von Infektionen nach einer Transplantation ist aufgrund eingeschränkter Gewebegängigkeit mancher Antibiotika sowie der (Stamm-)Zelltoxizität einiger antimikrobieller Substanzen kompliziert. Verbrennungsverletzungen und fragile Wundverhältnisse sind zwei weitere Faktoren, die sich für Behandlungsschwierigkeiten verantwortlich zeigen (Cooper et al. 1990, Cooper et al. 1991, Teepe et al. 1993, Carsin et al. 2000, Tsai et al. 2016). Die Applikation von autologen Keratinozyten im Zellverbund mit einem topischen Antibiotikum führte in einer Studie zu einer herabgesetzten Inzidenz von Wundinfektionen nach CEA-Transplantation. Ein negativer Effekt auf die Keratinozyten der CEAs konnte in dieser *In-vivo*-Umgebung nicht beobachtet werden (Carsin et al. 2000).

Eine topische Behandlung mit Gentamicin oder Minocyclin erzielte in einem Verbrennungsmodell an Schweinen eine adäquate Keimreduktion von *S. aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*. Bei dieser Behandlung waren so geringe systemische Konzentrationen beobachtet worden, dass systemische Nebenwirkungen unwahrscheinlich schienen (Junker et al. 2015, Tsai et al. 2016).

Studien über die Auswirkungen von Antibiotika auf die Proliferation, metabolische Aktivität und Viabilität der hSGSCs fehlen bisher jedoch. Diese sind notwendig, um eine simultane Anwendung von hSGSCs und Antibiotika zu evaluieren.

Um diese Punkte zu prüfen können verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. Multi-Well-Assays, die Aufschluss über die Zellproliferation geben, sind insbesondere im Hinblick auf die Auswirkungen von Medikamenten auf Zellen bezüglich des ökonomischen Aspektes von Bedeutung (Witzel et al. 2015). Ein vielgenutzter Assay, um die Stoffwechselaktivität der Zellen zu beobachten nutzt 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Dieser Assay stellt ein kalorimetrisches Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung der Stoffwechselprozesse dar. Die metabolische Aktivität von Zellen beruht auf dem Nachweis von intrazellulären Stoffwechselprozessen (Ghasemi et al. 2021).

Während der Experimente wird MTT in metabolisch aktiven Zellen zu Formazan reduziert (Surin et al. 2017, Ghasemi et al. 2021). Die Reaktion kann durch unterschiedliche Mechanismen in verschiedenen Zellkompartimenten katalysiert werden, unter anderem durch die Dehydrogenasen der Mitochondrien, Enzyme im endoplasmatischen Reticulum und Zytosol sowie Oxidoreduktasen der Plasmamembran (Surin et al. 2017, Ghasemi et al. 2021).

Durch die Quantifizierung von Formazan erfolgt somit eine indirekte Bestimmung der metabolischen Zellaktivität (Ghasemi et al. 2021). Die Ursachen einer reduzierten metabolischen Zellaktivität im Vergleich zu Kontrollen können auf eine geringere Proliferation oder ein verstärktes Absterben der Zellen zurückzuführen sein. Eine erhöhte metabolische Zellaktivität könnte durch eine höhere Proliferationsrate und damit einer erhöhten Zellzahl oder eine Steigerung der Syntheseleistung der Zellen begründet sein.

Um weniger invasive Verfahren und einen größeren Durchsatz für Zellanalysen zu erreichen, wurde bereits in den 1980er Jahren eine elektrische Zell-Substrat-Impedanz-Registrierung (*electric cell-substrate impedance sensing* – ECIS) entwickelt (Giaever und Keese 1991).

Hierfür wurden Zellkulturböden mit Elektroden entwickelt, über die eine elektrische Spannung angelegt und die Impedanz im bestehenden Stromkreis registriert wurde (Witzel et al. 2015). Adhärenz wachsende Zellen auf den Elektroden erhöhen die Impedanz im Stromkreis durch die isolierende Eigenschaft der Zellen (Kho et al. 2015, Witzel et al. 2015). Mittlerweile existieren kommerzielle, weiterentwickelte Geräte und zugehörige mit Mikroelektroden versehene Zellkulturplatten (Kho et al. 2015, Witzel et al. 2015).

Diese Systeme ermöglichen Echtzeitmessungen mit hohen zeitlichen Auflösungen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg, sind nur wenig invasiv und bieten einen hohen Durchsatz bei einer hohen Datensatzdichte mit dem ökonomischen Vorteil der relativ geringen notwendigen Zellanzahl bei Wachstumsflächen von 96-Well-Platten (Kho et al. 2015, Witzel et al. 2015).

Zelltod oder Verlust der Adhärenz führen zu einem Absinken der Impedanz (Kho et al. 2015). Eine Zunahme der Impedanz kann auf unterschiedliche Effekte hindeuten: gesteigerte

Adhärenz der Zellen, Proliferation, veränderte Zellmorphologie (beispielweise Größenzunahme singulärer Zellen) und Zellmigration (Kho et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit fiel die Auswahl auf die Antibiotika Gentamicin und Fusidinsäure, da bereits Arzneimittelzubereitungen für die lokale Anwendung existieren. Außerdem wurde die simultane Anwendung mit verschiedenen Zelllinien in Studien bereits evaluiert (Forsgren und Schmeling 1977, Cooper et al. 1990, Cooper et al. 1991, Teepe et al. 1993, Junker et al. 2015).

5.5.3.1 *Gentamicin*

Gentamicin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum (Karow 2012, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2020). Seine bakterizide Wirkung entfaltet es über die Hemmung der Proteinbiosynthese sowie durch Schädigung der Zellwand von proliferierenden und ruhenden Bakterien (Karow 2012). Resistenzmechanismen gegen Gentamicin können sowohl chromosomal als auch Plasmidgebunden vorliegen (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2020). Die Applikation kann intravenös und topisch erfolgen, wobei eine intravenöse Applikation zu einer guten Verteilung im Extrazellulärraum führt (Karow 2012). Die fehlende Resorption bei oraler Aufnahme führt zu einer Depletion des Mikrobioms (Karow 2012). Bei Aminoglykosiden muss auf eine ausreichende Dosierung geachtet werden, daher wird intravenös eine Hochdosistherapie mit 7–7,5 mg/kg/d empfohlen (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2020).

Das Wirkspektrum umfasst im grampositiven Bereich *S. aureus* und teilweise *Staphylococcus epidermidis*. Im gramnegativen Bereich wirkt es gegen *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella* Spezies, *Enterobacter* Spezies, *Serratia* Spezies, *Shigella* Spezies, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Yersinia enterocolitica* (Karow 2012). Es werden also Keime aus dem Spektrum chronischer Wunden beziehungsweise Verbrennungen abgedeckt.

Die Indikation für Gentamicin ist bei schweren Infektionen der Atemwege, Harnwege, intraabdominellen Infektionen, Sepsis, Meningitis, Endokarditis und Osteomyelitis gegeben (Karow 2012). Eine Monotherapie sollte nur bei Infektionen des Urogenitaltraktes erwogen werden (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2020). Die Kontraindikationen umfassen schwere Niereninsuffizienz und Innenohrschäden sowie Gravidität. Gentamicin wird glomerulär filtriert und im Tubulussystem resorbiert, was die Nephrotoxizität der Substanz erklärt (Karow 2012). Des Weiteren ist Gentamicin

ototoxisch, da es sich ebenfalls in der Perilymphe des Innenohres ansammelt (Karow 2012). Diese beiden Nebenwirkungen erklären die geringe therapeutische Breite von Gentamicin (Karow 2012). Wie bereits erwähnt, scheinen diese systemischen Nebenwirkungen bei lokaler Anwendung vernachlässigbar (Junker et al. 2015). Weitere Nebenwirkungen sind Neurotoxizität, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von Superinfektionen, Überempfindlichkeitsreaktionen und selten Hämatoepoesestörungen (Karow 2012). Aminoglykoside können mit anderen Medikamenten interagieren, die vor allem auf den Nebenwirkungen beruhen (Karow 2012).

In vitro wurden negative Auswirkungen auf die Proliferation und Migration von Keratinozyten unter der Einwirkung von Gentamicin nachgewiesen (Junker et al. 2015).

Für diese Arbeit wurde eine Dosierung von 1,4 mg/ml Gentamicinsulfat gewählt, die etwa 1 mg/ml Gentamicin entspricht, da dies den topisch angewandten Zubereitungen entspricht. Daher wird diese Konzentration in dieser Arbeit als „klinische Dosierung“ bezeichnet. Zur besseren Übersichtlichkeit wird in dieser Arbeit nur der Ausdruck Gentamicin verwendet.

5.5.3.2 Fusidinsäure

Fusidinsäure ist ein Steroid-Antibiotikum, das von dem Pilz *Fusidium coccineum* synthetisiert wird (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2010, Karow 2012). Dieses Reserveantibiotikum wirkt durch Hemmung der Proteinbiosynthese bakteriostatisch (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2010, Karow 2012). Es gibt Resistenzmechanismen gegenüber Fusidinsäure, die über Plasmide weitergegeben werden können (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2010). Die Anwendung kann oral, intravenös und lokal erfolgen (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2010, Karow 2012). Die Dosierungen bei intravenöser oder oraler Anwendung betragen, abhängig von den empfehlenden Fachgesellschaften, zwischen zwei bis vier Dosen á 500 mg pro Tag (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2010). Topische Formulierungen werden bis zu vier Mal pro Tag aufgetragen (Ratiopharm 2019).

Das Wirkspektrum der Fusidinsäure umfasst im gramnegativen Bereich Meningokokken, Gonokokken und Bacteroides. Im grampositiven Bereich werden Staphylokokken, Clostridien, Corynebakterien und teilweise auch Streptokokken abgedeckt. Die Indikation für Fusidinsäure umfasst schwere Staphylokokkeninfektionen von Haut und Weichteilen, bei denen es meist in einer Kombinationstherapie angewendet wird (The European

Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2010, Karow 2012). Des Weiteren kann es bei Infektionen von Knochen oder Gelenken eingesetzt werden (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2010).

Der Abbau dieses Antibiotikums erfolgt in der Leber und die Ausscheidung über die Gallenflüssigkeit (Karow 2012).

Die Nebenwirkungen einer Behandlung mit Fusidinsäure umfassen unter anderem gastrointestinale Beschwerden, intrahepatische Cholestase und eine Hemmung der Leukozytenmigration (Karow 2012).

Da Fusidinsäure in einer zweiprozentigen Lösung, die in topischen Zubereitungen genutzt wird, Mizellen ausbildet, wurde in dieser Arbeit eine Dosierung von 1 mg/ml ausgewählt (Carey und Small 1971). Dies entspricht der Verdünnung bei einer intravenösen Anwendung des Stoffes und wird daher in dieser Arbeit als „klinische Dosierung“ bezeichnet.

5.6 Fragestellung

In der kutanen Wundheilung werden bereits seit den 1980er Jahren Stammzellen eingesetzt, wobei die Anwendungsgebiete und die genutzten Vorläufer- und Stammzellen über die Zeit vielfältiger wurden (O'Connor et al. 1981, Han und Ceilley 2017, Brockmann et al. 2018, Kaur et al. 2019).

Ein Transplantatversagen von Stammzellverbänden zur Wundbehandlung wurde am ehesten auf ein Infektionsgeschehen zurückgeführt. Daher wurden bereits *in vitro* und *in vivo* Versuche durchgeführt, um eine simultane Applikation von Stammzellen und Antibiotika zur Infektionsprophylaxe beziehungsweise -behandlung zu evaluieren (Cooper et al. 1990, Cooper et al. 1991, Teepe et al. 1993, Junker et al. 2015).

In dieser Arbeit wurden hSGSCs, die in Versuchen wundheilungsfördernde Kapazitäten gezeigt haben, im Zusammenhang mit den Antibiotika Gentamicin und Fusidinsäure untersucht.

Es sollte zunächst betrachtet werden, ob diese beiden Substanzen *in vitro* einen negativen Effekt auf die Proliferation, die metabolische Aktivität und die Viabilität der Zellen haben. Anschließend sollten diese Erkenntnisse in einem *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell als erster Ausblick einer potenziellen *In-vivo*-Behandlung betrachtet werden.

Folgende Hypothesen galt es, mit den *In-vitro*-Experimenten zu überprüfen:

1. Die Präsenz von Gentamicin beziehungsweise Fusidinsäure im Kulturmedium reduziert:
 - a. das Proliferationsvermögen der hSGSCs
 - b. die metabolische Aktivität der hSGSCs
2. Es besteht eine positive Korrelation zwischen den erhobenen Impedanzwerten und:
 - a. der hSGSC Proliferation
 - b. der metabolischen Aktivität der hSGSCs
3. Es besteht eine negative Korrelation zwischen der Proliferation der hSGSCs und der Konzentration von Gentamicin beziehungsweise Fusidinsäure im Medium.
4. Die Reduktion des Proliferationsvermögens durch die Antibiotika Gentamicin und Fusidinsäure ist abhängig von der Konzentration des jeweiligen Antibiotikums. Höhere Konzentrationen beeinflussen die Proliferation in einem höheren Maße negativ.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Name	Abkürzung	Bezug
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	MTT	Roth, Deutschland
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> (1X)	DMEM (1X)	Gibco, Deutschland
<i>Dulbecco's Phosphate-buffered Saline</i>	PBS	Gibco, Deutschland
Eosin G		Roth, Deutschland
Essigsäure		Roth, Deutschland
Ethanol 98%		Roth, Deutschland
Euparal		Roth, Deutschland
Fetales Kälberserum	FKS	Gibco, Deutschland
Fusidinsäure-Natriumsalz	Fusidinsäure	BioChemica über PanReac Applichem, ITW reagents Deutschland
Gentamicinsulfat	Gentamicin	BioChemica über PanReac Applichem, ITW reagents Deutschland
Hämatoxylin		Roth, Deutschland
Hydrocortisol		Sigma-Aldrich, Deutschland
Insulin solution human (10 mg/ml)	Insulin	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Glutamin	PAA Laboratories, Österreich

Penicillin/Streptomycin (100 U/ml/0,1 mg/ml)	Pen/Strep	Biochrom, Deutschland
Propidiumiodid	PI	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>Reagent A100, lysis buffer</i>	Lyse-Puffer (Puffer A)	ChemoMetec, Dänemark
<i>Reagent B, stabilizing buffer</i>	Stabilisierungspuffer (Puffer B)	ChemoMetec, Dänemark
<i>Staurosporine</i>	Staurosporin	Abcam, UK
Tissue-Tek®, <i>O.C.T. Compound</i>	Tissue-Tek®	Sakura über A. Hartenstein, Deutschland
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 10X	Trypsin	PAA Laboratories, Österreich
<i>William's Medium E (1X)</i>	WEM	Gibco, Deutschland

6.1.2 Kits

Kit	Bezug
<i>Annexin V-Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) Apoptosis Detection Kit</i>	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>CellTrace™ Cell proliferation Kit (Far Red, DMSO)</i>	Invitrogen über Fisher Scientific
<i>Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH)</i>	Sigma-Aldrich, Deutschland

6.1.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-/24-/96-Well Zellkulturplatten	TPP, Schweiz
96-Well-e-Platte für Impedanzmessungen	ACEA Biosciences über OLS, Deutschland
Deckgläser (24×50 mm)	VWR, Deutschland
<i>Disposable Biopsy Punch 4 mm (Gewebestanze)</i>	KAI medical, Japan
<i>FACS Tubes 12×75 mm, 5 ml</i>	BD, Deutschland
Kryo-Röhrchen 20 (2 ml)	TPP, Schweiz

Menzel-Gläser Superfrost® Plus (25×75×1 mm)	Thermo Scientific, Deutschland
NucleoCassette™ (zur Zellzahlbestimmung am NucleoCounter®)	ChemoMetec, Dänemark
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Deutschland
Rotilabo®-Spritzenfilter (0,22 µm)	Roth, Deutschland
Serologische Pipetten Falcon® (5 ml, 10 ml, 50 ml)	Corning Life Sciences über VWR, Deutschland
Spritzen (10 ml, 50 ml)	B. Braun, Deutschland
Stericup® und Steritop® 0,2 µm	Merck-Millipore, Deutschland
Zellkulturflaschen (Wachstumsflächen: 25/75/150 cm ²)	TPP, Schweiz

6.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Bildbasiertes Zytometer Typ Cellometer Vision	Nexcelom Bioscience, USA
Cool Box (Einfrierbox)	Biocision, USA
Durchflusszytometer Typ Accuri™ C6	BD, Deutschland
Feinwaage Typ ABT 220-5DM	Kern, Deutschland
Inverses Durchlichtmikroskop Typ Axio Vert.A1	Zeiss, Deutschland
Inverses Durchlichtmikroskop Typ Axiovert 40 C	Zeiss, Deutschland
Kyrostat Typ Microm HM 560	Thermo Fisher, Deutschland
Laser Typ ExciStar 500 (Wellenlänge 193 nm)	Coherent, USA (über Medizinisches Laserzentrum Lübeck GmbH)
Mikroelektronischer Biosensor Typ xCELLigence® Real-Time Cell Analysis System (RTCA)	ACEA Biosciences über OLS, Deutschland

Modulares Stereomikroskop Modul SteREO CL1500 ECO	Zeiss, Deutschland
Modulares Stereomikroskop Modul SteREO Discovery.V8	Zeiss, Deutschland
Multiplate-Reader Typ CLARIOstar®	BMG LABTECH, Deutschland
pH-Sonde Seven Compact	Mettler Toledo, Deutschland
Pipetten Typ Eppendorf research (20 µl, 100 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, Deutschland
Pipetten Typ Eppendorf xplorer (50–1200 µl)	Eppendorf, Deutschland
Pipetten Typ Peq mate	Peqlab, Deutschland
Stereomikroskop Typ Stemi 2000	Zeiss, Deutschland
Tischaufsatz Typ WSB PIEZODRIVE 05	Zeiss, Deutschland
Vortex-Gerät Typ Vortex Genie 2	Fisher Scientific, USA
Zentrifuge Typ 5415 R	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge Typ 5804 R	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge Typ Micro 7	Fisher Scientific, Deutschland
Zytometer Typ NucleoCounter®	ChemoMetec, Dänemark

6.1.5 Software

Software	Verwendung	Hersteller
Accuri™ C6 Software Version 1.0.264.21	Durchflusszytometrie	BD, Deutschland
Affinity Photo 1.9.3	Bildbearbeitung	Serif Europe Ltd., UK
AxioVision Rel. 4.7	Mikroskopie	Zeiss, Deutschland
BioRender	Abbildungen	BioRender, Kanada
Cellometer Vision Auto Counter Version 1.2.3	Bildbasiertes Zytometer	ACEA Biosciences, USA
FlowJo® X V10.0.6r2	Durchflusszytometrie	FlowJo LLC, USA
Prism 9	Statistik	GraphPad, USA
ImageJ 1.51m9 Fiji	Auswertung & Konversion Mikroskopie-Aufnahmen	NIH, USA

Microsoft office	Auswertung & Verschriftlichung	Microsoft, USA
Zen 2012 blue edition Version 1.1.2.0	Mikroskopie	Zeiss, Deutschland

6.1.6 Puffer und Lösungen

Name	Bestandteile
Einfriermedium	9 ml FKS (90% vol) 1 ml DMSO (10% vol)
Fusidinsäure-Lösung (steril filtriert)	38 mg Fusidinsäure 33,820 ml DMEM (1X)
Gentamicin-Lösung (steril filtriert)	53,2 mg Gentamicinsulfat 33,820 ml DMEM (1X)
Hydrocortison (1mg/ml) (steril filtriert)	1 mg Hydrocortison 250 µl Ethanol (99,9 %) 750 µl Aqua destillata (Aqua dest.)
MTT-Gebrauchslösung (1X, pro Well)	35 µl MTT-Stammlösung 315 µl DMEM (1X)
MTT-Stammlösung (5 mg/ml)	5 mg MTT 5 ml PBS
PI-Stammlösung (2 mg/ml)	2 mg/ml PI in Aqua dest.
Staurosporin-Lösung	100 µg 214 µl DMSO
Trypsin/EDTA-Lösung 1X	10 ml Trypsin/EDTA 10X 90 ml PBS

6.1.7 Medien

Name und Endkonzentration	Bestandteile
DMEM (Standard-Zellkulturmedium / 500 ml)	445 ml DMEM (1X) 50 ml FKS (10%) 5 ml Pen/Strep (1%)
DMEM mit Fusidinsäure	32,930 ml Fusidinsäure-Lösung 3700 µl FKS (10%)

(37 ml; 1 mg/ml Fusidinsäure (klinische Dosierung))	370 µl Pen/Strep (1%)
DMEM mit Gentamicin (37 ml; 1,4 mg/ml Gentamicinsulfat (klinische Dosierung))	32,930 ml Gentamicin-Lösung 3,7 ml FKS (10%) 370 µl Pen/Strep (1%)
WEM-Medium (50 ml) (Kulturmedium Hautstanzen)	48,945 ml WEM (1X) 5 µl Hydrocortison (1 µg/ml) 50 µl Insulin (10 mg/ml) 500 µl Pen/ Strep (10 mg/ml) 500 µl L-Glutamin (200 mmol/l)

6.1.8 Verwendete Zelllinien

Abkürzung	Geschlecht/Alter	Verwendung	Passage
hSGSC 14	M/31 Jahre	Dosisanpassung	12
		<i>Punch-in-a-Punch</i>	9–10
hSGSC 31	W/27 Jahre	Klinische Dosis	9
		Proliferationsassay	8
hSGSC 33	M/17 Jahre	Klinische Dosis	9
		Proliferationsassay	8
		<i>Punch-in-a-Punch</i>	10
hSGSC 36	M/38 Jahre	Klinische Dosis	9
		Proliferationsassay	9
		<i>Punch-in-a-Punch</i>	10
hSGSC 44	M/28 Jahre	Ausschluss nach spärlicher Proliferation	

6.2 Methoden

6.2.1 Auswahl der Zellen

Für diese Arbeit fanden humane Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen Verwendung. Hierbei handelt es sich um adulte Vorläuferzellen, die nach dem Protokoll von Petschnik et al. und der Erweiterung von Nagel et al. aus dem Stroma von Schweißdrüsen isoliert werden (Petschnik et al. 2010, Nagel et al. 2013). Es wurden Zellen genutzt, die nach dem aktuellen

Protokoll aus dem Axillarbereich isoliert worden waren. Es wurden insgesamt vier Zelllinien in die engere Wahl aufgenommen, mit denen in einer ersten Kultivierungsphase die Proliferationsfähigkeit nach Kryokonservierung überprüft wurde. Da bei der Zelllinie des 28-jährigen Spenders eine spärliche Zellproliferation imponierte, wurde sie für weitere Versuche nicht betrachtet. Für die Dosisanpassungsversuche wurde die gut etablierte Zelllinie hSGSC 14 genutzt.

6.2.2 Zellkultur

Zur Inkulturnahme humaner SGSCs wurden eingelagerte Kryo-Röhrchen der Zellen aus dem Stickstofftank, in dem eine Lagerung bei -196 °C erfolgte, entnommen und angetaut. Anschließend wurden die Zellen mit vorgewärmten DMEM resuspendiert und im aufgetauten Zustand in ein neues Reaktionsgefäß mit DMEM überführt. Dieses wurde für 5 min bei $180 \times g$ (Zentrifuge Typ 5804R) zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Nachdem das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert worden war, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Kultivierung der hSGSCs erfolgte im Standard-Zellkulturmedium DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) bei 37 °C und 5 % CO_2 ; ein Mediumwechsel erfolgte alle 2–3 Tage.

Um die Zellen von den Zellkulturoberflächen zu lösen, wurde das Medium zunächst abgenommen und die Zellen mit *Dulbecco's Phosphate-buffered Saline* (PBS) gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) für 2 min. Das Enzym Trypsin baut die für zelluläre Adhärenz benötigten Proteine ab und EDTA bindet als Komplexbildner das benötigte Kalzium. Das Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgte schließlich mit serumhaltigem Kultivierungsmedium. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß übertragen und für 5 min bei $180 \times g$ zentrifugiert (Zentrifuge Typ 5804R), um ein Zellpellet zu erhalten.

Gewonnene Zellpellets wurden entweder mit DMEM resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:3 erneut eingesät oder kryokonserviert.

Für die Kryokonservierung wurde das Zellpellet in Dimethylsulfoxid-haltigem (DMSO) Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurde es in Kryo-Röhrchen überführt und mit Hilfe einer Einfrierbox bei -80 °C zunächst über Nacht um ein Grad Celsius pro Minute heruntergekühlt, bevor eine Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C erfolgte.

Während der Versuche erfolgte die Kultivierung der Zellen mit Gentamicin- oder Fusidinsäure-versetztem Medium. Die Mediumwechsel bei den Versuchen über sieben Tage erfolgten an den Experimenttagen null und vier. Aufnahmen am Mikroskop aus der Well-Mitte wurden von allen Wells an Tag null des Experimentes angefertigt. An den Experimenttagen eins, drei, fünf und sieben wurden Aufnahmen der Wells, die für die Zellzahlbestimmungen ausgesät worden waren, des jeweiligen Experimenttages durchgeführt.

Ein Mediumwechsel an den Tagen null, vier und sieben erfolgte bei der Versuchsdauer über neun Tage. Die Einsaatdichten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Einsaatdichten der hSGSCs für die unterschiedlichen Versuche

6-Well-Platte	12-Well-Platte	24-Well-Platte	96-Well-e-Platte	Innerer Punch
77.000	30.000	15.500	1.440	74.600 bzw. 83.000 Zellen
Zellen/Well	Zellen/Well	Zellen/Well	Zellen/Well	pro Punch

6.2.3 Medien

Die Medien für die verschiedenen Versuche wurden im Vorhinein nach den Angaben unter 5.1.7 beziehungsweise durch Verdünnung der Lösungen unter 5.1.6 zubereitet. Medien mit der Zugabe von Gentamicin oder Fusidinsäure wurden steril filtriert (Filter 0,22 µm). Anschließend erfolgte eine Equilibrierung der Medien im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂). Als Kontrollgruppe wurde das Standardmedium, hier abgekürzt mit DMEM, genutzt (vgl. 5.1.7). Vor den Versuchen zur klinischen Dosierung wurden pH-Bestimmungen nach Equilibrierung mit der pH-Sonde Seven Compact durchgeführt.

6.2.4 Zellzahlbestimmung am bildbasierten Zytometer für die *In-vitro*-Versuche

Für das bildbasierte Zytometer (Cellometervision) wurde Propidiumiodid (PI) als Fluoreszenzfarbstoff und DNS-Interkalator genutzt. Da intakte Zellmembranen von PI nicht überwunden werden, wurde die Membranintegrität durch Auf- und Abpipettieren der Probe in einem Lysepuffer gestört. Anschließend erfolgte die Zugabe eines Stabilisierungspuffers, bevor letztendlich 0,5 µl PI hinzugefügt wurden. Die Volumina der Puffer entsprachen dem Ausgangsvolumen der Probe. Nach erneutem Mischen wurde die Zählkammer eines Cellometer-Objektträgers mit der entstandenen Lösung befüllt. Da es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff handelt, kann dieser mit Hilfe einer Fluoreszenzanregung und -aufnahme dargestellt und ausgewertet werden. Im Cellometer® wird für die

Auswertung der Zellzahl ein Abgleich einer lichtmikroskopischen Aufnahme mit einer Fluoreszenzaufnahme bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 540 nm durchgeführt. Mittels geräteinterner Software zur Mustererkennung wurden die Bilder abgeglichen, analysiert und durch die Software ausgewertet. Nach der Auswertung durch das Gerät erfolgte eine manuelle Korrektur der Ergebnisse anhand der aufgenommenen Bilder, um Artefakte auszuschließen und Zellaggregate zu berücksichtigen. Für die Berechnung der Zellzahl wurde die dreifache Verdünnung sowie das Ausgangsvolumen der Probe eingerechnet.

Für Zellzahlbestimmung wurden in dieser Arbeit 12-Well-Platten genutzt. Auf einer Wachstumsfläche von 3,47 cm² wurden jeweils etwa 30.000 Zellen in 1 ml Medium eingesät. Für jede experimentelle Kondition einer Zelllinie folgte die Vorbereitung von jeweils sechs technischen Replikaten für die Versuchstage eins, drei, fünf und sieben. Außerdem wurden sechs technische Replikate zur Bestimmung der angewachsenen Ausgangszellzahl an Tag null des Experimentes angelegt.

Vor den Auswertungen wurden an den Versuchstagen Fotos aus der Well-Mitte in 50-facher Vergrößerung am Mikroskop (Axio Vert.A1) angefertigt.

Um die Zellen von der Wachstumsfläche in den 12-Well-Platten zu lösen, wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen. Nach einem Spülvorgang mit 500 µl PBS wurden pro Well 250 µl Trypsin zugegeben. Es folgte eine Inkubation über 2 Minuten bei 37 °C. Die Wirkung des Trypsins wurde mit 500 µl frischem DMEM abgestoppt. Um die Zellen zu lösen, wurde die Zellsuspension fünfmal über das Well gespült, bevor sie in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 300 × g (Fisher Scientific Micro 7). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet resuspendiert. Eine Hälfte der Zellsuspension wurde für die Zellzahlbestimmung genutzt, die andere für einen Annexin V-PI-Assay am Durchflusszytometer (6.2.6). Über den Versuchsverlauf erfolgte eine Anpassung der genutzten Resuspensionsvolumina (20–100 µl), um einer Verklumpung der Zellen bei zunehmender Zellzahl vorzubeugen. Lediglich bei der klinischen Dosis von Fusidinsäure wurde darauf bei sehr geringen Zellzahlen verzichtet. Anschließend erfolgte die Auszählung am Cellometer® wie zuvor beschrieben.

6.2.5 Zellzahlbestimmung am NucleoCounter® für die *Punch-in-a-Punch*-Versuche

Die Zellzahlbestimmung mittels NucleoCounter® wurde für die *Punch-in-a-Punch*-Versuche genutzt. Diese Methode basiert ebenfalls auf der Fluoreszenzfärbung mit PI, die

bereits in Abschnitt 6.2.4 erläutert wurde. Für die Zellzahlbestimmung am NucleoCounter® wurden zunächst 50 µl Zellsuspension mit jeweils 50 µl des Lyse- beziehungsweise Stabilisierungspuffers in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt. Das Gerät nutzt spezielle Kassetten, in denen der Färbeprozess stattfindet. Eine Probenmenge von 2 µl wurde mittels integrierter Pipette in die mit PI präparierte Kassette aufgezogen und in den NucleoCounter® eingesetzt. Das Gerät errechnet aus dem detektierten Fluoreszenzsignal die in der zu analysierenden Probe enthaltene Zellzahl pro Milliliter. Bei der Berechnung der endgültigen Zellzahl wurde die dreifache Verdünnung und das Volumen der zu zählenden Zellsuspension berücksichtigt.

6.2.6 Apoptose-Nekrose-Assay mit Annexin V und Propidiumiodid

In der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie wird das Emissionssignal von verschiedenen Fluorochromen genutzt, um Zellen mit verschiedenen Eigenschaften voneinander unterscheiden und quantifizieren zu können. Zellen können natürlicherweise fluoreszieren, in der Regel kommen jedoch Fluoreszenzfarbstoffe oder Antikörper mit gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff zum Einsatz, die an bekannte Zielstrukturen der Zellen binden. Für die Analyse Fluoreszenz-markierter Zellen werden diese über eine Kapillare vom Durchflusszytometer aufgenommen und an einem Laser vorbeigeführt. Hier erfolgt die Anregung der Fluorochrome, deren Emissionswellenlängen an Detektoren gemessen werden. Je nach Anregungsspektrum der Laser und den genutzten Detektoren können so auch gleichzeitig verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe analysiert werden. Neben der Fluoreszenzemission zeichnet ein Durchflusszytometer auch Charakteristiken der Lichtbrechung auf. Beim Gating werden einzelne Populationen anhand ihrer Charakteristika in Gruppen eingeordnet. Diese Gruppenzuordnungen können dann für weitere genauere Populationsanalysen genutzt werden.

Das Annexin-V-FITC-Apoptose-Detektionskit (FITC – Fluorescein-5-isothiocyanat) wurde genutzt, um die Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen einer Versuchsprobe zu analysieren.

Das an den Fluoreszenzfarbstoff FITC (Anregungswellenlänge: 495 nm; Emissionswellenlänge: 519 nm) gekoppelte Annexin V bindet an apoptotische Zellen. Die Bindung von Annexin V erfolgt an Phosphatidylserin, das während der Apoptose von der inneren Membranseite auf die äußere Membranseite wechselt und somit vom nicht-membrangängigen Annexin V gebunden werden kann. PI gelangt, wie im Rahmen von

Abschnitt 6.2.4 bereits erläutert, durch den Verlust der Membranintegrität nekrotischer Zellen ins Zytosol und interkaliert in die DNS (Anregungswellenlänge interkaliertes PI: 535 nm; Emissionswellenlänge interkaliertes PI: 617 nm). Mithilfe des Annexin-V-FITC-Apoptose-Detektionskits konnten somit früh-apoptotische Zellen (Annexin +, PI –), nekrotische Zellen (Annexin +, PI +) und lebende Zellen (Annexin –, PI –) der analysierten Proben unterschieden werden. Eine mit Staurosporin, einem Apoptose-induzierendem Proteinkinase-Inhibitor, behandelte Probe diente als Positivkontrolle.

Um eine ausreichend große Zellzahl für durchflusszytometrische Analysen zu erhalten, wurden Zellen technischer Replikate zusammengeführt (siehe Kapitel 6.2.4) und gemeinsam analysiert.

Die Zellsuspension wurde zunächst in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei $180 \times g$ zentrifugiert (Zentrifuge Typ 5804R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet entsprechend der Herstellerangaben in einem Bindungspuffer aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und mit Annexin V-FITC und PI für 10 min inkubiert (100 μ l Bindungspuffer je 100.000 Zellen + 1 μ l Annexin V-FITC + 2 μ l PI). Die Proben wurden abschließend filtriert mit Bindungspuffer verdünnt und am Accuri™ C6 analysiert.

6.2.7 Proliferationsassay

Zur Durchführung eines durchflusszytometrischen Proliferationsassay wurden Zellen mit dem Farbstoff CellTrace™ Far Red präpariert. Dieser wird durch Diffusion in die Zelle aufgenommen und bindet an Amine im Intrazellularraum. Er ist nicht toxisch und hat keine Auswirkungen auf den Zellzyklus. Bei der Zytokinese wird der Farbstoff mit dem Zytoplasma auf die Tochterzellen aufgeteilt, sodass es mit zunehmender Generationenzahl zu einer fortschreitenden Dilution des Farbstoffes in den Zellen kommt. Ein Nachweis des CellTrace™ Far Red Farbstoffes und seiner Fluoreszenzintensität fand mittels Durchflusszytometrie statt. Die Anregung des Farbstoffes erfolgt bei 630 nm, die Emission wird bei 661 nm detektiert.

In Vorbereitung für die Durchführung des Proliferationsassays wurden Zellen in 6-Well-Platten ausgesät (77.000 Zellen/Well in 2,5 ml Zellkulturmedium). Aufgrund geringer Zellzahlen wurde für die Zelllinie 31 keine Bestimmung an Tag sechs durchgeführt.

Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe des CellTrace™ Far Red-Fluoreszenzfarbstoffs nach Herstellerangaben für adhärente Zellen. Der Farbstoff wurde in 20 μ l DMSO gelöst

(Konzentration 1 mmol/l) und in 19,98 ml vorgewärmtem PBS verdünnt (Konzentration 1 μ mol/l). Pro Well wurde 1 ml dieser Färbelösung hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 min, gefolgt von zweimaligem Spülen der Zellen mit frischem Medium. Je Zelllinie wurden 5–7 Wells mit CellTrace™ Far Red gefärbt und im Anschluss an die Färbung in DMEM oder Gentamicin-haltigem DMEM (1,4 mg/ml) kultiviert. Die Auswertung des Proliferationsassays erfolgte an den Experimenttagen null, drei, sechs und neun. Die Zellen für die Messung an Tag null wurden nach einer Ruhezeit von 15 min in DMEM für durchflusszytometrische Analysen mit Trypsin wie zuvor beschrieben von der Wachstumsfläche gelöst. Die Zellsuspension wurde zunächst in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei $180 \times g$ zentrifugiert (Zentrifuge Typ 5804R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in Bindungspuffer resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und am Accuri™ C6 analysiert.

6.2.8 Impedanzmessung

Das xCELLigence® nutzt spezielle, sogenannte e-Platten, die mit Mikroelektroden versehen sind. Das Gerät detektiert Änderungen der Impedanz zwischen dem Medium und den Sensoren der Mikroelektroden. Adhärenente Zellen beeinflussen die Impedanz, da sie isolierend wirken. Durch einen geräteinternen Algorithmus wird der dimensionslose Wert des Zellindex (cell index – CI) ausgegeben. Der CI ist definiert als das Verhältnis von der Basislinienimpedanz zur gemessenen Impedanz. Bei Abwesenheit von Zellen ist die Impedanz lediglich abhängig von der Ionenkonzentration an den Mikroelektroden. Der CI kann durch die Anzahl der Zellen, ihrer Morphologie, der Vitalität und ihrer Adhärenz beeinflusst werden.

Vor jedem Versuch erfolgte die Kalibrierung des xCELLigence® und das Hinterlegen des Versuchsaufbaus in der Software. Die Wells der 96-Well-e-Platte wurden zunächst mit 100 μ l Medium befüllt. Nach einer Equilibrierung von 30 min folgte eine Hintergrundmessung.

Für die Einsaat der Zellen wurden 1400 Zellen in 100 μ l Medium zu den bereits vorgelegten 100 μ l gegeben. Erneut wurde die Platte 30 min equilibriert. Anschließend wurde die besiedelte Platte in das Gerät eingesetzt und das Experiment gestartet. Die Kultivierung im Gerät erfolgte über den Versuchszeitraum in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

Für jede Kondition des Mediums wurden pro Zelllinie jeweils sechs technische Replikate mit Zellen sowie jeweils zwei Wells mit Medium als Blindwerte zur Detektion etwaiger Medium-Wechselwirkungen mitgeführt.

Die Messung der Impedanzwerte erfolgte alle 15 min über den jeweiligen Versuchszeitraum. Für den Mediumwechsel am Tag vier des Experimentes wurde die Messung kurzzeitig ausgesetzt.

6.2.9 MTT-Assay

Um die metabolische Aktivität der Zellen zu beurteilen, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Vitale Zellen nehmen das gelbe MTT auf und reduzieren es zu blau-violetter Formazan. Dies ist wasserunlöslich und kann mithilfe von DMSO aus den Zellen gelöst und nachfolgend zur Konzentrationsbestimmung mittels Messung der optischen Dichte an einem Photometer (CLARIOstar®) analysiert werden.

Für die Photometrie wird Licht im visuellen und ultravioletten Spektrum genutzt. Über die Lichtabsorption eines in diesem Fall gelösten Stoffes wird dessen Konzentration bestimmt. Bei farblosen Stoffen kann eine chemische Hilfsreaktion zur Umsetzung in einen farbigen Stoff genutzt werden.

Für den Versuchsaufbau wurden 24-Well-Platten verwendet. Pro Well wurden 15.500 Zellen (500 µl) eingesät und im Kontrollmedium (DMEM), sowie in Medien mit den Substanzen Gentamicin und Fusidinsäure kultiviert. Für jedes der drei getesteten Medien wurden vier technische Replikate pro Auswertungstag angelegt. An den Auswertungstagen wurde das Kulturmedium abgenommen und pro Well durch 350 µl der MTT-Gebrauchslösung (1:10 Verdünnung der Stammlösung in DMEM) ersetzt. Anschließend wurden die Platten für eine Stunde bei 37 °C, in Aluminiumfolie als Lichtschutz gewickelt, inkubiert. Danach wurde die MTT-Lösung abgenommen und die Zellen mit 300 µl PBS pro well gewaschen. Bei Raumtemperatur wurden die Zellen für 10 min in DMSO unter Lichtschutz inkubiert, um das Formazan zu lösen. Anschließend wurde die Lösung nach dreimaligem Spülen über den Zellrasen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zur späteren Analyse lichtgeschützt bei -20 °C eingelagert. Vor der Messung wurden die Proben aufgetaut und an einem Vortex-Gerät (Vortex Genie 2) durchmischt. Jede Probe wurde anschließend in dreifacher Bestimmung (jeweils 100 µl/Well einer 96-Well-Platte) am CLARIOstar®-Multiplate-Reader analysiert. Hierfür wurde die Absorption der Lösungen bei 570 nm und 690 nm (Referenz) gemessen. Als Blindwert wurde eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Im Rahmen der Auswertung wurden

von den ermittelten Werten bei 570 nm zunächst die jeweiligen Werte bei 690 nm subtrahiert. Anschließend wurde der Mittelwert der drei Replikate ermittelt, von dem schließlich der Blindwert des Lösungsmittels DMSO abgezogen wurde.

$$\text{Replikat } x = \text{well } x_{570} - \text{well } x_{690}$$

$$m_x = \frac{(\text{Replikat 1} + \text{Replikat 2} + \text{Replikat 3})}{3}$$

$$OD = m_x - m_{DMSO}$$

6.2.10 Gewinnung und Kultivierung der Hautstanzen

Die *Punch-in-a-Punch*-Versuche wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (Model Systems – Visualisation) durchgeführt.

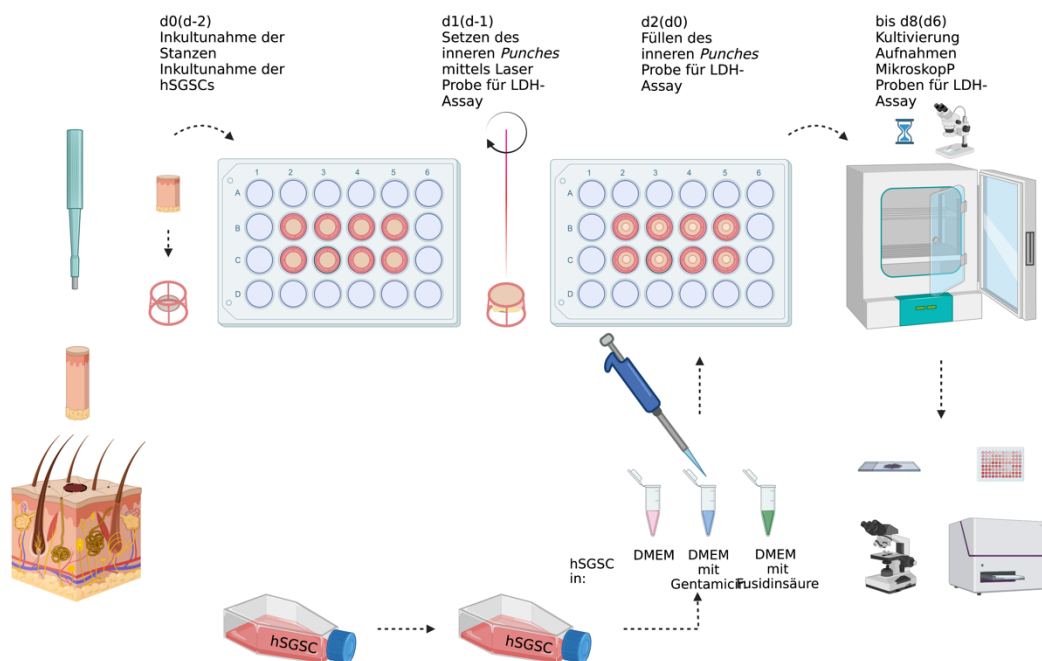


Abbildung 4: Ablauf *Punch-in-a-Punch-ex-vivo*-Wundheilungsmodell

Nummerierung der Versuchstage: erste Angabe: Tag seit Entnahme des *Punches* (entspricht d0), zweite Angabe in Klammern: Tage seit Füllung des inneren *Punches* mit Zellen. Die gewonnenen Stenzen wurden in WEM-Medium kultiviert. In umliegende leere Wells wurde 1 ml PBS beziehungsweise an d0(d-2) WEM Medium für den Blindwert des LDH-Assays gegeben. An diesem Tag wurden außerdem Zellen für die Füllung des inneren *Punches* in Kultur genommen. An d1(d-1) wurde der innere *Punch* als Wunde mittels Laser gesetzt. Am nächsten Tag (d2(d0)) wurde die Behandlung des inneren *Punches* durchgeführt und WEM-Medium für den LDH-Assay gewonnen. Anschließend erfolgte die Kultivierung bis d8(d6) mit intermittierenden Aufnahmen am Mikroskop sowie Medienwechseln und Gewinnung von Proben für den LDH-Assay. Zum Abschluss des Experimentes erfolgten Aufnahmen am Mikroskop, die Stenzen wurden kryokonserviert und der LDH-Assay wurde durchgeführt. Anschließend wurden die kryokonservierten Stenzen am Microtom aufbereitet, gefärbt und ausgewertet (Abbildung erstellt mit BioRender.com).

Alle Hautproben wurden gemäß der Helsinki-Deklaration und nach Zustimmung der Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck für Forschungszwecke genutzt (Aktenzeichen: 06-109, Abb. 21–23 im Anhang). Die Patient*innen wurden im Vorfeld über die Verwendung der Gewebeprobe aufgeklärt und haben sich sowohl mündlich als auch schriftlich dazu bereiterklärt eine Gewebeprobe für Forschungszwecke zur Verfügung zu stellen.

Die Gewinnung und Kultivierung humaner Hautstanzen für das Wundheilungsmodell *Punch-in-a-Punch* erfolgte entsprechend des von Sturmheit et al. beschriebenen Protokolls (Sturmheit et al.). Die Vollhautstanzen wurden zunächst mit einer 4 mm Biopsie-Stanze aus der Hautprobe des Spendenden entnommen. Alle Hautbiopsien wurden aus Vollhautspenden aus dem Gesichtsbereich nach einer *Facelift*-Operation gewonnen. Das Alter der Spendenden betrug 52 Jahre (P125), 60 Jahre (P134) und 76 Jahre (P127), das (biologische) Geschlecht war nicht bekannt. Hierbei wurde auf die makroskopische Gewebequalität geachtet. Areale am unmittelbaren Resektionsrand sowie stark behaarte Bereiche wurden gemieden. Ein weiteres Kriterium zur Entnahme war ein erhaltener Subkutisanteil.

Die Stanzen wurden in für diese Anwendung eigens produzierte *Airlift*-Ständer (Abb. 4) gesetzt und samt der Halterung in Wells einer 24-Well-Platte überführt. Je Well wurden anschließend 1,2 ml WEM-Medium zugefügt. So konnte die Epidermis an der Luft-Flüssigkeit-Interphase kultiviert werden. Die Kultivierung der Stanzen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Hautstanzen wurden insgesamt über einen Zeitraum von acht Tagen kultiviert. Mediumwechsel wurden nach dem Lasern des inneren *Punches* an Tag eins nach Inkulturnahme, an Tag zwei vor Füllen des inneren *Punches* und den Tagen vier und sechs vorgenommen. An diesen Tagen erfolgte außerdem eine optische Kontrolle der Stanzen am Mikroskop (SteREO Discovery.V8) inklusive einer Aufnahme der Stanzen in 25-facher Vergrößerung. Die Helligkeit und der Kontrast der entstandenen Aufnahmen wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm Affinity Photo angepasst.

6.2.11 Setzen der inneren Wunde mittels Laser

Das Setzen des inneren *Punches* erfolgte wie bei Sturmheit et al. beschrieben mittels ArF-Excimer Laser (ExciStar 500) am Medizinischen Laserzentrum Lübeck GmbH (Sturmheit et al.). Die zugefügten Wunden hatten einen Durchmesser von 2 mm und eine Tiefe von 600 µm. Zum Setzen der inneren Wunden wurden die Hautstanzen im *Airlift*-Ständer zunächst aus der Zellkulturplatte gehoben und auf einer motorisierten Plattform unterhalb

des Lasers platziert. Laserlicht mit einer Wellenlänge von 193 nm und einer Energiefluenz von $0,4 \text{ J/cm}^2$ wurde mit einer Schussdosis von insgesamt 600 auf die Hautoberfläche gerichtet. Um ein ausreichend großes Hautareal verwunden zu können, wurde die Hautstanze während des Prozesses automatisch kreisförmig unterhalb des Lasers bewegt. Nachfolgend wurde die verwundete Hautstanze im *Airlift*-Ständer zurück in die ursprüngliche Zellkulturplatte gesetzt. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Wechsel des WEM-Mediums. Anschließend konnte die Wundheilung des inneren *Punches* verfolgt und mit Substanzen oder Zellen gefüllt werden, deren wundheilungsfördernde Kapazitäten zu untersuchen waren.

6.2.12 Einsaat von Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen in den inneren *Punch*

Für die Einsaat von hSGSCs in den inneren *Punch* humaner Hautbiopsien wurde jeweils eine kleine, zu 50–60 % konfluente Zellkulturflasche genutzt. Für die Bestimmung der zur Verfügung stehenden Zellzahl wurde das Zellkulturmedium zunächst entnommen und der Zellrasen mit PBS gespült. Im Anschluss erfolgte eine zweiminütige Inkubation mit Trypsin/EDTA bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, welche mit DMEM abgestoppt wurde. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei $180 \times g$ zentrifugiert (Zentrifuge Typ 5804R). Das gewonnene Zellpellet wurde resuspendiert und $50 \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension wurden wie in Abschnitt 5.2.4 beschrieben für die Zellzahlbestimmung mit dem NucleoCounter® verwendet. Es wurde eine Zweifachbestimmung der Zellzahl durchgeführt und dann der Mittelwert für die Berechnung der Zellaussaat genutzt.

6.2.13 Kryokonservierung der Hautstanzen und HE-Färbung von Kryoschnitten

Das Einbetten der Hautbiopsien erfolgte am letzten Experimenttag. Hierzu wurden die Stanzen aus den *Airlift*-Ständern gelöst und verbleibende Flüssigkeit an der Subkutis vorsichtig abgetupft. Danach wurden die Stanzen aufrecht in Formen mit vorgekühltem Tissue-Tek® gesetzt. Das Einfrieren in Tissue-Tek® erfolgte in der Gasphase von flüssigem Stickstoff, wonach die eingefrorenen Blöcke bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt wurden. Geschnitten wurden die Blöcke am Microm HM 560 mit einer Schichtdicke von $12 \mu\text{m}$. Ab Anschneiden des inneren *Punches* wurde jeder dritte Schnitt auf einen Objektträger überführt.

Für die sich anschließende Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) der Kryoschnitte wurden pro Hautstanze je drei Objektträger mit Querschnitten von der breitesten Stelle des inneren *Punches* ausgewählt. Die Auswahl der Objektträger erfolgte am Mikroskop (Stemi

2000) mithilfe eines Millimetermaßes. Die Kryoschnitte wurden bis zur Färbung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

Hämatoxylin sorgt für eine blauviolette Färbung von Zellkernen und Zytoplasma, das reich an rauem endoplasmatischem Reticulum ist. Restliches Zytoplasma und Fasern, wie beispielsweise Kollagene und elastische Fasern, werden durch Eosin rosa bis rot gefärbt.

In Vorbereitung für die HE-Färbung der Kryoschnitte wurden diese zunächst für 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Anschließend wurden sie für 2–3 min in Aqua dest. gespült. Es folgte die Färbung in Hämalalaun nach Mayer für 5 min. Vor und nach dem anschließenden Bläuen unter fließendem Leitungswasser für mindestens 20 min wurden die Objektträger kurz in Aqua dest. gespült. Es folgte eine 5-s-Färbung in einprozentigem Eosin G, welches mit ein bis zwei Tropfen Essigsäure versehen war. Hiernach wurden die Objektträger ausgiebig mit Aqua dest. gespült und durchliefen anschließend eine aufsteigende Alkoholreihe von 70 %, 80 %, 90 % und 100 % Ethanol. Im 70-prozentigen Alkohol wurde das Eosin herausgespült, bis eine Zartrosa-Färbung der faserigen Strukturen deutlich wurde. In die höheren Alkoholkonzentrationen wurden die Objektträger jeweils etwa zwei- bis dreimal eingetaucht. Die Objektträger wurden zuletzt getrocknet und mit Euparal® eingedeckelt. Vor dem Mikroskopieren wurden sie erneut unter einem Chemikalienabzug zum Trocknen ausgelegt. Dann wurden Bilder in 50-facher Vergrößerung am Mikroskop (SteREO Discovery.V8) aufgenommen.

6.2.14 Bildanalyse der inneren Wunde

Die HE-Aufnahmen der Hautschnitte im Querschnitt der inneren Wunden wurden mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware ImageJ, wie bereits von Sturmheit et al. beschrieben, ausgewertet (Sturmheit et al.). Auf Basis des Maßstabes der Bildaufnahmen wurde in ImageJ die Länge eines Pixels ermittelt und hierauf basierend in Millimeter umgerechnet. Anschließend erfolgte das Vermessen unterschiedlicher Parameter wie in Abbildung 5 dargestellt.

Die Versuche und die Auswertungen, abgesehen von den genannten statistischen Analysen, erfolgten durch die Doktorandin. Eine Verblindung konnte somit nicht erzielt werden.

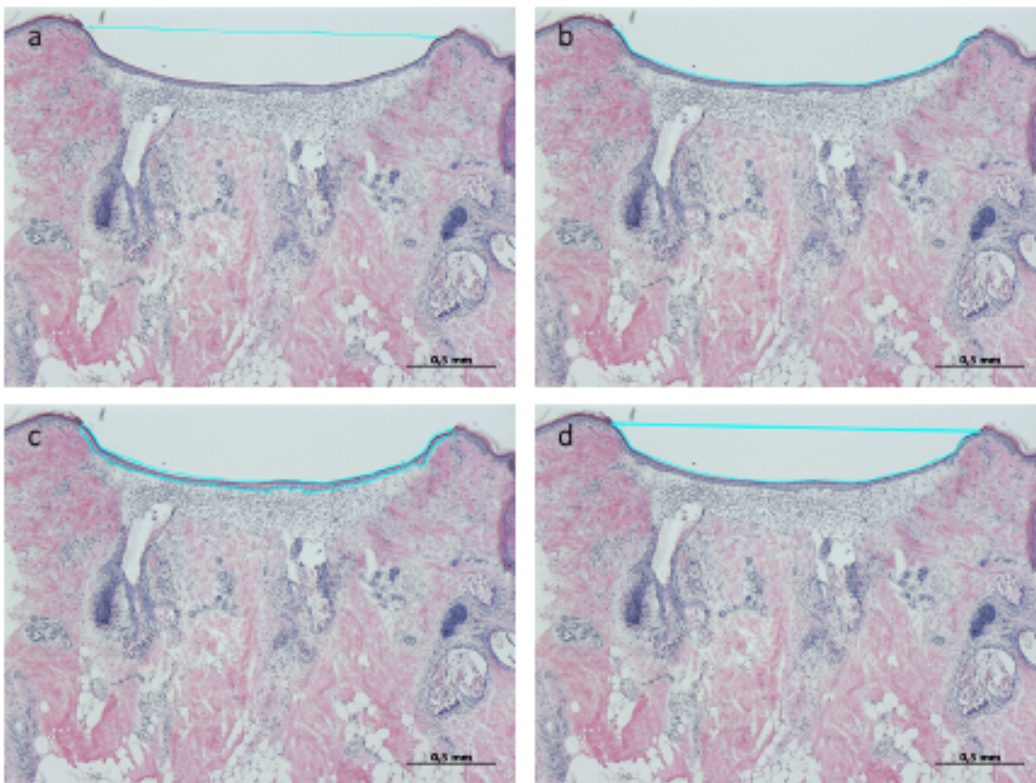


Abbildung 5: Parameter der *Punch-in-a-Punch*-Bildanalyse der HE-Schnitte
Mikroskopie-Aufnahmen einer 4 mm-Hautstanze mit behandelter innerer Wunde in 50-facher Vergrößerung (HE-Färbung). Die vier unterschiedlichen erhobenen Parameter sind Blau markiert. Parameter: Wunddurchmesser des inneren *Punches* (a), Zungenlänge (b) und Zungenfläche (c) der abgrenzenden Zellschicht des inneren *Punches* und die residuale Wundfläche (d) (Maßstab 0,5 mm).

6.2.15 Zytotoxizitäts-Assay

Die Laktatdehydrogenase (LDH) kann als Marker für den Zelluntergang dienen, da sie nahezu ubiquitär vorkommt und bei Verlust der Zellmembranintegrität aus dem Zytosol in die Umgebung der Zelle diffundiert. Somit erlaubt die messbare LDH-Konzentration im Kulturmedium eines *In-vitro*-Versuches Rückschlüsse auf Veränderungen in der Vitalität einer Kultur.

Der Nachweis der LDH-Aktivität erfolgt enzymatisch über eine Redox-Reaktion. Als Coenzym wird Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) genutzt. Die LDH setzt Laktat zu Pyruvat um. Im nächsten Schritt katalysiert die Diaphorase aus dem Reaktionsmix die Reaktion vom farblosen 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid (INT) zu einem rötlichen Formazan. Die Auswertung der Konzentration des rötlichen Formazans erfolgt mittels einer photometrischen Messung.

Proben für den LDH-Assay wurden bei den Mediumwechseln (Tag eins, zwei, vier und sechs nach Inkulturnahme der Hautstanzen) und am letzten Kultivierungstag (Tag acht) asserviert.

Dafür wurde das WEM-Medium aus den Wells der *Punch-in-a-Punch*-Kulturen zunächst in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, die anschließend für 5 min bei 4 °C und 1600 min⁻¹ zentrifugiert wurden (Zentrifuge Typ 5415R). Pro Reaktionsgefäß wurden 800 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die spätere Auswertung bis Versuchsende (maximal sieben Tage) bei 4 °C gelagert.

Am letzten Experimenttag wurde der LDH-Assay (*Cytotoxicity Detection Kit Plus*) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Jede im Experiment gewonnene Medienprobe wurde in Triplikaten von je 100 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurde ein Triplikat frischen WEM-Mediums zur Bestimmung des Medium-spezifischen Blindwertes mitgeführt. Es erfolgte die Zugabe des Reaktionsmixes aus Katalysator und Färbelösung via Multipipette. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde die Stopplösung hinzugegeben und nach leichtem Bewegen der Platte sowie Entfernen von zuvor entstandenen Luftblasen die Messung der optischen Dichte am *Multiplate-Reader* (CLARIOstar®) bei einer Wellenlänge von 492 nm und 690 nm durchgeführt. Zur Ermittlung der LDH-Werte wurde zunächst von jedem Messwert bei 492 nm der Referenzwert bei 690 nm abgezogen. Anschließend wurde der Mittelwert der Triplikate berechnet und von diesem wiederum der WEM-Medium Blindwert subtrahiert.

$$\begin{aligned} \text{Replik } x &= \text{well } x_{492} - \text{well } x_{690} \\ m_x &= \frac{(\text{Replik } 1 + \text{Replik } 2 + \text{Replik } 3)}{3} \\ n_x &= m_x - m_{\text{WEM}} \end{aligned}$$

6.2.16 Statistische Auswertung

6.2.16.1 *In-vitro*-Versuche

Für die Auswertung der Hypothesen wurde am Institut für Medizinische Biometrie und Statistik eine biometrische Beratung im Umfang von ca. 6,5 Stunden in Anspruch genommen. Die statistische Auswertung der Hypothesen wurde in diesem Rahmen von einem Biostatistiker durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt. Für die Überprüfung der Hypothese 1a, dass die Präsenz von Gentamicin oder Fusidinsäure das Proliferationsvermögen reduziert, wurde ein verallgemeinertes lineares gemischtes Modell mit Zufallseffekten genutzt. Zunächst erfolgte ein Logarithmieren der Zellzahlen,

um eine Vergleichbarkeit der Zahlen zu ermöglichen. Die Zufallseffekte umfassten den Messtag und das Replikat. Des Weiteren wurde die Zelllinie als geschachtelter Effekt berücksichtigt (Abb. 25 & 26 im Anhang).

Um zu überprüfen, ob Gentamicin beziehungsweise Fusidinsäure die metabolische Aktivität von hSGSCs reduziert (Hypothese 1b), wurde ebenfalls ein verallgemeinertes lineares gemischtes Modell mit Zufallseffekten als Berechnungsgrundlage herangezogen. Auch hier wurden die Zufallseffekte Messtag, Replikat und die Zelllinie als geschachtelter Effekt angenommen (Abb. 28 & 29 im Anhang).

Des Weiteren wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine positive Korrelation zwischen hSGSC Proliferation und den gemessenen Impedanzwerten existiert (Hypothese 2a). Hierfür wurden die Werte der Replikate der Zellzahlbestimmungen mit denen der Impedanzmessungen, die zum gleichen Zeitpunkt wie die Zellzahlbestimmungen erhoben worden waren, genutzt. Für die beiden Stimulationen Gentamicin und Fusidinsäure wurden jeweils *Repeated-Measurement-Korrelationen* zwischen den Zellzahlen und Impedanzwerten berechnet (Abb. 31 im Anhang).

Außerdem galt es, die Hypothese zu prüfen, ob eine positive Korrelation zwischen der metabolischen Aktivität der hSGSCs und den gemessenen Impedanzwerten besteht (Hypothese 2b). Hier wurden ebenfalls Impedanzmessungen vom Tag der MTT-Assays genutzt (Abb. 31 im Anhang). Auch in diesem Fall wurde für die Stimulationen eine *Repeated-Measurement-Korrelation* zwischen den MTT-Werten und den zugehörigen Impedanzwerten berechnet.

Eine mögliche negative Korrelation zwischen der Proliferation der hSGSCs und der Konzentration von Gentamicin oder Fusidinsäure im Medium wurde in der dritten Hypothese betrachtet. Für die Auswertungen beider Substanzen wurde ebenfalls eine *Repeated-Measurement-Korrelation* berechnet (Abb. 32 im Anhang).

Schlussendlich wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Reduktion des Proliferationsvermögens durch die Antibiotika Gentamicin und Fusidinsäure abhängig von der Konzentration des jeweiligen Antibiotikums ist und dass höhere Konzentrationen die Proliferation in höherem Maße negativ beeinflussen. Hier wurden sowohl die Zahlen der Zellzahlbestimmungen als auch die zu diesem Zeitpunkt erhobenen Impedanzmessungen berücksichtigt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde ein linear gemischtes Modell mit Zufallseffekten genutzt. Feste Effekte waren der Messtag und die Konzentration sowie die

Interaktion zwischen der Konzentration und dem Messtag. Die Replikate stellten Zufallseffekte dar (Abb. 33 im Anhang).

6.2.16.2 *Ex-vivo-Versuche*

Für die Auswertung der *Punch-in-a-Punch*-Versuche wurde GraphPad Prism 9 verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt.

Für die Ergebnisse des LDH-Assays wurden die Mittelwerte der drei technischen Replikate jeweils einer Stanze berechnet. Anschließend wurden die Ergebnisse der drei Stanzen einer Zell- und Mediumskombination als Mittelwert mit Standardfehler aufgetragen und die Flächen unterhalb der Kurven (*Area under the Curve* – AUC) berechnet und ausgewertet.

Für die Auswertung der Wunddurchmesser wurden die drei technischen Replikate jeder Zell- und Mediumskombination herangezogen.

Für einen Vergleich der Stimulationen mit Gentamicin und Fusidinsäure mit der Kontrollgruppe im *Punch-in-a-Punch*-Wundheilungsmodell wurde zunächst eine Normalisierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (hSGSC 14 DMEM-Gruppe) innerhalb eines jeden Versuches durchgeführt. Auf diese Weise wurde der Einfluss der Hautpendenden durch die interne Kontrolle herausgerechnet. Anschließend erfolgte eine Betrachtung der drei Gruppen (Kontroll-, Gentamicin- und Fusidinsäuregruppe) als biologische Replikate über alle Zelllinien hinweg.

Für alle Auswertungen im *Punch-in-a-Punch*-Wundheilungsversuch wurde jeweils eine Brown-Forsythe ANOVA mit Dunnet's-T3-Post-hoc-Test durchgeführt.

7 Ergebnisse

7.1 Antibiotika in klinischer Dosierung

7.1.1 Allgemein

Zunächst wurde die in der Einleitung bereits erläuterte klinische Dosierung der Antibiotika Gentamicin und Fusidinsäure genutzt, um den Einfluss auf die Proliferation, die metabolische Aktivität und die Vitalität der hSGSCs zu untersuchen. Vor den Versuchen wurde eine pH-Messung durchgeführt. DMEM wies einen pH von 7,62 auf, Gentamicin-haltiges DMEM von 7,56 und bei Fusidinsäure-haltigem DMEM wurde ein pH von 7,6 gemessen.

7.1.2 Morphologie

Von jedem untersuchten Well wurde eine mikroskopische Aufnahme vor Aussaat der Zellen, vor dem Mediumwechsel an Tag null des Versuches sowie vor den jeweiligen Zellzahlbestimmungen angefertigt. So konnten die Morphologie und die Konfluenz der Zellen über den Experimentverlauf beobachtet werden.

Abbildung 6 zeigt mikroskopische Aufnahmen der Linie hSGSC 36 von der Kontroll-, der Gentamicin- und der Fusidinsäuregruppe in 50-facher Vergrößerung zu unterschiedlichen Experimentzeitpunkten. Auf den Fotos kann man im Verlauf sowohl bei den Kontrollgruppen (DMEM) als auch bei den Gentamicingruppen eine Zunahme der Zellen im Bildausschnitt erkennen. Morphologisch stellten sich die Zellen in beiden Gruppen sehr ähnlich dar: Die adhären Zellen waren spindelförmig und waren am Tag null noch von einigen abgerundeten, abgestorbenen Zellen begleitet. Im Verlauf nahm die Anzahl der runden Zellen ab, besonders deutlich nach dem Mediumwechsel am Tag vier. Die vereinzelt Zellaggregate nach der Aussaat konnte man auch teils noch zum Ende des Experimentes als dichter besiedelte Areale erkennen. In den letzten Tagen des Experimentes lagen die Zellen generell sehr eng beieinander. Das Ablösen der Zellen gestaltete sich im Verlauf des Experimentes bei beiden Gruppen zunehmend schwieriger.

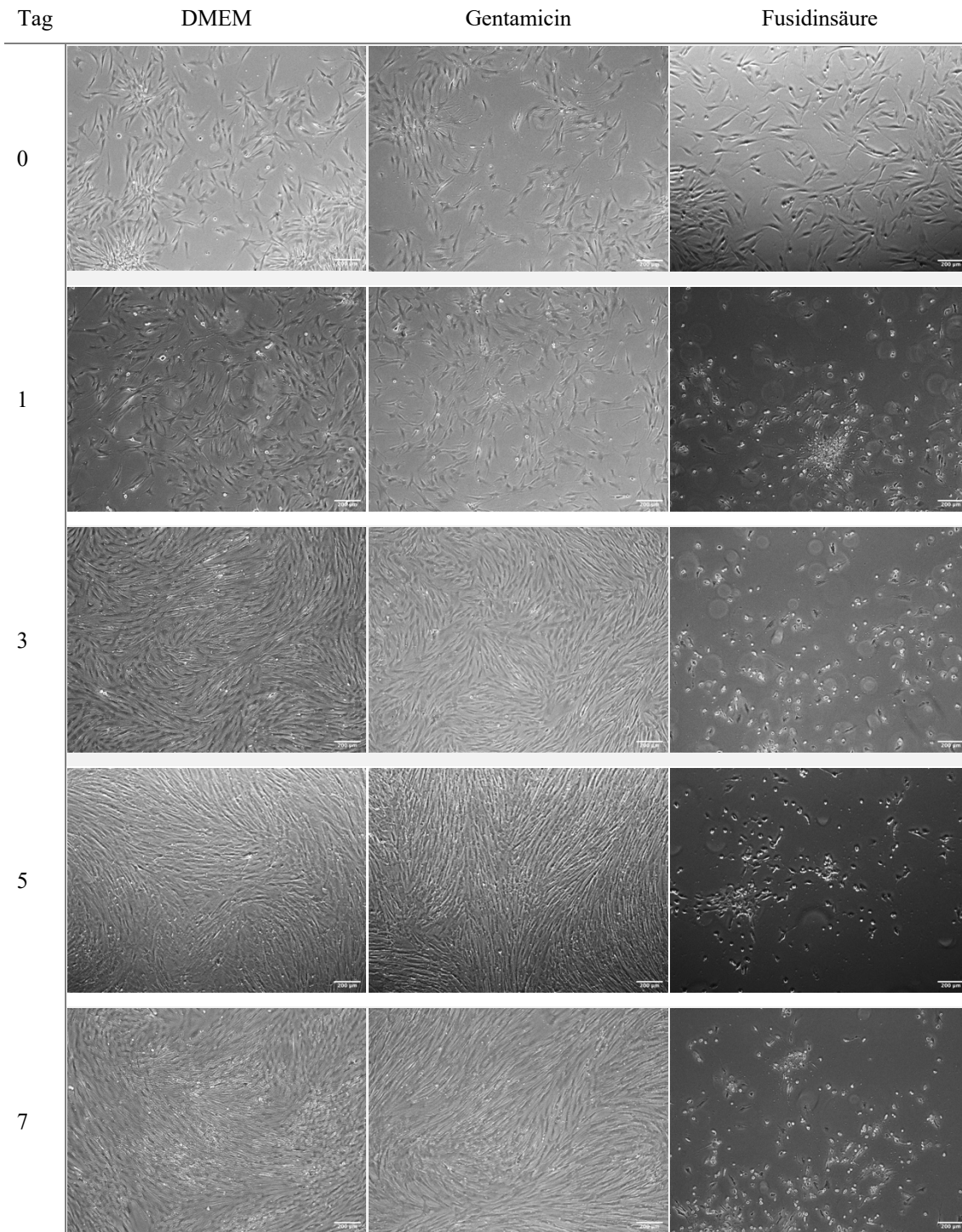


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen der hSGSC 36 (klinische Dosierungen)

Den Zellen der Linie hSGSC 36 wurden mit DMEM (Kontrollgruppe), DMEM mit Gentamicin (1,4 mg/ml) oder DMEM mit Fusidinsäure (1 mg/ml) inkubiert. Direkt nach Zugabe (Tag null) und nach eins, drei, fünf und sieben Tagen wurden mikroskopische Aufnahmen gemacht. In der ersten Spalte sind die Experimenttage nach Substanzzugabe verzeichnet. In den drei folgenden Spalten sind die Aufnahmen der entsprechenden Tage abgebildet. Bei den Aufnahmen der Kontrollgruppe und der Gentamicin-Gruppe ist eine Zunahme der Zellen im Bildausschnitt zu beobachten. In der Fusidinsäure-Gruppe sind nach Substanzzugabe über den Versuchszeitraum nur noch Zellreste zu sehen. Die Letalität dieser Substanz wurde mikroskopisch bereits deutlich (Aufnahmen in 50-facher Vergrößerung, Maßstab entspricht 200 µm).

Die Fusidinsäuregruppen unterschieden sich deutlich von den anderen beiden Gruppen. Bei allen drei Zelllinien war bereits nach 24 Stunden Inkubation mit Fusidinsäure ein deutlicher Unterschied zur Kontrollgruppe ersichtlich. Die Anzahl der adhärenen Zellen nahm ab, wobei gleichzeitig weniger adhärenente, wesentlich kleinere und nicht eindeutig identifizierbare Zellstrukturen auftauchten.

7.1.3 Wachstumskinetiken

Die optische Einschätzung der mikroskopischen Bilder wurde durch die Zellzahlbestimmungen der einzelnen Wells gestützt. Bereits bei den Vorbereitungen für die Versuche konnten interindividuelle Unterschiede beim Wachstum der Zellen beobachtet werden. Bei der Zelllinie 31 konnte beispielsweise, trotz gleicher Anzuchtdauer und gleichen Voraussetzungen nach Kryo-Konservierung, nicht die gleiche Ausgangszellzahl erzielt werden wie bei den Zelllinien 33 und 36. Daher wurden die technischen Replikate der Zellzahlbestimmungen der hSGSC 31 auf fünf gekürzt.

Durch regelmäßige Zellzahlbestimmungen sollte untersucht werden, ob die Proliferation durch die Zugabe von Gentamicin oder Fusidinsäure beeinflusst wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 grafisch dargestellt.

Die Behandlung mit Fusidinsäure führte bei allen drei Zelllinien innerhalb der ersten 24 Stunden nach Zugabe der Substanz zu einer Depletion der Zellzahl. Es wurden alle genutzten Zelllinien im gleichen Maße negativ in ihrer Proliferation beeinflusst.

Im Hinblick auf die Untersuchung der Frage, ob die Präsenz von Gentamicin oder Fusidinsäure einen Einfluss auf das Proliferationsvermögen der hSGSCs hat, wurde im Rahmen der statistischen Auswertung jeweils ein verallgemeinertes linear gemischtes Modell zur Berechnung herangezogen (Hypothese 1a). Die genutzten Modelle beschrieben die Daten gut (Abb. 25 & 26 im Anhang, R^2 Gentamicin 0,939, R^2 Fusidinsäure 0,688). Für die Berechnungen wurden die Replikate der Zellzahlbestimmungen als Zielgröße genutzt (Abb. 25 & 26 im Anhang). Der Unterschied zwischen den Zellzahlen der Kontrollgruppe und der Gentamicin-Gruppe ist signifikant (der Koeffizient der logarithmierten Werte betrug $-0,238$, zurücktransformiert ca. $0,788$; $p < 0,001$). Auch der Zusatz von Fusidinsäure hatte einen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe (Koeffizient = $-63216,40$; $p < 0,001$).

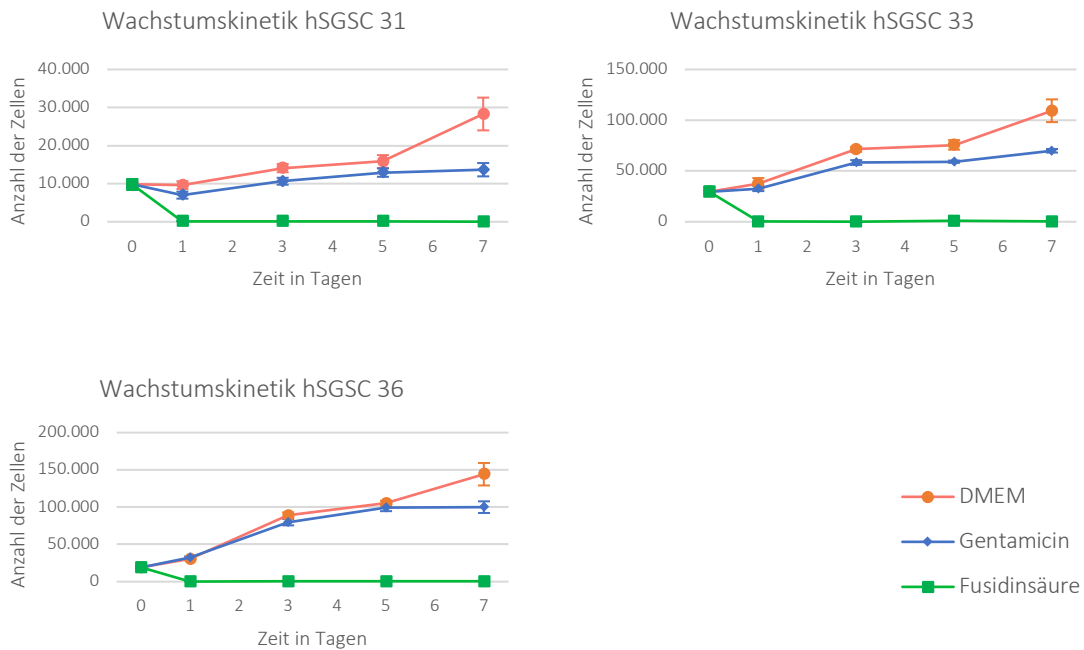


Abbildung 7: Wachstumskinetiken der hSGSCs (klinische Dosierungen)

Abgebildet sind die Mittelwerte von fünf technischen Replikaten (hSGSC 31) beziehungsweise sechs technischen Replikaten (hSGSC 33 und 36) sowie die Standardfehler. Nach Aussaat der Zellen am Tag null wurde die Zellzahl an den Tagen eins, drei, fünf und sieben bestimmt. Am Tag vier wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Beim Vergleich der Kontroll- und Gentamicin-Gruppen bot sich ein ähnliches Bild bis etwa Tag fünf. Während die Zellzahlen der DMEM-Gruppen von Tag fünf auf Tag sieben sprunghaft anstiegen, stagnierten die Gentamicin-Gruppen in diesem Versuchsabschnitt in ihrer Proliferation nahezu komplett. Die Zellzahl der Fusidinsäuregruppen sank nach Zugabe der Substanz auf nicht mehr messbare Werte.

7.1.4 Metabolische Aktivität

Die metabolische Aktivität der Zellen wurde mittels MTT-Assay bestimmt, um die Vitalität und Entwicklung der Zellpopulation unter Exposition von Gentamicin und Fusidinsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMEM) über den Zeitraum des Versuches zu verfolgen.

Bei der Kontrollgruppe aller Zelllinien war ein Anstieg der optischen Dichte über die Zeit zu sehen, was einen Anstieg der metabolischen Aktivität der Zellpopulation bedeutete. Der Anstieg war allerdings unterschiedlich stark (Abb. 8).

Die Gentamicin-Gruppen wiesen eine Zunahme der optischen Dichte über den Experimentzeitraum auf. Im Zeitraum vom fünften bis zum siebten Versuchstag zeigte sich im Gegensatz zu den Kontrollgruppen jedoch eine Stagnation oder sogar Abnahme der optischen Dichte.

Nach Zugabe von Fusidinsäure-haltigem Medium konnte bei keiner Zelllinie eine messbare metabolische Aktivität im gewählten Versuchszeitraum (ein bis sieben Tage) nachgewiesen werden (Abb. 8).

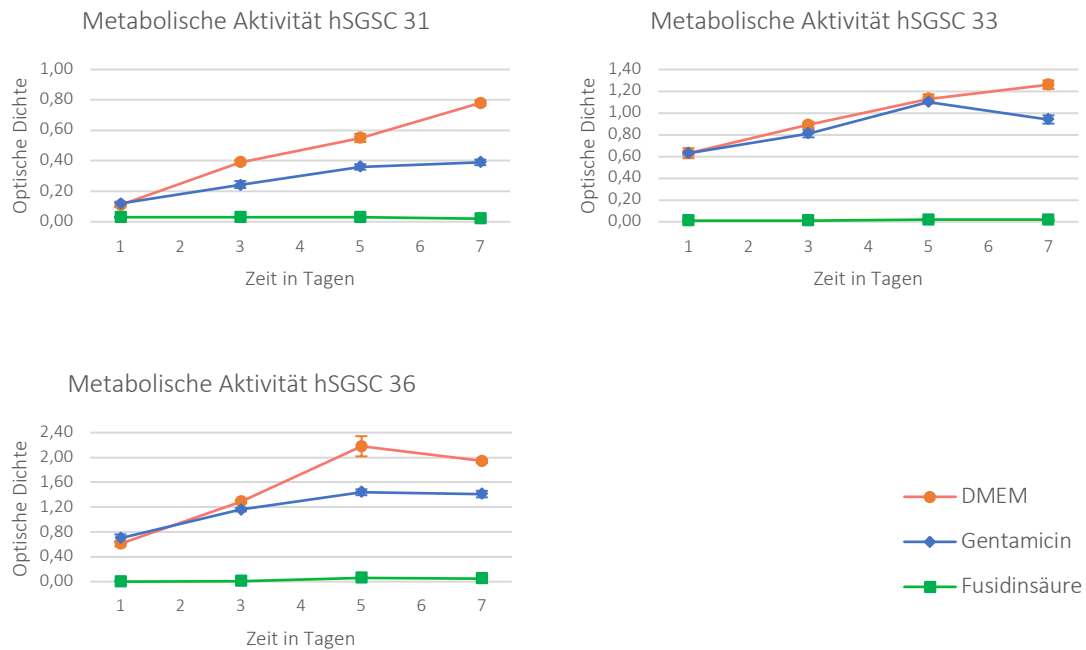


Abbildung 8: Metabolische Aktivität der hSGSCs (klinische Dosierungen)

Abgebildet sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung von vier technischen Replikaten der Zelllinien hSGSC 31, 33 und 36 mit Standardfehler. Während des Experimentzeitraumes kam es zu einer Zunahme der metabolischen Aktivität der Kontroll- und Gentamicin-Gruppen, wobei letztere eine Stagnation oder Abnahme nach dem erneuten Mediumwechsel am Tag vier zeigte. Während des gesamten Experimentverlaufes war keine metabolische Aktivität der Fusidinsäuregruppen bestimmbar.

Die Daten, die zur Berechnung des verallgemeinerten linear gemischten Modells mit Zufallseffekten für die Hypothese 1b herangezogen wurden, zeigten eine reduzierte metabolische Aktivität der Zellen, die mit Gentamicin im Medium kultiviert worden waren (Abb. 27 im Anhang).

Das genutzte Modell wurde auf Grundlage der standardisierten MTT-Messungen als Zielgröße erstellt und beschreibt die Daten sehr gut (Abb. 28 & 29 im Anhang, R^2 0,919 (Gentamicin), R^2 0,738 (Fusidinsäure)). In dem genutzten Modell wurde ein signifikant niedrigerer metabolischer Umsatz der Gentamicin-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich (Koeffizient $-0,385$, zurücktransformiert ca. $-1,082$; $p < 0,001$). Auch die metabolische Aktivität der Zellen zwischen der Fusidinsäure- und Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich (Koeffizient $0,192$, zurücktransformiert ca. $-0,957$; $p < 0,001$). Das Zusetzen von Fusidinsäure führte zu keiner messbaren metabolischen Aktivität der Zellen. Die metabolische Aktivität wurde nach Zugabe der Antibiotika also signifikant beeinflusst, wobei in den Gentamicin-Gruppen im Gegensatz zu den Fusidinsäuregruppen überhaupt noch Aktivität vorhanden war.

7.1.5 Impedanzmessungen

Die Impedanzmessungen wurden durchgeführt, um eine Korrelation dieser Messungen zu den Zellzahlbestimmungen beziehungsweise der metabolischen Aktivität der Zellen zu prüfen und somit eine zusätzliche Bestätigung für die anderen Messwerte zu erreichen (Hypothesen 2a/b). Außerdem konnte mit dieser Methode eine kontinuierliche Beobachtung der Zellentwicklung erfolgen.

In Abbildung 9 sind die Verläufe der dimensionslosen Zellindizes von den elektrischen Impedanzmessungen aufgetragen. Es werden spezielle mit Elektroden versehene 96-Wellen-Platten genutzt, über die eine Änderung der Impedanz durch Isolationseigenschaften der Membranen adhärenter Zellen registriert werden kann.

Bei den Fusidinsäuregruppen sanken die Zellindizes bereits innerhalb von 24 Stunden nach der initialen Exposition mit dem Antibiotikum auf Nullwerte. Die Zellindizes der Kontroll- und Gentamicin-Gruppen zeigten zunächst eine Zunahme dieser im Experimentverlauf. Nach dem Mediumwechsel am Tag vier kam es zu einem Abfall beziehungsweise zu einer Stagnation in den Gentamicin-Gruppen, während die DMEM-Gruppen weiter anstiegen.

Im Verlauf der Impedanzmessungen war zu sehen, dass vor dem Mediumwechsel am Tag null alle Gruppen ähnliche Zellindizes hatten und die Veränderungen erst nach Zugabe der verschiedenen Medien auftraten. Um die Korrelation von Impedanzmessung und Zellzahlbestimmung zu prüfen, wurden die Impedanzwerte genutzt, die zum Zeitpunkt der Zellzahlbestimmung gemessen wurden (Hypothese 2a). Die zugrunde liegenden Daten finden sich in Abbildungen 24, 27 und 30 im Anhang. Die Berechnungen durch eine *Repeated-Measurement*-Korrelation ergaben eine hohe positive Korrelation zwischen den Zellzahlbestimmungen und dem Zellindex bei der Kontrollgruppe ($r = 0,84$; $p = 0,002$) und Gentamicin ($r = 0,68$; $p < 0,001$). Für Fusidinsäure hingegen konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden ($r = -0,13$; $p = 0,596$; Abb. 31 im Anhang).

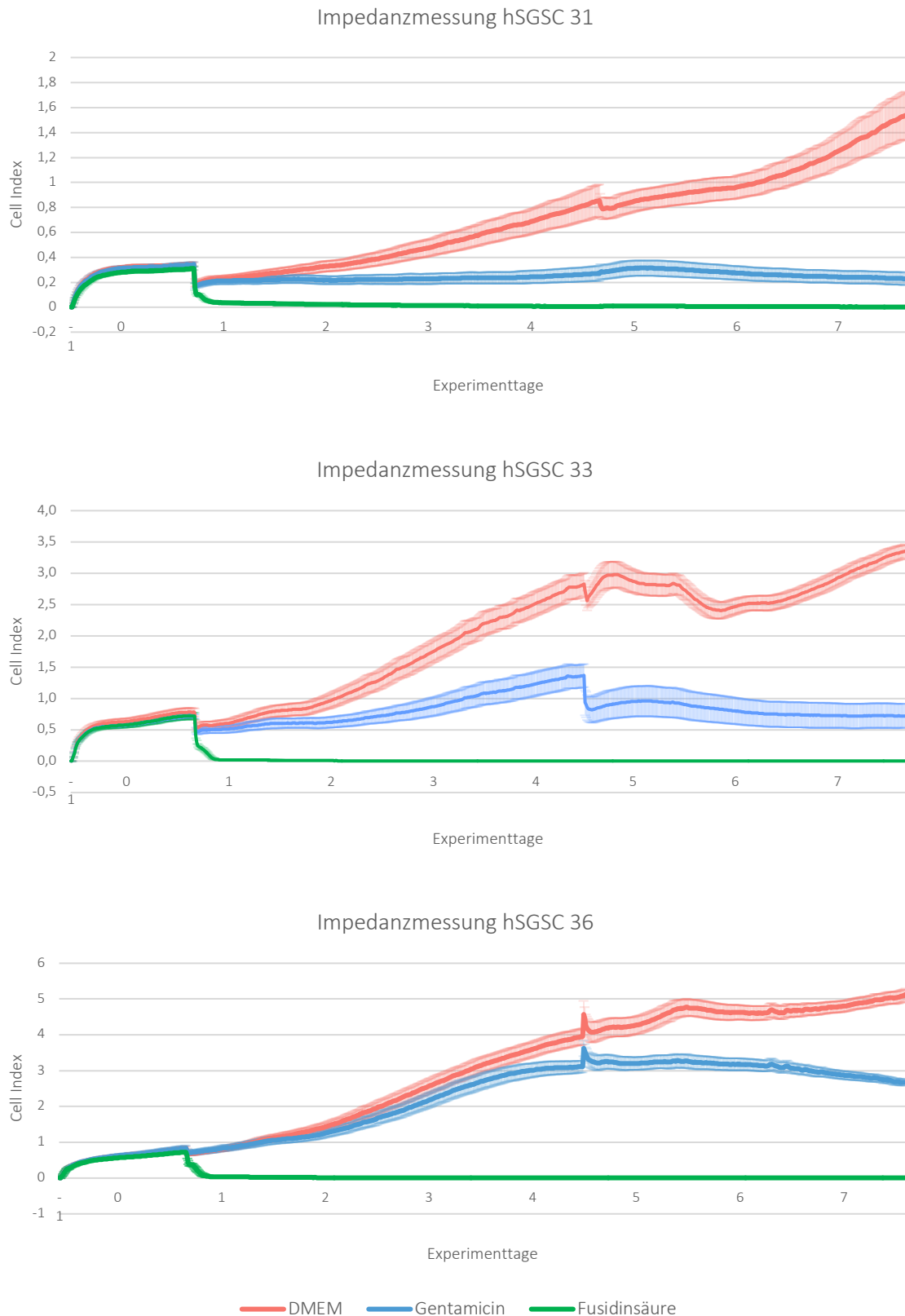


Abbildung 9: Impedanzmessungen der hSGSCs (klinischen Dosierungen)
 Aufgetragen sind die Mittelwerte des dimensionslosen Zellindexes von sechs technischen Replikaten mit Standardfehlern über sieben Tage. Die mitgeführten Mediumkontrollen zum Ausschluss von Wechselwirkungen zwischen Elektroden und den unterschiedlichen Medien wurden zugunsten der Übersichtlichkeit weggelassen, da sie um Nullwerte schwankten.

Um eine mögliche Korrelation zwischen den Impedanzmessungen und der metabolischen Aktivität zu überprüfen (Hypothese 2b, Abb. 31 im Anhang), wurde ebenfalls eine *Repeated-Measurement*-Korrelation berechnet. Hierbei ließ sich nachweisen, dass eine hohe positive Korrelation zwischen der metabolischen Aktivität und dem Zellindex bei der Kontroll- ($r = 0,98$; $p < 0,001$) und bei der Gentamicingruppe ($r = 0,69$; $p = 0,026$) vorlag. Für Fusidinsäure hingegen konnte keine statistisch signifikante Korrelation berechnet werden ($r = -0,37$; $p = 0,299$).

Für die Kontroll- und Gentamicingruppen kann also die Zellproliferation und die metabolische Aktivität der Zellen mit dieser Methode verfolgt werden. Bei den Gruppen mit Fusidinsäure-Behandlung ist dies nicht der Fall.

7.1.6 Durchflusszytometrische Analysen

7.1.6.1 Proliferationsassay

Um den Unterschied bezüglich der Proliferation zwischen der Gentamicin- und der Kontrollgruppe etwas genauer zu betrachten, wurde ein Proliferationsassay unter Antibiotikaeinfluss mittels Durchflusszytometrie über neun Tage durchgeführt. Über den Experimentverlauf fand durch die Zellproliferation eine Verdünnung des in den Zellen befindlichen Farbstoffes statt, welche durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der in der Durchflusszytometrie analysierten Zellen anschließend ausgewertet werden konnte. Fusidinsäure wurde in diesem Versuchsaufbau nicht berücksichtigt, da die vorhergehenden Versuche mit der klinischen Dosierung bereits die Letalität des Wirkstoffes gezeigt hatten. Es wurde des Weiteren ein längerer Zeitrahmen gewählt, da sich die Unterschiede zwischen den Gentamicin- und Kontrollgruppen in den Wachstumskinetiken verstärkt zu späteren Zeitpunkten darstellten.

Die MFI im prozentualen Verhältnis zum Ausgangswert ist in Abbildung 10 dargestellt. Nach drei Tagen Kultivierung sank die MFI sowohl bei den Kontroll- als auch den Gentamicingruppen bereits auf einen Bruchteil des Ausgangswertes ab. Den höchsten prozentualen Anteil und damit die geringste Proliferation wies die Zelllinie 31 auf. Bei dieser Zelllinie war bereits am dritten Experimenttag ein größerer Unterschied zwischen Kontroll- und Gentamicingruppe als bei den anderen Zelllinien zu erkennen. Bei den hSGSC 33 und hSGSC 36 war dies erst ab dem sechsten Tag der Fall. Eine ausgeprägte Proliferation einer Gentamicingruppe konnte nur bei der Zelllinie 36 am Tag drei beobachtet werden.

An den Tagen sechs und neun vereinheitlichte sich das Bild bei allen Zelllinien dahingehend, dass die Kontrollgruppen eine niedrigere MFI und damit eine höhere Proliferation als die Gentamicingruppen in diesem Zeitraum zeigten. Somit konnte gezeigt werden, dass Zellen unter Gentamicin-Einfluss mit zunehmender Kultivierungsdauer immer weniger proliferierten. Gestützt wurde diese Beobachtung durch eine parallel durchgeführte Zellzahlbestimmung (Tabelle 4 im Anhang).

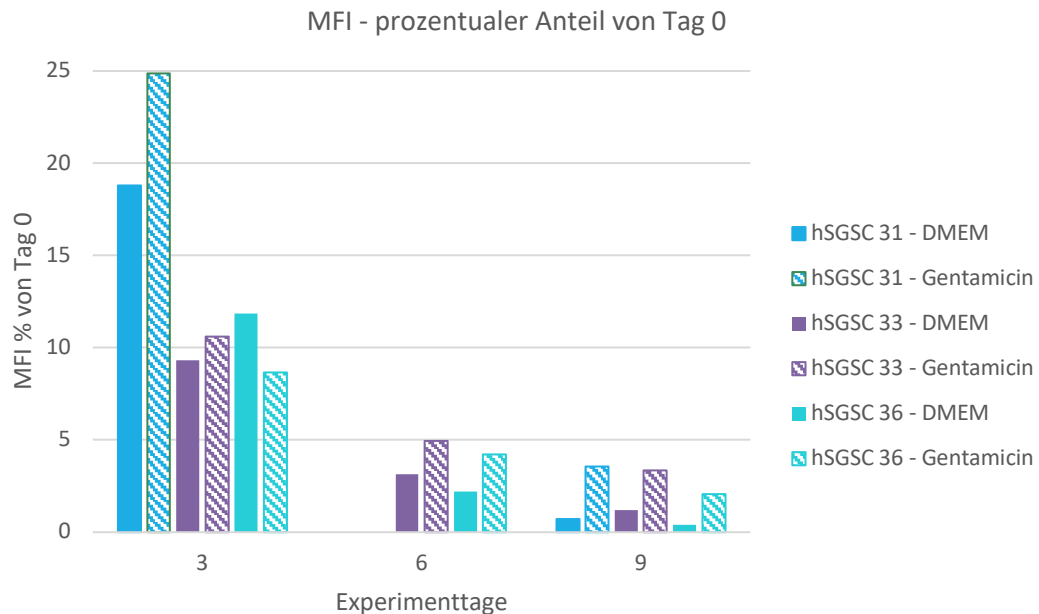


Abbildung 10: Mittlere Fluoreszenzintensität Proliferationsassay über neun Tage

Aufgetragen ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) im prozentualen Verhältnis zum Ausgangswert an Tag null nach drei, sechs und neun Tagen (hSGSC 33 und hSGSC 36) nach Medium-Zugabe beziehungsweise nach drei und neun Tagen bei der Zelllinie hSGSC 31. Die MFI nahm ab, wobei dies bei den Kontrollgruppen ausgeprägter zu sehen war. Dies bedeutet, dass die Kontrollgruppen in einem höheren Maße als die Gentamicingruppen proliferierten.

7.1.6.2 Vitalität

Die Untersuchung mit Annexin und PI mittels Durchflusszytometrie sollte dazu dienen, das Verhältnis zwischen lebenden, toten und sich in Apoptose befindlichen Zellen zu ermitteln. Um eine ausreichende Anzahl an Zellen für die Auswertung zu generieren, wurden die Replikate zusammengefügt. Die Daten eignen sich daher nicht für eine statistische Analyse.

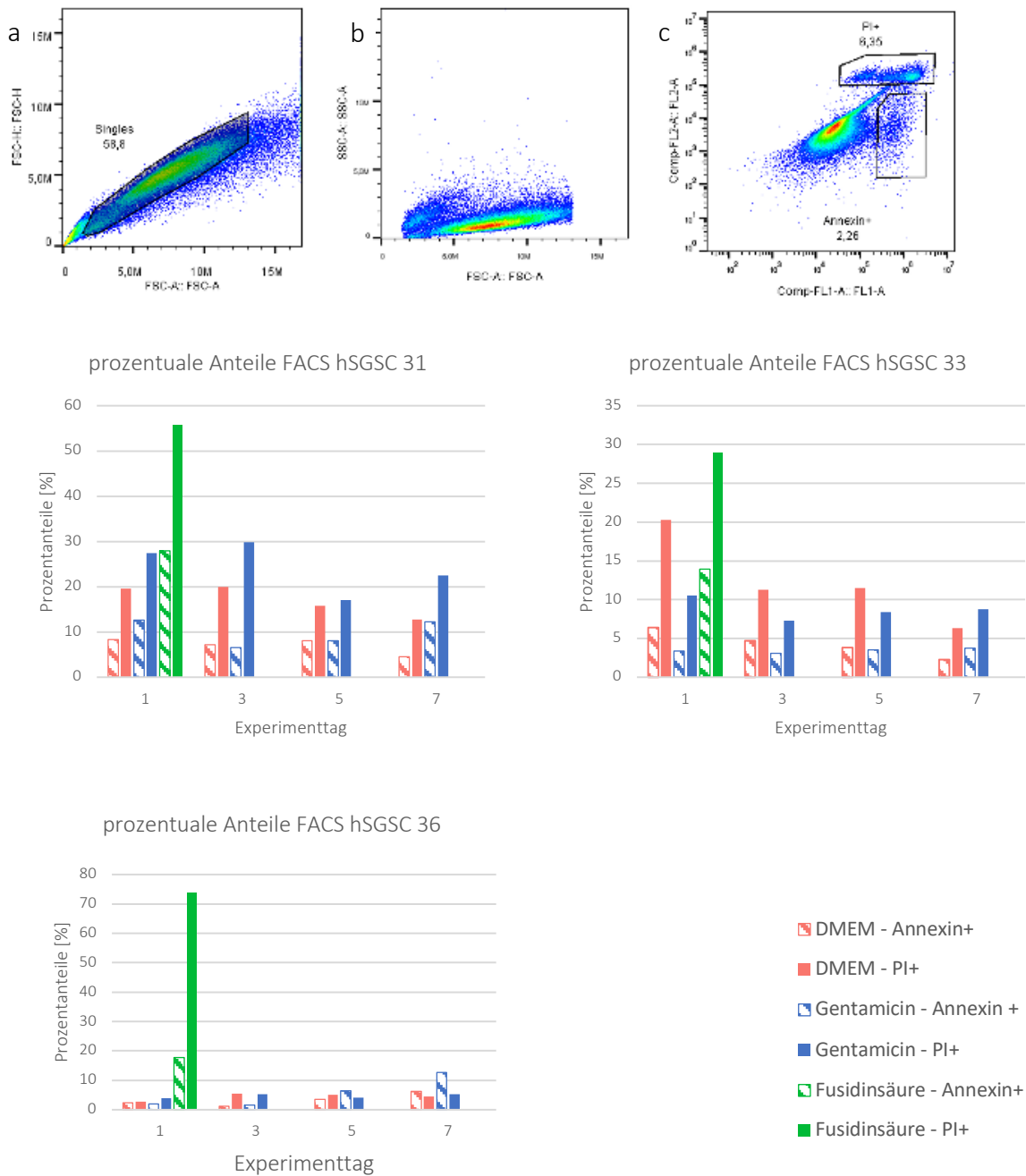


Abbildung 11: Vitalitätsassay Annexin V und PI (klinische Dosierung)

Die Zellen hSGSC 33 wurden nach Behandlung mit Gentamicin, Fusidinsäure oder DMEM (Kontrolle) mit Annexin-V-FITC und PI markiert und per Durchflusszytometrie untersucht. In Abb. 11a ist das Gating der vereinzelteten Zellen zu sehen. In Abb. 11b ist eine Darstellung des *dot blots* von *Forwardscatter* (FSC) gegen den *Sidescatter* (SSC) gezeigt. Die Punktwolken der PI-positiven Zellen am oberen äußeren Rand und die Annexin-positiven Zellen rechts außen sind in Abb. 11c zu sehen. Unten: Bei der Berechnung der prozentualen Anteile von Annexin- und PI-positiver Zellen in der Durchflusszytometrie ergab sich kein eindeutiger Unterschied zwischen den Kontroll- und Gentamicin-Gruppen. Bei den Fusidinsäuregruppen konnten bereits am ersten Tag nur geringe Gesamtzahlen an Ereignissen detektiert werden, von denen bereits ein hoher Anteil Annexin- beziehungsweise PI-positiv war. Aufgrund der wenigen Ereignisse wurden die Ergebnisse der restlichen drei Tage nicht im Diagramm berücksichtigt.

In Abbildung 11 sind beispielhaft die *dot-plot*-Grafiken und das *Gating* für die Analyse der Zelllinie 33, sowie die Quantifizierung der prozentualen Anteile der PI- beziehungsweise Annexin-positiven Fraktionen aller drei Zelllinien abgebildet.

Bei den DMEM- und Gentamicingruppen ergaben sich bei den unterschiedlichen Zelllinien kaum Unterschiede zwischen den Versuchstagen. Prozentual waren generell meistens mehr PI-positiv als Annexin-positiv Zellen an einem Versuchstag zu sehen.

Bei den mit Fusidinsäure behandelten Zellen konnten am ersten Versuchstag lediglich vereinzelte Fluoreszenzsignale detektiert werden. Diese geringe Anzahl an Ereignissen wiesen, wie in Abbildung 11 zu sehen, einen erheblichen Anteil Annexin- beziehungsweise PI-positiver Signale auf. Die Ergebnisse der weiteren Versuchstage wurden bei abnehmender Anzahl von Fluoreszenzsignalen und somit geringer Aussagekraft nicht aufgetragen.

7.2 Dosisanpassungen der Antibiotika

Um eine mögliche Nutzung der Antibiotika genauer zu untersuchen, wurden Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen von Gentamicin beziehungsweise Fusidinsäure durchgeführt. Gentamicin wurde im Hinblick auf eine topische Hochdosistherapie weitergehend untersucht, weil bei den vorhergehenden Experimenten eine Proliferation der Zellen in Gentamicin-haltigem Medium in topischer Dosierung möglich gewesen ist. Da bei der genutzten Konzentration von 1 mg/ml Fusidinsäure in den vorhergehenden Versuchen die Zellen abgestorben sind, wurde der Fokus bei dieser Substanz auf eine Einschätzung niedrigerer Dosen für die Letalität der Zellen gelegt.

7.2.1 Gentamicin

7.2.1.1 Wachstumskinetik

Die Zugabe von Gentamicinsulfat in den Konzentrationen 0,14 mg/ml, 0,7 mg/ml und 1,4 mg/ml (klinische Dosierung) führten über den gesamten Experimentzeitraum zu einer Proliferation der Zellen (Abb. 12, Abb. 32 & 33 im Anhang). Der Mediumwechsel an Tag vier hatte zunächst eine Stagnation der Proliferation bei allen Gentamicinkonzentrationen zur Folge, die bei den geringeren Dosen aber nur vorübergehend war. Die Versuchsgruppe der Konzentration 2,1 mg/ml erholte sich von dieser Stagnation nicht mehr und blieb bis Tag sieben annähernd gleich. Lediglich die Versuchsgruppe der höchsten Konzentration von 2,8 mg/ml zeigte nach einer ansteigenden Zellzahl bis Tag fünf eine folgende Abnahme der

Zellzahl bis Tag sieben. Generell proliferierten die Zellen demnach trotz Zugabe von Gentamicin. Nur mit einer höheren Dosierung des Antibiotikums ab der topischen Dosis ist also im untersuchten Zeitraum eine geringere Proliferation verknüpft.

Die Berechnung einer *Repeated-Measurement*-Korrelation der Datensätze hinsichtlich Hypothese 3 erbrachte eine signifikante negative Korrelation zwischen der Zellzahlbestimmung und der Konzentration von Gentamicin ($r = -0,449$; $p < 0,001$; Abb. 32 im Anhang). Das Ergebnis des linear gemischten Modells zur Überprüfung von Hypothese 4 ergab, dass die Konzentration allein keinen signifikanten Unterschied verursachte (Koeffizient 1644,7; $p = 0,597$). Signifikante Einflussfaktoren waren der Tag der Zellzahlbestimmung (Koeffizient 14720,1; $p < 0,001$) und die Interaktion zwischen den Konzentrationen und dem Tag der Erhebung der Wachstumskinetik (Koeffizient $-3931,6$; $p < 0,001$; Abb. 33 im Anhang). Dies bedeutet, dass die Tage sich unterschieden, also die Dauer der Exposition und in diesem Zusammenhang auch die Konzentration einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hatte.

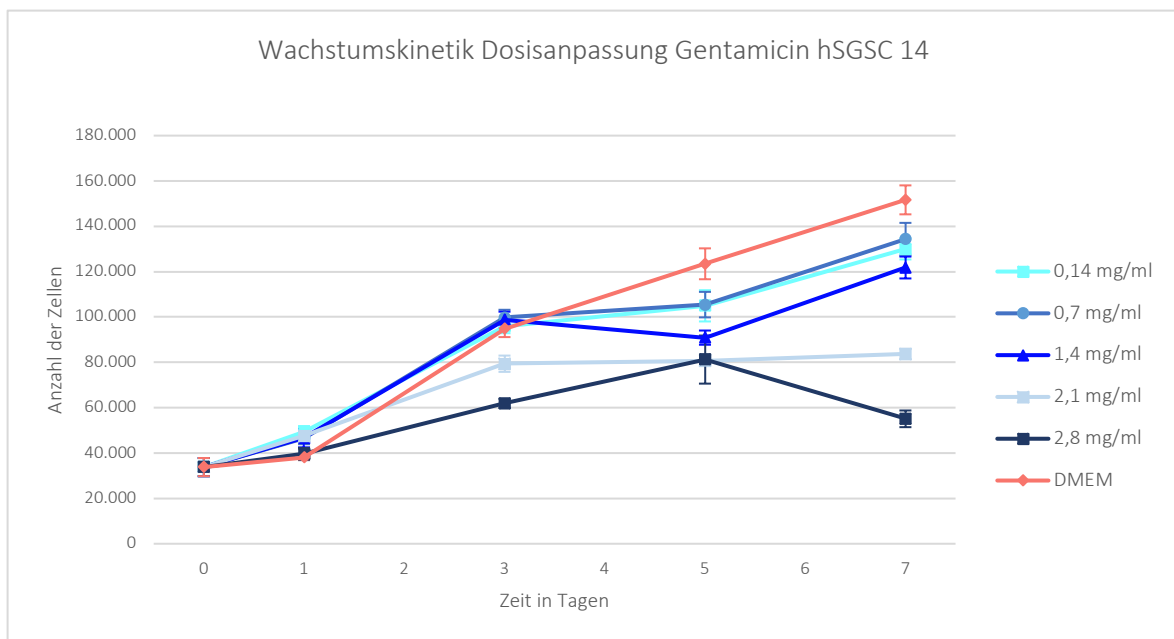


Abbildung 12: Wachstumskinetiken hSGSC 14 (Dosisanpassung Gentamicin)

Die Proliferation der hSGSC 14 wurde unter Einfluss von fünf unterschiedlichen Konzentrationen von Gentamicin im Medium sowie der Kontrollgruppe, nur mit DMEM, untersucht. Es wird der Mittelwert und die Standardfehler von jeweils sechs technischen Replikaten dargestellt. Eine Proliferation war bei allen Versuchsgruppen zu beobachten. Nach dem erneuten Mediumwechsel an Tag vier war eine weitere Proliferation bei den drei niedrigsten Dosierungen (0,14 mg/ml, 0,7 mg/ml, 1,4 mg/ml) zu verzeichnen. Die beiden höchsten Dosierungen stagnierten in ihrem Wachstum (2,1 mg/ml) oder zeigten eine niedrigere Zellzahl als an Tag drei (2,8 mg/ml).

7.2.1.2 Impedanzmessung

Bezüglich der Impedanzmessung wird in Abbildung 13 ersichtlich, dass bis zur Zugabe von Gentamicin an Tag null ein ähnlicher Zellindex über alle Gruppen erreicht wurde. Ab der Zugabe von Gentamicin an Tag null unterschieden sich die Werte der Gruppen, wobei sich bis Tag vier größtenteils nur ein Trend abzeichnete. Lediglich die höchste Konzentration von 2,8 mg/ml wies frühzeitig Zellindizes unterhalb derer der anderen Gruppen auf.

Die geringsten Konzentrationen (0,14 mg/ml und 0,7 mg/ml) verliefen nahezu identisch mit der Kontrollgruppe (DMEM) bis zum Mediumwechsel am Tag vier. Die mittleren Konzentrationen (1,4 mg/ml und 2,1 mg/ml) wiesen ebenfalls einen ähnlichen Verlauf auf, jedoch mit niedrigeren Zellindizes. Nach der erneuten Zugabe von Gentamicin am Tag vier erholte sich die Versuchsgruppe mit der Konzentration 0,14 mg/ml zunächst ähnlich gut wie die Kontrollgruppe vom Mediumwechsel. Sie erreichte jedoch nicht wieder das Niveau des durchschnittlichen Zellindex der Kontrollgruppe. Bei den Konzentrationen 0,7 mg/ml und 1,4 mg/ml führte der Mediumwechsel zu einer Stagnation der Zellindizes. Bei den beiden höchsten Konzentrationen (2,1 mg/ml und 2,8 mg/ml) kam es zu einem Absinken der Zellindizes über die restliche Versuchszeit.

Daraus ergibt sich, dass bei einer repetitiven Gabe auch geringe Dosierungen die Proliferation der Zellen beeinträchtigen können. Die statistische Berechnung eines linear gemischten Modells der Ergebnisse der Impedanzmessungen war ähnlich wie die der Wachstumskinetik unter Gentamicin-Einfluss. Abhängig von der Konzentration ergab sich kein Unterschied in den Zellindizes (Koeffizient $-0,0747$; $p = 0,345$). Signifikante Einflussfaktoren waren jedoch auch hier der Tag der Messung der Zellindizes (Koeffizient $0,363$; $p < 0,001$) und die Interaktion zwischen den Konzentrationen und dem Tag der Messung der Zellindizes (Koeffizient $-0,108$; $p < 0,001$; Abb. 33 im Anhang). Dies bedeutet, dass auch hier die zeitliche Dauer der Stoffexposition und dann in diesem Zusammenhang auch die Konzentration entscheidend war.

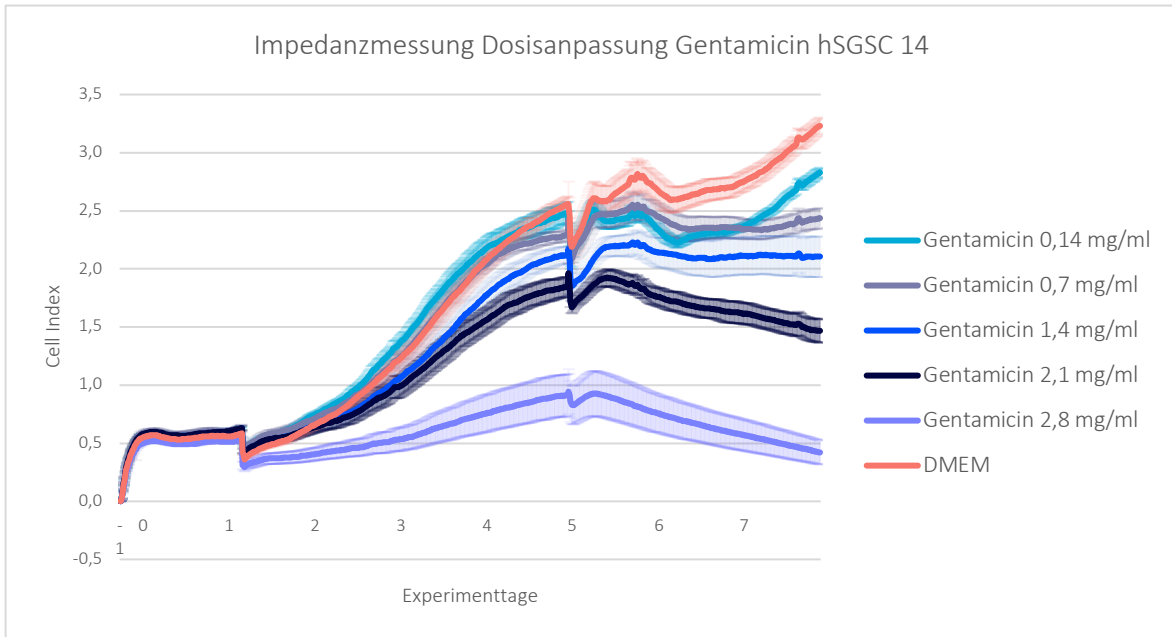


Abbildung 13: Impedanzmessung hSGSC 14 (Dosisanpassung Gentamicin)

Mit den hSGSC 14 wurde unter Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen von Gentamicin im Medium im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMEM) die Impedanz gemessen. Es werden der Mittelwert und die Standardfehler von jeweils sechs technischen Replikaten dargestellt. Es erfolgte zunächst eine Zunahme der Zellindizes bei allen Gruppen. Die niedrigste Dosierung (0,14 mg/ml) wies ähnliche Ergebnisse wie die Kontrollgruppe auf. Nach dem Mediumwechsel am Tag vier stagnierten die restlichen Gruppen (0,7 mg/ml und 1,4 mg/ml), oder zeigten eine Abnahme des Zellindexes (2,1 mg/ml und 2,8 mg/ml). Die Zellindizes der höchsten Dosierung (2,8 mg/ml) waren deutlich niedriger als die der anderen Gruppen.

7.2.2 Fusidinsäure

7.2.2.1 Wachstumskinetik

Mittels Zellzahlbestimmung wurde die Wachstumskinetik der Kontrollgruppe und Fusidinsäuregruppen über den Experimentzeitraum von sieben Tagen bestimmt (Abb. 14). Bei der Kontrollgruppe sowie den beiden niedrigsten Konzentrationen von Fusidinsäure (0,05 mg/ml und 0,1 mg/ml) kam es zu einer Proliferation über den Experimentzeitraum. Die Kontroll- und 0,05-mg/ml-Fusidinsäuregruppe wiesen eine ähnliche Wachstumskinetik auf. Die Proliferation der Versuchsgruppe mit 0,1 mg/ml Fusidinsäure war nicht so ausgeprägt wie bei den beiden vorhergenannten Gruppen.

Die Zugabe von 0,25 mg/ml Fusidinsäure führte bis Tag drei zunächst zu einer stetigen Abnahme der Zellzahl. Nach dem Mediumwechsel an Tag vier erholte sich die Zellzahl dieser Gruppe nicht mehr und nahm erheblich ab. Die beiden höchsten Konzentrationen wiesen über den Versuchsverlauf keine Proliferation auf, die Zellen starben demnach ab.

Die repetitive Gabe von Fusidinsäure führte folglich ab einer Konzentration von 0,25 mg/ml zu einem Absterben der hSGSCs. In diesem Versuchsaufbau war die Proliferation der Zellen bis zu einer Konzentration von 0,1 mg/ml Fusidinsäure möglich.

Die Berechnung einer *Repeated-Measurement*-Korrelation der Datensätze hinsichtlich Hypothese 3 ergab eine signifikante negative Korrelation zwischen den Zellzahlbestimmungen und der Konzentration von Fusidinsäure ($r = -0,667$; $p < 0,001$; Abb. 32 im Anhang).

Die Berechnung eines linear gemischten Modells zur Überprüfung von Hypothese 4 hinsichtlich Fusidinsäure ergab, dass die Konzentration (Koeffizient -32580 , $p = 0,033$), der Tag der Zellzahlbestimmung (Koeffizient 7923 ; $p < 0,001$) und die Interaktion zwischen der Konzentration und dem Tag der Zellzahlbestimmung (Koeffizient -11224 ; $p < 0,001$) signifikante Einflussfaktoren darstellten (Abb. 33 im Anhang).

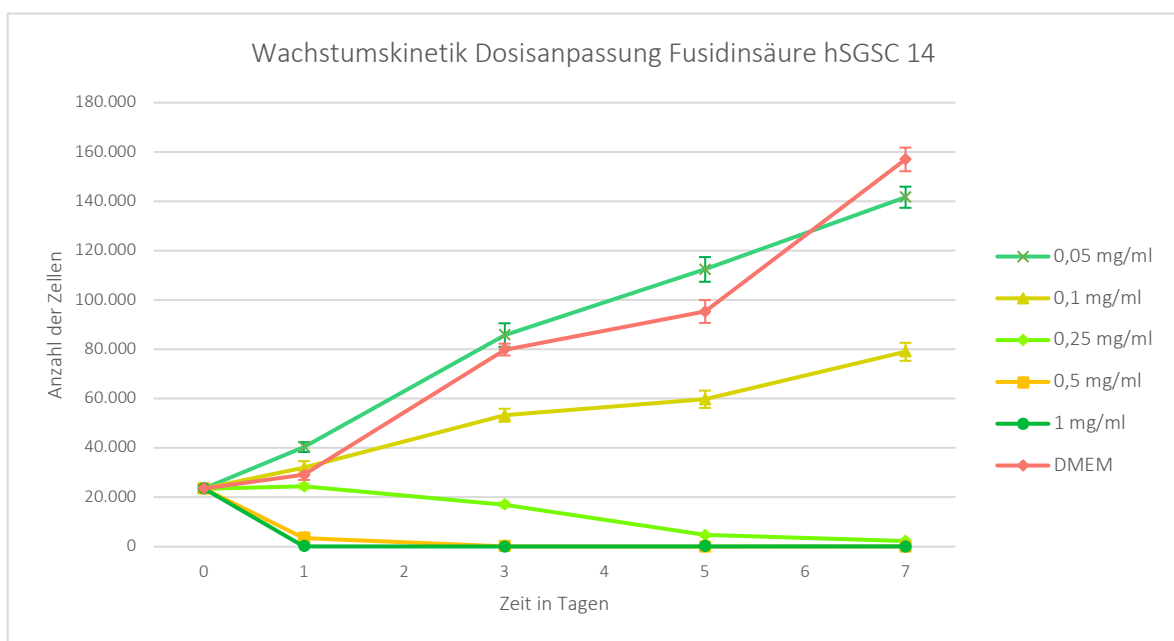


Abbildung 14: Wachstumskinetiken hSGSC 14 (Dosisanpassung Fusidinsäure)

Die Zellzahl der hSGSC 14 wurde nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von Fusidinsäure im Medium oder DMEM ohne Fusidinsäure (Kontrollgruppe) bestimmt. Es werden der Mittelwert und die Standardfehler von jeweils sechs technischen Replikaten dargestellt. Eine Proliferation der Zellen konnte für die Dosierung 0,05 mg/ml und 0,1 mg/ml nachgewiesen werden, wobei das Wachstum der Gruppe mit der geringsten Dosis ähnlich wie das der Kontrollgruppe war. Eine Dosierung von 0,25 mg/ml führte nach dem Mediumwechsel am Tag vier zu einem Absterben der Zellen. Die beiden höchsten Konzentrationen (0,5 mg/ml, 1 mg/ml) führten innerhalb von 24 Stunden zu einer Depletion der Zellzahl.

7.2.2.2 Impedanzmessung

Abbildung 15 zeigt die Impedanzmessungen des Dosisanpassungsversuches mit Fusidinsäure. Bis Tag eins des Experimentes waren etwa ähnliche Zellindizes über alle Gruppen hinweg zu beobachten. Die Medienwechsel an Tag eins und an Tag vier des Experimentes führten zu einem Einschnitt der Zellindizes.

Die Kontrollgruppe sowie die Gruppe mit der niedrigsten Fusidinsäurekonzentration (0,05 mg/ml) erholten sich hiervon schnell und es kam zu einer weiteren Zunahme der Zellindizes.

Eine Konzentration von 0,1 mg/ml Fusidinsäure führte im Gegensatz zu der 0,05-mg/ml-Gruppe bereits zu Beginn des Experimentes zu einer erheblich niedrigeren Entwicklung des Zellindex. Es war jedoch insgesamt eine Zunahme über den Experimentzeitraum – auch nach dem erneuten Mediumwechsel – zu beobachten. Die Zugabe von 0,25 mg/ml Fusidinsäure bewirkte einen beständigen Abfall des Zellindex bis zum erneuten Mediumwechsel. Hiernach näherte er sich Nullwerten. Bei den beiden höchsten Konzentrationen (0,5 mg/ml und 1 mg/ml) sanken die Zellindizes innerhalb von 24 Stunden und pendelten schließlich um Nullwerte. Die Konzentration von 0,5 mg/ml zeigte hier ein etwas langsames Absinken des Index. Im Verlauf des Experimentes stellte sich keine Erholung der Zellindizes der beiden Gruppen mit den höchsten Fusidinsäure-Konzentrationen ein.

Lediglich bei den beiden niedrigsten Konzentrationen (0,05 mg/ml und 0,1 mg/ml) konnte eine positive Entwicklung der Zellindizes beobachtet werden. Eine erneute Zugabe des Antibiotikums hatte jedoch auch bei diesen Konzentrationen sichtbar negative Auswirkungen auf die Zellindizes.

Die statistische Auswertung eines linear gemischten Modells auf der Grundlage der Zellindizes ergab, dass die Konzentration keinen signifikanten Einflussfaktor darstellte (Koeffizient $-0,222$; $p = 0,502$). Als signifikante Einflussfaktoren ergaben sich jedoch der Tag der Messung der Zellindizes (Koeffizient $0,199$; $p < 0,001$) und die Interaktion zwischen den Konzentrationen und dem Tag der Messung der Zellindizes (Koeffizient $-0,278$; $p < 0,001$, Abb. 33 im Anhang). Somit ist der Zeitraum der Exposition sowohl allein als auch im Zusammenspiel mit den verschiedenen Konzentrationen von Bedeutung.

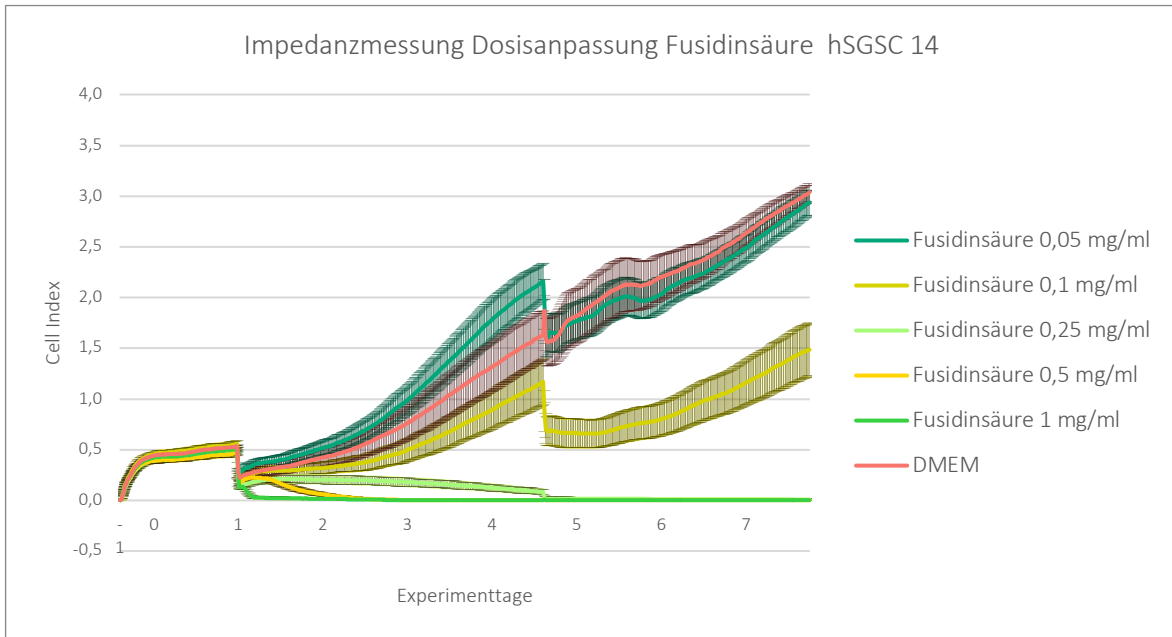


Abbildung 15: Impedanzmessungen hSGSC 14 (Dosisanpassung Fusidinsäure)

Die Zellen hSGSC 14 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Fusidinsäure während einer Impedanzmessung behandelt. Es wird jeweils der Mittelwert des Zellindex mit Standardfehler von sechs technischen Replikaten dargestellt. Die Kontrollgruppe (DMEM) sowie die 0,05 mg/ml-Fusidinsäuregruppe wiesen eine ähnliche Kinetik auf. Auch die Zugabe von 0,1 mg/ml Fusidinsäure führte zu einer Zunahme des Zellindex, der nach dem Mediumwechsel an Tag vier jedoch einen vorübergehenden Einschnitt erfuhr. Die drei höchsten Konzentrationen (0,25–1 mg/ml) führten zu einer Abnahme des Zellindex. Eine höhere Konzentration hatte eine ausgeprägtere und schnellere negative Entwicklung zur Folge. Die 0,25 mg/ml-Gruppe zeigte erst nach dem erneuten Mediumwechsel am Tag vier ein Absinken auf Nullwerte.

7.3 *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte ein Ausblick auf die Einflüsse von Gentamicin und Fusidinsäure auf die wundheilungsfördernden Kapazitäten der hSGSCs. Hierfür wurden Hautbiopsien aus dem Gesichtsbereich in einem sogenannten *Punch-in-a-Punch-ex-vivo*-Wundheilungsmodell genutzt. Dafür wurden in einen inneren *Punch* als künstliche Wunde hSGSCs zur Unterstützung der Wundheilung eingesät, die entweder nur mit DMEM als Kontrollmedium oder mit Gentamicin- beziehungsweise Fusidinsäure-haltigem Medium appliziert wurden. Das Augenmerk lag bei diesen Versuchen auf den klinischen Dosierungen von Gentamicin (1,4 mg/ml) und Fusidinsäure (1 mg/ml). Im ersten Experiment wurde zunächst nur die Zelllinie hSGSC 14 verwendet. Im zweiten und dritten Experiment wurden die proliferativ starken Zelllinien hSGSC 33 und hSGSC 36 sowie die hSGSC 14 als interne Kontrolle genutzt.

7.3.1 Vitalität der Stanzen während der Kultivierung

Anhand des Kulturmediums der Stanzen wurden im Verlauf der *Ex-vivo*-Kulturen an fünf Zeitpunkten LDH-Messungen durchgeführt, um die Vitalität der Stanzen zu analysieren. Wie in Abbildung 16 zu sehen, blieb die LDH-Konzentration der kultivierten Hautstanzen ab Tag zwei (Zeitpunkt nach Füllen des inneren Punches) auf einem niedrigeren Niveau. Bei den folgenden Medienwechseln mit LDH-Analysen an den Tagen vier, sechs und acht nach Inkulturnahme der Stanzen zeigte sich ein stetiger Anstieg der optischen Dichte und dementsprechend der LDH-Konzentration im Zellkulturmedium der Stanzen (Abb. 16). Dies bedeutete einen sukzessiven Gewebeuntergang während der Kultivierung. Die sehr hohen Ausgangskonzentrationen vom ersten Messzeitpunkt wurden über den Versuch hinweg jedoch nicht wieder erreicht. Bei einer Analyse der AUCs via Brown-Forsythe ANOVA konnten weder signifikante Unterschiede bei dem Hautspendenden P125 ($F^*(2, 24,33) = 2,063$; $p = 0,15$) noch P134 ($F^*(4, 41,5) = 2,156$; $p = 0,091$) nachgewiesen werden. Bei den Stanzen des Hautspendenden P127 waren signifikante Unterschiede bei den AUCs zu beobachten ($F^*(3, 33,72) = 6,58$; $p = 0,001$). Im Dunnett-T3-Post-hoc-Test wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe mit hSGSC 14 und der Gentamicin-Gruppe mit hSGSC 36 nachgewiesen (korrigierter p-Wert: $p = 0,002$). Bei der Analyse dieses Hautspendenden waren insgesamt höhere LDH-Konzentrationen als bei den anderen beiden Spendenden zu verzeichnen (Abb. 16, Tabelle 5 im Anhang). Diese Versuchsreihe deutete darauf hin, dass die LDH-Ausschüttung eher spender*innen- als substanzabhängig ist.

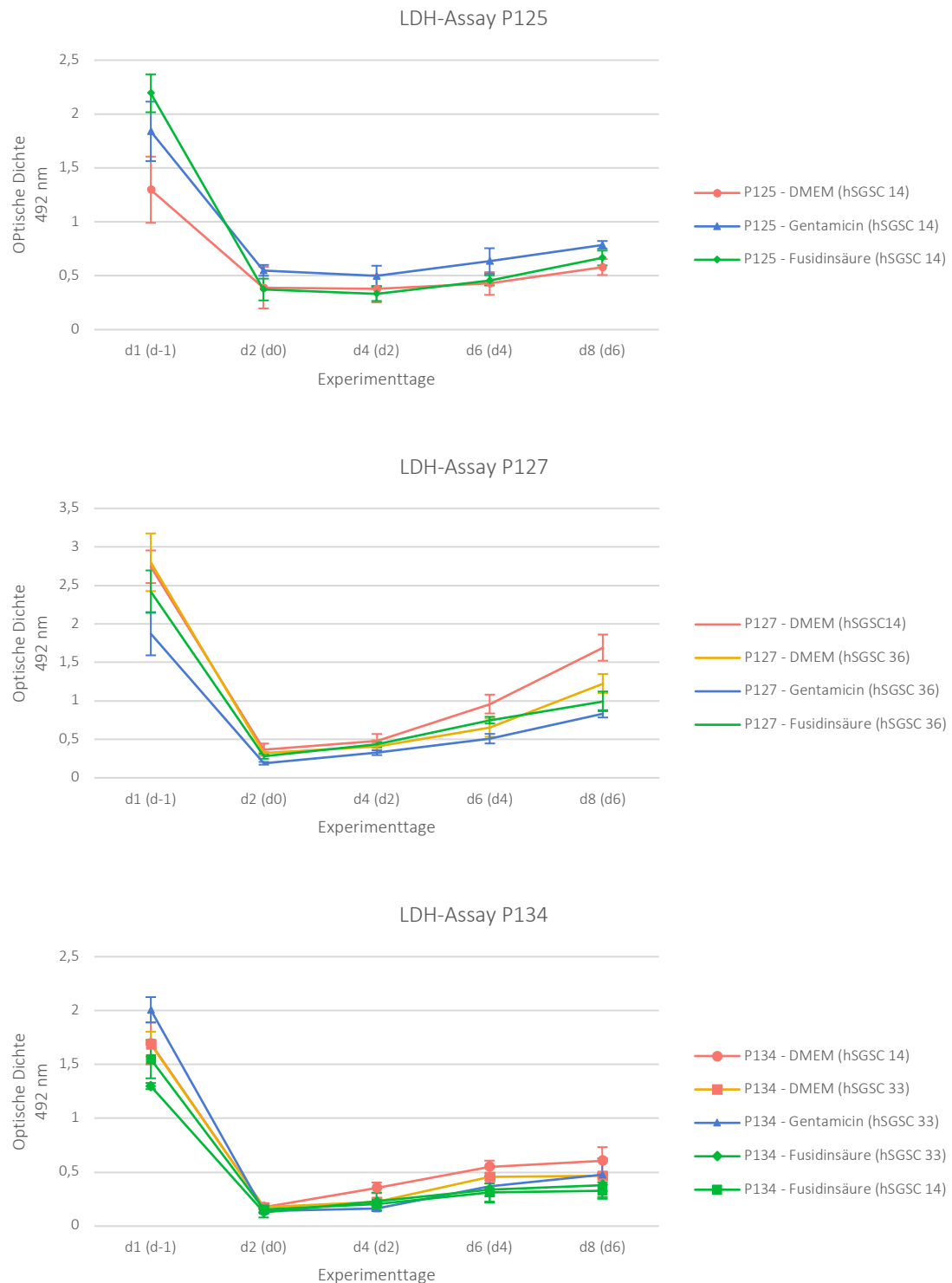


Abbildung 16: Ergebnisse der LDH-Assays (*Punch-in-a-Punch*)

LDH-Konzentrationen während der *Punch-in-a-Punch*-Versuche sind aufgetragen als Mittelwerte mit Standardfehler der drei Replikate jeweils dreier Stenzen als technische Replikate eines Spendenden. Nach der Inkulturnahme wurden jeweils die höchsten LDH-Konzentrationen gemessen. Dies war vor der Wundbehandlung des inneren *Punches*. Im Verlauf der Kultivierung kam es zu einem Anstieg der LDH-Konzentrationen. In einer Brown-Forsythe ANOVA der AUCs konnte lediglich bei dem Spendenden P127 ein signifikanter Unterschied der Gruppen festgestellt werden ($F^*(3, 33,72) = 6,58$; $p = 0,001$). Im Dunnett-T3-Post-hoc-Test wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe mit hSGSC 14 und der Gentamicin-Gruppe mit hSGSC 36 nachgewiesen (korrigierter p-Wert: $p = 0,002$).

7.3.2 Mikroskopie-Aufnahmen zur Verlaufskontrolle der Wundheilung

Im Verlauf der *Ex-vivo*-Kultivierung wurden die Hautstanzen unter dem Auflichtmikroskop begutachtet und fotografiert. So ließ sich der Fortschritt der Wundheilung bereits durch eine erste nichtinvasive optische Beurteilung der Hautstanzen verfolgen.

Abbildung 17 gibt einen Überblick über die Aufnahmen während der Kultivierung der Stanzen und zeigt zugleich ein HE-Bild aus dem mittigen Punch nach Abschluss der Kultur. Die Aufnahme am Tag zwei zeigen den Zustand der Hautstanze direkt nach Behandlung der künstlich gesetzten inneren Wunden. Am Wundgrund wird das Unterhautgewebe ersichtlich (beispielhaft markiert durch ein Kreuz in Bild a). Am vierten Tag nach der Wundbehandlung mit hSGSCs (Tag sechs der *Ex-vivo*-Kultur) wurden die Stanzen erneut fotografiert. Bei genauer Betrachtung der Bilder ist bereits eine Veränderung der Oberfläche der inneren Wunde zu erkennen. Es zeigt sich eine matte Beschaffenheit (besonders gut in den Bildern j und n zu erkennen). Des Weiteren kommt es am Wundrand zu einer etwas dunkleren Verfärbung, die auf eine Demarkierung der Verletzung durch den Laser hindeuten könnte (Pfeilspitzen in den Bildern c und f). Am achten Tag nach Inkulturnahme wurden die letzten Aufnahmen angefertigt. Auf diesen Bildern ist über den Wunden der gefüllten Stanzen deutlich ein Häutchen zu erkennen (am deutlichsten in Bild g als Mattierung zu erkennen, Markierung mit einem Stern). Die Stanze in den Bildern a bis d wurde ausschließlich mit DMEM-Zellkulturmedium ohne Zugabe von hSGSCs behandelt. Bei dieser Stanze ist bei der letzten Aufnahme makroskopisch kein durchgehendes Häutchen über der inneren Wunde ersichtlich, was im HE-Bild mikroskopisch bestätigt wird (Abb. 17d). Links und rechts des inneren *Punches* ist die intakte Epidermis mit einer Hornschicht zu erkennen. An den Rändern des inneren *Punches* sind kurze, einwachsende Zungen einer abgrenzenden Zellschicht zu sehen (markiert mit zwei Pfeilen), welche den Wundgrund des inneren *Punches* nicht erreichen. Auf den anderen HE-Bildern (Bilder h, l, p) kann man am Boden des inneren *Punches* violett eingefärbte Zellen erkennen (beispielhafte Markierung durch ein x in Bild l). Über diesen Zellen hatte sich eine abgrenzbare Zellschicht gebildet (sehr deutlich in Bild h zu erkennen, Markierung mit einem Pfeil). Während der Kultivierung setzte offensichtlich die Wundheilung ein, die mit einer Behandlung durch hSGSCs umfassender ausfiel. Dies war unabhängig davon, ob die Zellen mit Kontrollmedium oder Gentamicin- beziehungsweise Fusidinsäure-haltigem Medium in den inneren *Punch* eingebracht worden waren.

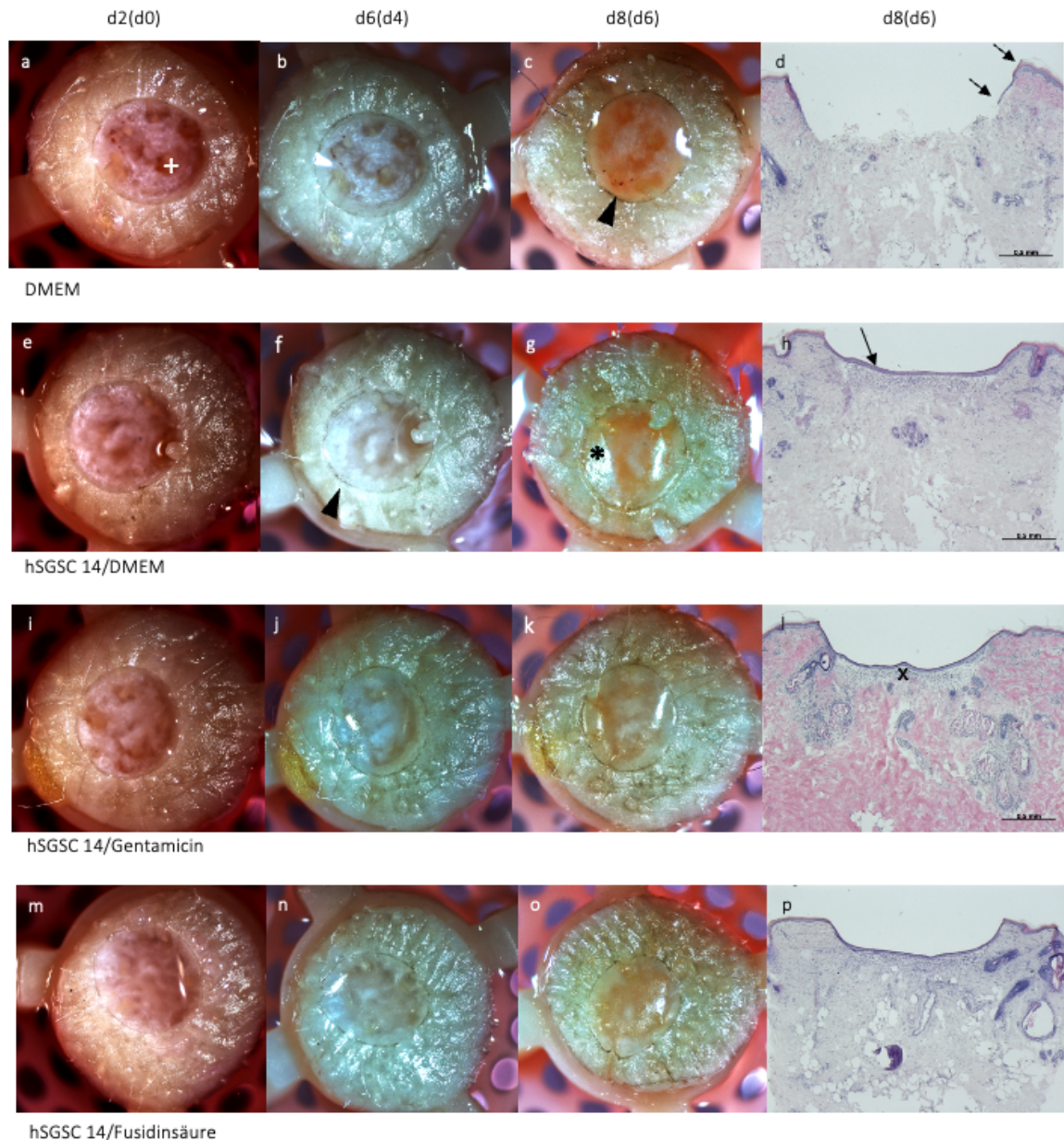


Abbildung 17: Aufnahmen am Auflichtmikroskop (*Punch-in-a-Punch*)

Beispielhaft werden die Mikroskopie-Aufnahmen vom *Punch-in-a-Punch*-Versuch von dem Hautspendendem P125 gezeigt. Insgesamt werden vier verschiedene Wundbehandlungen des inneren *Punches* gezeigt: Kontrollstanze (Behandlung lediglich mit Medium, ohne Zellen), sowie Wundbehandlungen mit hSGSCs in drei verschiedenen Medien (DMEM und DMEM mit Gentamicin beziehungsweise Fusidinsäure). Links sind die Mikroskopie-Auflichtbilder an verschiedenen Zeitpunkten nach Setzen der inneren Wunde (Befüllung mit Zellen in Klammern) zu sehen. Rechts folgt das HE-Bild der Stanze am Versuchsende. Das schwarze Kreuz in Bild a markiert beispielhaft die durchscheinende Subkutis. Die schwarzen Pfeilspitzen in den Bildern c und f weisen auf eine dunkle Verfärbung am Rand des inneren *Punches*. Die Doppelpfeile in Bild d markieren die rudimentär ausgebildete einwachsende Zunge am Wundrand. Der Stern in Bild g weist auf die Ausbildung eines Häutchens hin (zu erkennen durch matte Oberfläche). Der Pfeil in Bild h weist beispielhaft auf die abgrenzende Zellschicht, die in diesem Fall den inneren *Punch* auskleidet. Das x in Bild i deutet exemplarisch auf die bläulich eingefärbten Zellen, die unterhalb der abgrenzenden Zellschicht liegen.

7.3.3 Auswertung der HE-Schnitte

7.3.3.1 Wunddurchmesser

Durch die Nutzung eines Lasers wurde eine Standardisierung der Wunde erreicht. Die durchschnittlichen Wunddurchmesser der ausgewerteten HE-Schnitte betragen 1,77 bis 2,0 mm. In Abbildung 18 sind die Wunddurchmesser grafisch aufgetragen (Daten Tabelle 6 im Anhang).

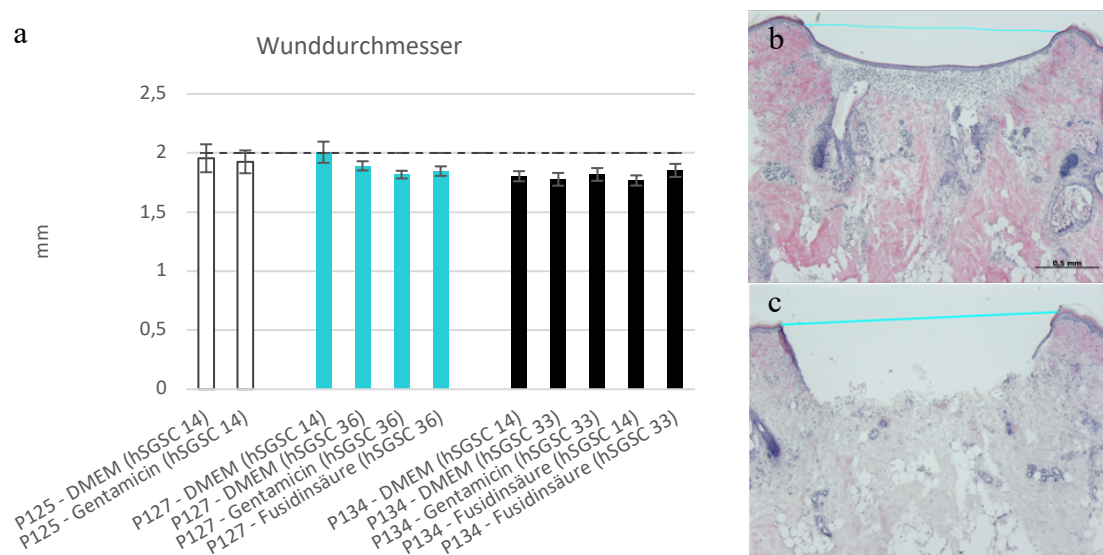


Abbildung 18: Wunddurchmesser (*Punch-in-a-Punch*)

a) Wunddurchmesser der unterschiedlichen Gruppen in mm sind als Mittelwert von jeweils 3 Stanzungen mit Standardfehler dargestellt. Innerhalb der drei Hautspendenden wiesen die Wunddurchmesser ähnliche Werte auf. Es konnte kein signifikanter Unterschied mittels einer Brown-Forsythe ANOVA festgestellt werden ($F^*(10, 12,39) = 1,287, p = 0,333$). Die Standardisierung der Wunde durch den Laser war erfolgreich und es konnte in jeder Experimentgruppe ein ähnlicher Abschnitt der Stanze analysiert werden. b/c) HE-Beispielbilder mit erfasstem Parameter (Zustand nach Behandlung mit b: Zelltherapie als Wundbehandlung, c: lediglich Medium als Wundbehandlung, Aufnahmen in 50-facher Vergrößerung, Maßstab 0,5 mm).

Es ist zu erkennen, dass die Wunddurchmesser innerhalb der drei Spender*innengruppen dicht beieinander liegen. Dies bedeutet, dass der Laser die Wunde gleichmäßig gesetzt hat und es in den jeweiligen Gruppen somit möglich war, durch die Größenmessung jeweils einen vergleichbaren Abschnitt der Stanze zu analysieren. Für jeden Hautspendenden wurde eine statistische Analyse durchgeführt. Da bei einem HE-Schnitt einer Stanze der Fusidinsäuregruppe der hSGSC 14 bei dem Spendenden P125 die Schichtdicke nicht korrekt war, musste diese Gruppe aufgrund geringer Wiederholung ($n = 2$) von der Auswertung ausgeschlossen werden. Die Wunddurchmesser aller Stanzungen wurden mittels einer Brown-Forsythe ANOVA analysiert. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wunddurchmessern aller Stanzungen ($F^*(10, 12,39) = 1,287, p = 0,333$). Die mit hSGSC 14 und Kontrollmedium behandelten Stanzungen wurden zur weiteren Auswertung als

interne Kontrolle genutzt und die Abhängigkeit der Hautpendenden über eine Normalisierung auf diese Ergebnisse herausgerechnet. Die weiteren Angaben wurden dementsprechend relativ zu dieser Gruppe gemacht (Tabelle 7 im Anhang).

7.3.3.2 Zungenlänge

Abbildung 19a zeigt die Zungenlänge von drei Stanzen einer Medium-Zell-Kombination im prozentualen Anteil zu der internen Kontrolle mit hSGSC 14. Es ist zu erkennen, dass die Zungenlängen bei P127 etwas kürzer ausfallen als die von P125 oder P134, wobei bei der Fusidinsäuregruppe von hSGSC 33 von P134 ein geringer Mittelwert mit einem hohen Standardfehler auffällig war. In Abbildung 19b findet sich der Durchschnitt der normalisierten Zungenlänge der drei verschiedenen Behandlungen über alle Versuche hinweg. Eine Analyse via Brown-Forsythe ANOVA mit Dunnett-T3-Post-hoc-Test wies keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Behandlungsgruppen auf ($F^*(2, 15,24) = 1,418$; $p = 0,273$; Abb. 19b). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich unabhängig vom Hautpendenden, Zelllinie oder der Behandlung mit Antibiotika das Wachstum einer abgrenzenden Zellschicht stattfand.

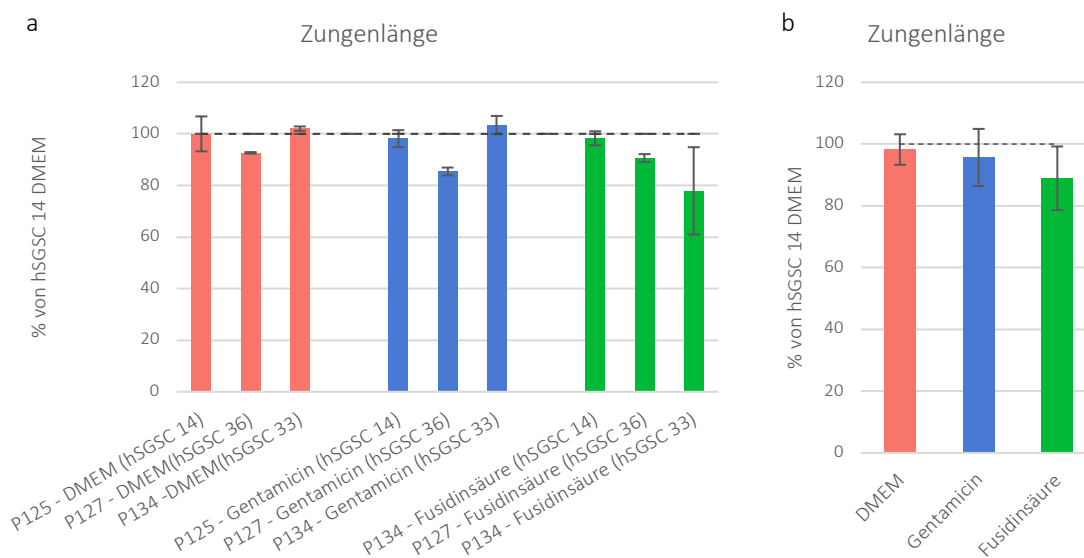


Abbildung 19: Zungenlänge (*Punch-in-a-Punch*)

a) Die Zungenlänge wurde normalisiert auf die interne Kontrolle der jeweiligen hSGSC-14-Kontrollgruppe (DMEM). Es wurden jeweils drei Replikate zu einem Mittelwert zusammengefasst und mit Standardfehler dargestellt. Die meisten Versuchsgruppen liegen bei nahezu 100 %, außer vier Gruppen, die 10-20 % unterhalb der hSGSC-14-Kontrollgruppe liegen. b) Es wurden die Mittelwerte der normalisierten Zungenlänge der drei Medium-Konditionen von allen Hautpendenden zusammen berechnet und mit Standardabweichungen abgebildet. In einer Brown-Forsythe ANOVA mit Dunnett-T3-Post-hoc-Test konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden ($F^*(2, 15,24) = 1,418$; $p = 0,273$).

7.3.3.3 Flächenmaße

Die Zungenfläche (Abb. 20a) zeigte eine sehr heterogene Verteilung innerhalb der Gruppen, was zu teils hohen Standardfehlern führte. In Abbildung 20a deutet sich unabhängig von der Behandlung mit Antibiotika ein Trend zu geringeren Zungenflächen bei Stanzen an, die mit hSGSC 33 behandelt worden waren.

Mit dem Fokus auf die drei Behandlungsgruppen ergab eine Brown-Forsythe ANOVA keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen bei Vergleich der Zungenfläche, bezogen auf die interne Kontrolle der drei genutzten Medium-Konditionen ($F^* (2, 23,24) = 0,6332, p = 0,54$; Abb. 20b).

Die Werte der residualen Wundfläche zeigten sich komplementär zur Zungenfläche, da sich die Größe der standardisierten Wunde nicht ändert. Die auf die interne Kontrolle der jeweiligen hSGSC-14-Kontrollgruppe bezogenen Werte sind in Abbildung 20c zu sehen. Im Teil d der Abbildung 20 sind die Mittelwerte der normalisierten nicht zugeheilten Wundfläche der drei Konditionen aufgetragen. Mittels Brown-Forsythe ANOVA konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Konditionen nachgewiesen werden ($F^* (2, 22,73) = 0,603; p = 0,556$).

Es ergibt sich die Annahme, dass Gentamicin und Fusidinsäure in diesem *Ex-vivo*-Experiment keinen negativen Einfluss auf die wundheilungsfördernden Kapazitäten von hSGSCs hatten.

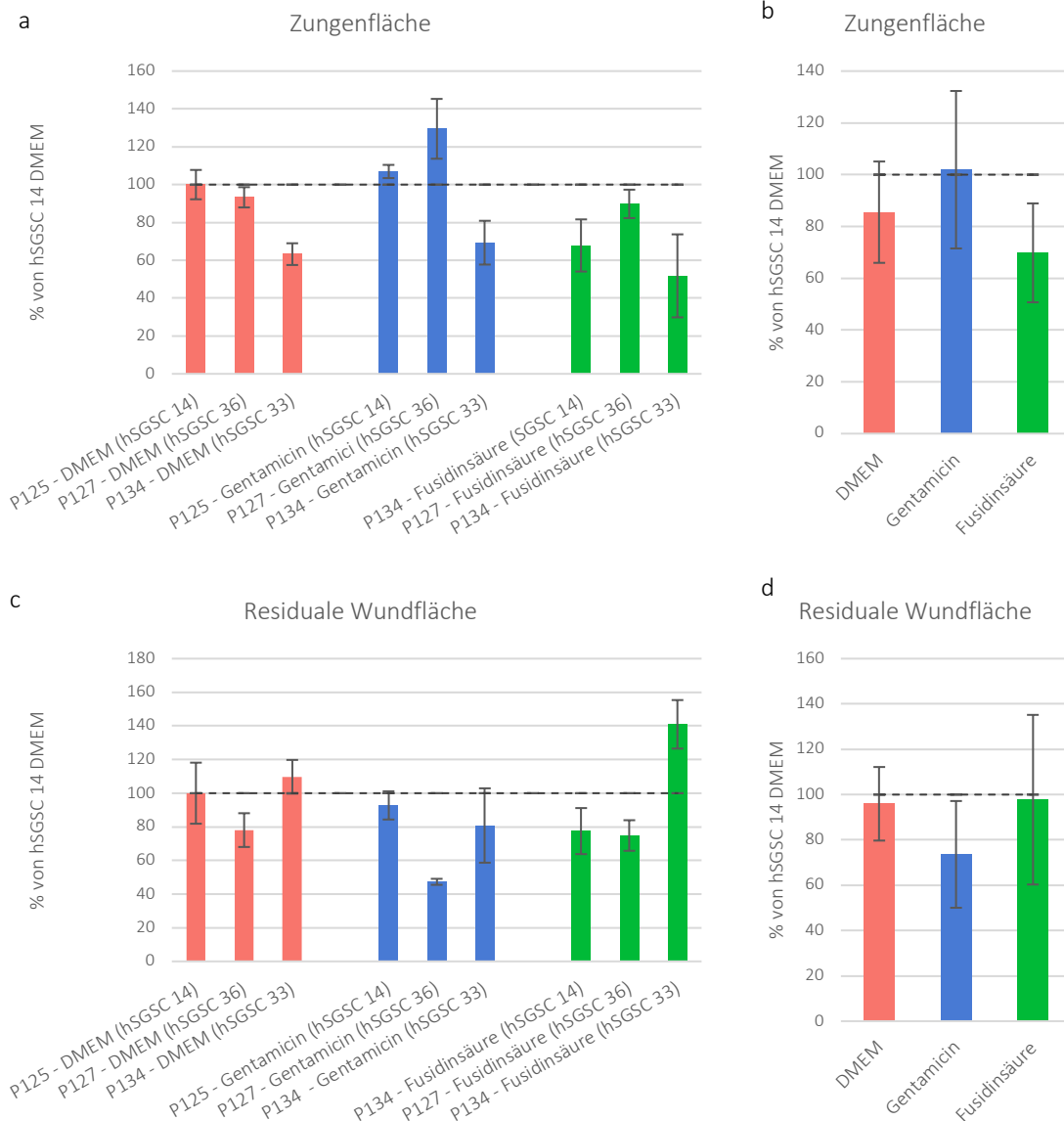


Abbildung 20: Zungenfläche & Residuale Wundfläche (*Punch-in-a-Punch*)

Die Flächenmaße der Stanzen wurden normalisiert auf die Kontrolle der hSGSC 14. a) Zungenfläche; es wurden jeweils drei Stanzen normalisiert auf die interne Kontrolle hSGSC 14 (Mittelwert mit Standardfehler). b) Es wurde der Durchschnitt der normalisierten Zungenfläche der drei Konditionen aller drei Hautspendenden zusammen abgebildet (Mittelwert mit Standardabweichung). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der Zungenflächen in einer Brown-Forsythe ANOVA nachgewiesen werden ($F^* (2, 23,24) = 0,6332, p = 0,54$). c) Die residuale Wundfläche der drei Replikate wurde normalisiert auf die interne Kontrolle der hSGSC 14 (Mittelwert mit Standardfehler). d) Es wird die residuale Wundfläche der drei Konditionen aller drei Hautspendenden zusammen gezeigt (Mittelwert mit Standardabweichung). In der Brown-Forsythe ANOVA ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der residualen Wundfläche bei Betrachtung der Mittelwerte der drei Hautspendenden ($F^* (2, 22,73) = 0,603; p = 0,556$).

8 Diskussion

8.1 Einfluss der Antibiotika Gentamicin und Fusidinsäure *in vitro*

Eine der Herausforderungen bei der Hauttransplantation sind Infektionen, die zu einem Transplantatuntergang führen. Auch bei der Anwendung von Zelltherapien für die Therapie von Hautwunden wurde in der Vergangenheit häufig von diesem Problem berichtet (O'Connor et al. 1981, Matsumura et al. 1998, Unal et al. 2005). Humane Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen haben bei Versuchen *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* wundheilungsfördernde Kapazitäten gezeigt und kommen so in der Zukunft für eine potenzielle Anwendung bei Wundheilungsstörungen in Betracht (Sturmheit et al. , Danner et al. 2012, Nagel et al. 2013, Liao et al. 2019). Deswegen sollte in dieser Arbeit betrachtet werden, inwiefern Antibiotika einen Einfluss auf die Proliferation, metabolische Aktivität und Viabilität der hSGSCs haben. Zunächst wurde die Wirkung von Gentamicin in einer handelsüblichen topischen Konzentration von 1 mg/ml (Gentamicinsulfat 1,4 mg/ml) untersucht. Diese Konzentration stellte bereits die Grundlagen für andere *In-vitro*-Studien dar (Cooper et al. 1990, Cooper et al. 1991, Teepe et al. 1993, Junker et al. 2015). Fusidinsäure wurde bei den Versuchen in der intravenösen Verdünnung des Medikamentes (1 mg/ml) angewendet, die ebenfalls bereits als klinische Ausgangskonzentration in Studien getestet worden ist (Teepe et al. 1993). So sollte zunächst *in vitro* die Auswirkung einer in der Klinik eingesetzten Dosierung beobachtet werden, um zu ergründen, ob eine Kombination von hSGSCs und Antibiotika möglich ist. Anschließend wurden verschiedene Antibiotikakonzentrationen untersucht, um die Möglichkeit einer Dosisoptimierung zu betrachten.

8.2 Gentamicin

8.2.1 Klinische Dosierung

Die Auswirkung von Gentamicin auf die Proliferation von Keratinozyten und Fibroblasten wurde *in vitro* bereits im Hinblick auf eine topische Antibiotika-Therapie bei transplantierten Verbrennungswunden betrachtet (Cooper et al. 1990, Cooper et al. 1991, Teepe et al. 1993, Junker et al. 2015). Die untersuchten Zeiträume umfassten in diesen Studien einen bis vier Tage und ein Mediumwechsel wurde einmalig zu Beginn der Versuche durchgeführt. Nach

einer Inkubation mit Gentamicin-versetztem Medium über 24 Stunden wurde mittels Neutralrot-Aufnahme-Assay ermittelt, dass Gentamicin in der klinischen Dosierung (1 mg/ml) eine geringe Toxizität zeigte (Teepe et al. 1993). Ebenso wurde eine verminderte Proliferation von Keratinozyten über einen Zeitraum von zwei bis vier Tagen in Medium mit Gentamicin durch die Bestimmung der Zellzahl oder kolorimetrische Assays beobachtet (Cooper et al. 1990, Cooper et al. 1991, Junker et al. 2015). Fibroblasten zeigten während einer Inkubation mit Gentamicin-haltigem Medium (1 mg/ml) über zwei Tage ebenfalls eine verminderte Aufnahme von Neutralrot und dementsprechend auch eine verringerte Proliferation (Cooper et al. 1991). Um die Wirkung von Gentamicin auf die Zellen eindeutiger zu bestimmen, wurde ein radioaktiv markiertes Thymidin-Einbau-Assay genutzt. Bei Fibroblasten wurde so eine herabgesetzte Nachweisbarkeit von Thymidin und somit eine verringerte DNS-Synthese nachgewiesen (Cooper et al. 1991). Dies konnte über alle untersuchten Konzentrationen hinweg beobachtet werden, auch bei einer Konzentration von 100 µg/ml, die keinen Unterschied im Neutralrot-Assay zwischen Gentamicin- und Standardkulturmedium ergeben hatte (Cooper et al. 1991). Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die im Neutralrot-Assay nachgewiesenen lebenden Zellen sich nicht weiter aktiv vermehrt hatten (Cooper et al. 1991). Somit wurde gefolgert, dass die Auswirkungen von Gentamicin eher auf einer verminderten biologischen Aktivität statt einer zytotoxischen Wirkung beruhten (Cooper et al. 1991).

Der Versuchszeitraum im Rahmen dieser Arbeit umfasste mit sieben Tagen einen längeren Zeitraum als die zuvor beschriebenen Studien. Für die Versorgung der Zellen musste demnach eine Repetitionsdosis von Gentamicin im Rahmen eines Mediumwechsels am vierten Tag appliziert werden. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Studien proliferierten die Zellen mit der klinischen Dosierung von Gentamicin bis zu Tag fünf in einem ähnlichen Rahmen wie die der Kontrollgruppen. Jedoch konnte eine Stagnation der Proliferation zwischen dem fünften und siebten Tag, nach erneuter Zugabe von Gentamicin, beobachtet werden (Abb. 7). Ähnliches galt für die erhobene metabolische Aktivität, die sich aus der Proliferation der Population, der intrinsischen Aktivität der einzelnen Zellen und der Sterberate der Zellen zusammensetzt. Somit deuteten die Ergebnisse auf eine veränderte Zellzahl und nicht auf eine Veränderung des Zellumsatzes bei gleichbleibender Zellzahl hin. Bei der Impedanzmessung wird ein Zusammenspiel aus Adhärenz, veränderter Proliferation und Viabilität von Zellen gemessen (Kho et al. 2015) In den Versuchen mit den hSGSCs wurde dementsprechend auch eine Korrelation der Impedanz-Ergebnisse zu den Ergebnissen

der Zellzahlbestimmungen und der metabolischen Aktivität nachgewiesen, was die Eignung der Methode unterstützt. Im Unterschied zu den anderen Methoden war ein negativer Effekt von Gentamicin bereits eher ersichtlich (Abb. 9). Da eine Wechselwirkung der Substanz Gentamicin an den Elektroden durch die sehr geringen Mediumblindwerte unwahrscheinlich war, könnte der früher als bei anderen Methoden detektierte negative Effekt von Gentamicin auf eine frühzeitige Beeinflussung der Zelladhärenz hindeuten. Außerdem könnte die kontinuierliche Messung einen schwachen Trend deutlicher hervorheben.

Durch den durchflusssyztometrischen Proliferationsversuch konnte beobachtet werden, dass sich bei der Verlängerung der Inkubation auf neun Tage mit insgesamt zwei weiteren Gentamicin-Gaben die Proliferation der Gentamicin-Gruppen nochmals deutlich verringerte. Das bestätigt die Beobachtung der vorhergehenden Versuche, dass eine wiederholte Dosisgabe den Stress auf die Zellen erheblich erhöhte.

Zusammenfassend zeigten die hSGSCs also durch die Behandlung mit Gentamicin zwar eine anhaltende biologische Aktivität, jedoch waren sie in ihrem Proliferationsvermögen eingeschränkt. Die Reaktion der hSGSCs auf die Behandlung mit Gentamicin war ähnlich zu den Reaktionen von Fibroblasten und im Hinblick auf die Proliferation auch der der Keratinozyten (Cooper et al. 1990, Cooper et al. 1991, Teepe et al. 1993, Junker et al. 2015). Als Ursache für die gedämpfte Zellvermehrung könnten verschiedene Effekte, die *in vitro* bei Versuchen mit Gentamicin beobachtet worden sind, in Betracht kommen. Es wurde berichtet, dass Antibiotika Mitochondrien schädigen, zum Beispiel durch eine Änderung des Membranpotenzials, eine Beeinflussung der Atmungskette oder Punktmutationen der mitochondrialen DNS (Elliott und Jiang 2019, O'Reilly et al. 2019). Als möglicher Grund wurde die Endosymbiontentheorie angeführt, die besagt, dass Mitochondrien das Produkt einer Symbiose aus einem Bakterium und einer eukaryoten Vorläuferzelle darstellen (Elliott und Jiang 2019). Also könnte der bakterielle Ursprung die Sensitivität der Mitochondrien gegenüber Antibiotika erklären. Des Weiteren wurde unter Antibiotikaeinfluss eine vermehrte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies beschrieben (Elliott und Jiang 2019, O'Reilly et al. 2019). Diese führen zu DNS-Schäden, wie bei der Kultivierung von Brustdrüsenepithelzellen und der Untersuchung von Ratten-Mitochondrien unter dem Einfluss von Gentamicin gezeigt werden konnte (Elliott und Jiang 2019, O'Reilly et al. 2019). Es wurde vermutet, dass die Schädigung der Mitochondrien letztendlich zu einem apoptotischen Zelltod führte (O'Reilly et al. 2019). In dieser Arbeit wurde jedoch kein eindeutiger Trend zu einem verstärkten Auftreten von Apoptose der Gentamicin-Gruppen im

Gegensatz zu den Kontrollgruppen ersichtlich. Zudem schien eine akute Zellschädigung beziehungsweise ein Verlust der Membranintegrität in einem höheren Umfang aufzutreten als ein programmierter Zelltod durch Apoptose (Abb. 11). Da die Reduktion der Zellzahl vor allem erst in späteren Zeiträumen auftrat, ist ein frühes und damit in den Versuchen nicht detektiertes Absterben der Zellen durch Apoptose unwahrscheinlich.

Für die gedämpfte Zellvermehrung könnten außerdem Hypoxie-induzierte Faktoren eine Rolle spielen. Im Rahmen von Versuchen mit epithelialen Brustdrüsenzellen wurden verschiedene Auswirkungen von Gentamicin auf die Zellen untersucht. Dabei wurden geringe Gentamicin-Konzentrationen (0,05 mg/ml) appliziert und sowohl zwei maligne entartete Zelllinien (MCF-7, MDA-MB-231) als auch eine „gesunde“ Zelllinie (MCF-12A) betrachtet (Elliott und Jiang 2019). Die Genexpression von Hypoxie-induziertem Faktor 1alpha (HIF1a), Enzymen der Glykolyse und Glukosetransportern waren im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert (Elliott und Jiang 2019). HIF1a ist an Signalwegen beteiligt, die für eine Anpassung der Zelle an eine hypoxische Umgebung sorgen. Zu den Anpassungsmechanismen gehört unter anderem auch die Glykolyse, während mitochondriale Prozesse gehemmt werden (Greer et al. 2012). Die Brustdrüsenepithelzellen, die mit Gentamicin behandelt wurden, wiesen konsekutiv eine erhöhte Laktatproduktion auf (Elliott und Jiang 2019). Außerdem wurden vermehrt oxidative DNS-Schäden beobachtet. Zusammenfassend werden durch Gentamicin in der Zelle Mechanismen zur Abwehr von negativen hypoxischen Effekten verstärkt. Das könnte ebenfalls im Zusammenhang mit der Schädigung der Mitochondrien stehen, die für den oxidativen Stoffwechsel verantwortlich sind, und somit die Bedeutung dieses vorgeschlagenen Wirkmechanismus unterstützen. In dem Fall der stoffwechselbedingten Änderungen in der Zelle als Reaktion auf die Schädigungen könnte ein erhöhtes Stresslevel durch die ineffektiveren alternativen Stoffwechselwege ein Grund für die beeinträchtigte Proliferation oder metabolische Aktivität der Zellen sein.

Es wurde berichtet, dass die Auswirkungen von Gentamicin auf die Tumorzellen in einem geringeren Maße auftreten als bei der „gesunden“ Zelllinie (Elliott und Jiang 2019). Bei diesen Ergebnissen sollte berücksichtigt werden, dass Tumorzellen in ihren Nischen Hypoxien ausgesetzt sind, ebenso wie Stammzellen. Bei Stammzellen werden unter anderem über Hypoxie-induzierte Faktoren die folgenden Mechanismen beeinflusst: der Verbleib in der Ruhephase des Zellzyklus, die Proliferation und die Zellerneuerung (Singh et al. 2012). In Anbetracht der Ergebnisse der hSGSCs ist auch eine Rückkehr in die Ruhephase des

Zellzyklus durch beispielsweise eine erhöhte Expression von HF1a und somit das Signalisieren einer nicht idealen Proliferationsumgebung möglich.

Die Morphologie der hSGSC unterschied sich nicht augenfällig zwischen Gentamicin- und Kontrollgruppen (Abb. 6), wie es bei den Versuchen mit Brustdrüsenepithelzellen berichtet worden war (Elliott und Jiang 2019). Die Zellen in Antibiotika-freiem Medium bildeten duktale Strukturen aus, während die in Gentamicin kultivierten Zellen kein geordnetes Wachstumsmuster zeigten (Elliott und Jiang 2019). Das spricht eher für das Eintreten der hSGSCs in eine Ruhephase als direkte zytotoxische Effekte durch Gentamicin.

Da in den Versuchen die Repetitionsdosis am Tag vier einen negativen Effekt auf die hSGSCs hinsichtlich Proliferation und metabolischer Aktivität hatte, könnte die Stabilität der Antibiotika bis zur repetitiven Gabe eine Rolle spielen. In einer Studie wurden die Konzentrationen von Gentamicin im menschlichen Serum nach Lagerung über 24 oder 48 Stunden im Vergleich zum direkt gemessenen Ausgangswert bestimmt. Die Lagerung erfolgte entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen an den verschiedenen Tagen, der jeweiligen Temperatur und dem Ausgangswert konnte nicht festgestellt werden (Jones et al. 1976). In Lösungen, die für die Blockung von Kathetern genutzt werden, konnte ebenfalls eine Stabilität des Stoffes über 72–96 Stunden beobachtet werden (Battistella et al. 2010, Bookstaver et al. 2013). Da die Zellen allerdings bei 37°C inkubiert wurden, könnte trotzdem ein Abbau beziehungsweise eine Inaktivierung der Substanzen stattgefunden haben. Der Mediumwechsel an Tag vier des Experimentes schien jedoch zunächst hinsichtlich der Stoffstabilität unter *In-vitro*-Bedingungen vertretbar zu sein.

Weitere Ursachen für eine verminderte Proliferation unter der Einwirkung von Gentamicin, die in anderen Studien diskutiert wurden, waren die Osmolarität und der pH-Wert von Gentamicin-haltigem Medium. Bei Versuchen mit Keratinozyten wurde eine leicht verringerte Osmolarität im Gegensatz zum Standardmedium sowie ein leicht saurer pH-Wert detektiert (Cooper et al. 1990). Eine Testung von Fibroblasten in DMEM substituiert mit EGF, Insulin, Hydrocortison, Streptomycin, Penicillin und Amphotericin B ergab eine niedrigere Osmolarität und einen niedrigeren pH-Wert nach Hinzufügen von Gentamicin in das Medium. Allerdings waren diese Veränderungen so gering, dass sie im Rahmen der Abweichungen des Mediums gelegen haben (Cooper et al. 1991). Ein Einfluss dieser beiden Faktoren wurde gerade im Hinblick auf andere in diesen Studien getesteten Substanzen als

unwahrscheinlich bewertet (Cooper et al. 1990). Die Osmolarität und der pH-Wert sind in dieser Arbeit nicht ausführlich betrachtet worden. Allerdings wurde vor den Versuchen der pH im Gentamicin-haltigem Medium mit 7,56 beziehungsweise im Medium der Kontrollgruppe mit 7,62 bestimmt, was beides sehr ähnlich ist. Zudem lag das Gentamicin-haltige Medium sogar noch etwas näher am physiologischen pH von 7,4. Die in den Publikationen gemessenen pH-Werte mit Gentamicin waren geringer bis ähnlich (7,32 bis 7,55), wobei unterschiedliche Medien für verschiedene Zelllinien genutzt worden waren (Cooper et al. 1990, Cooper et al. 1991). Daher ist ein Einfluss des pH-Wertes auf die Ergebnisse eher unwahrscheinlich.

Kritisch betrachtet werden muss im Zusammenhang der Einflussfaktoren des Mediums, dass in den vorliegenden Versuchen das Standardzellkulturmedium mit Penicillin und Streptomycin beibehalten wurde. Penicillin als Beta-Lactam Antibiotika führt *in vitro* zu einer Inaktivierung von Aminoglykosiden, zu denen Gentamicin und Streptomycin gehören (Flournoy 1978, Henderson et al. 1981, Glew und Pavuk 1983). Allerdings hätte das Weglassen von zusätzlichen Antibiotika im Medium eine weitere mögliche Beeinflussung der Zellen darstellen können, da im Vorfeld eine längere Kultivierung der Zellen in diesem Medium erfolgte, um eine ausreichende Anzahl an Zellen zu generieren. Es wurde berichtet, dass in einigen Studien die Standardmedien mit den prophylaktischen Antibiotikakonzentrationen für Gentamicin-Versuche verwendet wurden (Elliott und Jiang 2019). Die Autoren fordern eine Antibiotika-freie Kultivierung für derartige Untersuchungen und empfehlen vor den eigentlichen Versuchen eine Kultivierung in Antibiotika-freiem Medium über mindestens zwei Wochen (Elliott und Jiang 2019). Zugrunde liegende Daten für diese Empfehlung wurden jedoch nicht angeführt (Elliott und Jiang 2019). Es ist bekannt, dass die Penicillin-Konzentration, die zeitliche Dauer der Interaktion, die Temperatur und die Art des Aminoglykosids die Inaktivierung beeinflussen (Flournoy 1978, Henderson et al. 1981, Glew und Pavuk 1983). Eine Konzentration von 50 µg/ml Penicillin führte zu einem geringen Aktivitätsverlust, wobei dieser bei 37 °C wiederum höher als bei Raumtemperatur ist (Henderson et al. 1981). Die Konzentration von Penicillin im Standardkulturmedium beträgt 500 internationale Einheiten (IE) pro 500 ml Medium. Eine Umrechnung von 500 IE in Mikrogramm ergibt etwa 300 µg Penicillin auf 500 ml Medium, was deutlich unter dem Schwellenwert von 50 µg/ml liegt. Daher kann eine nennenswerte Interaktion als unwahrscheinlich angenommen werden.

Im Hinblick auf eine Wundbehandlung mit hSGSCs und Gentamicin deuten die *In-vitro*-Ergebnisse auf eine mögliche gemeinsame Nutzung hin. Die Zellen starben unter der Behandlung mit Gentamicin nicht ab und zeigten sich metabolisch aktiv. Eine Ausschüttung parakriner wundheilungsfördernder Faktoren sollte so möglich sein. Eine Untersuchung dieser Faktoren würde einen nächsten Schritt in der Evaluierung der Anwendung darstellen. Zu dem gleichen Schluss kam auch eine Studie mit Keratinozyten, die eine lokale Anwendung von Gentamicin in der vulnerablen Phase direkt nach einer Hauttransplantation als eine Möglichkeit sah (Cooper et al. 1990).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien genutzt, die in ihren Wachstumskapazitäten Unterschiede aufwiesen. Bei den Kontroll- und Gentamicin Gruppen schien ein interindividueller Unterschied zwischen den Zelllinien stärker als ein Unterschied zwischen den beiden Medien.

8.2.2 Dosisanpassung von Gentamicin

In der modernen Antibiotikatherapie stehen eine adäquate Dosierung sowie eine kritische Medikamentenauswahl im Vordergrund. Eine dosisangepasste Therapie lässt sich beispielsweise unter Spiegelbestimmungen, durch eine verlängerte Applikationsdauer oder über die Dosierungsintervalle durchführen.

Da die klinische Dosierung von Gentamicin nach den *In-vitro*-Experimenten generell für eine Anwendung geeignet war, sollte eine Evaluation der Zellentwicklung unter verschiedenen Antibiotikakonzentrationen erfolgen.

In der Literatur konnte eine Dosisreduktion von Gentamicin von 1 mg/ml auf 100 µg/ml bei Keratinozyten eine Proliferation in einem gleichen Umfang wie die der Kontrollgruppe zeigen (Cooper et al. 1990, Cooper et al. 1991, Junker et al. 2015). Ein ähnliches Ergebnis konnte bei Fibroblasten in einem Neutralrot-Aufnahme-Assay nachgewiesen werden (Cooper et al. 1991). Auch MSCs proliferierten bei dieser Konzentration, während sie bei Konzentrationen von 200 µg/ml oder 500 µg/ml eine geringere Proliferation im Gegensatz zu einer Kontrollgruppe zeigten (Kagiwada et al. 2008). Die minimale Hemmkonzentration einiger Bakterien für Gentamicin wurde ebenfalls in einigen Studien getestet. Die höchste Konzentration von Gentamicin, die benötigt wurde, um das bakterielle Wachstum zu hemmen, betrug 18,5 µg/ml für *Serratia marcescens* (Kagiwada et al. 2008). Unterhalb dieser Konzentration lagen unter anderem *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* und

Klebsiella pneumoniae, die in den bereits beschriebenen Keimspektren von chronischen Wunden beziehungsweise Brandwunden vorkommen (Kagiwada et al. 2008). Zur Kontaminationsprophylaxe in der Zellkultur von MSCs wurde daher die Nutzung von 20 µg/ml Gentamicin in einer Studie vorgeschlagen (Kagiwada et al. 2008). Bei dieser Konzentration war des Weiteren eine Induktion zur Zelldifferenzierung von MSCs möglich (Kagiwada et al. 2008). In diesem Zusammenhang sollte bedacht werden, dass die minimale Hemmkonzentration je nach Bakterienstamm unterschiedlich sein kann und hier Abweichungen der Literaturwerte auftreten können.

Eine topische Hochdosistherapie mit Gentamicin gegen Wundinfektionen wurde auch in experimentellen Arbeiten bereits untersucht. Bei diesen Versuchen wurden Schweinen Verbrennungswunden zugefügt und diese mit *Pseudomonas aeruginosa* oder *S. aureus* inokuliert. Anschließend erfolgte eine lokale Antibiotikatherapie mit Gentamicin (2 g/ml) oder Minocyclin (1 g/ml), die zu einer Keimreduktion führte (Junker et al. 2015, Tsai et al. 2016). Der Spiegel von Interleukin-1β als Infektparameter war in der Gentamicin-Gruppe signifikant niedriger als in einer Kontrollgruppe, die lediglich mit PBS behandelt worden war (Junker et al. 2015). Um die Gentamicin-Spiegel im Blut zu beobachten, wurden parallele Blutentnahmen durchgeführt. Die systemische Konzentration lag mit 1 µg/ml Blut unterhalb des therapeutischen Maximums (12 µg/ml). Systemische Nebenwirkungen wurden daher als unwahrscheinlich bewertet (Junker et al. 2015).

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen von Gentamicin zu beobachten und eine parallele Applikation von Gentamicin und hSGSCs für eine Hochdosistherapie zu eruiieren, wurden unterschiedliche Konzentrationen von Gentamicin getestet. Zusammenfassend ergibt sich, dass bei 100 µg/ml die negativen Auswirkungen auf die Zellen am geringsten beschrieben wurden. Eine Hochdosistherapie mit 2 g/ml konnte ohne größere systemische Nebenwirkungen genutzt werden [Cooper, Cooper, Junker, Junker 2015]. Eine Hemmung des bakteriellen Wachstums trat bereits bei Konzentrationen von 18,5 µg/ml ein. Deswegen wurden Konzentrationen sowohl oberhalb als auch unterhalb der Dosierung von 1,4 mg/ml betrachtet.

Bei geringeren Konzentrationen gab es eine Annäherung an die Werte der Kontrollgruppe. Der Versuch der Dosisanpassung hat ebenfalls ergeben, dass hSGSCs auch noch unter höheren Konzentrationen von Gentamicin proliferieren. Eine Konzentration von 2,1 mg/ml scheint im zeitlichen Verlauf zu einer Stagnation der Proliferation zu führen, während die höchste Konzentration von 2,8 mg/ml am siebten Tag eine niedrigere Zellzahl aufwies als

zwei Tage zuvor. Es konnte jedoch eine signifikant negative Korrelation zwischen den Zellzahlbestimmungen und den Gentamicin-Konzentrationen beobachtet werden. Bei der statistischen Analyse der Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der Versuche der Dosisanpassung ergab sich, dass entweder der Experimenttag allein oder die Interaktion zwischen Experimenttag und Gentamicin-Konzentration bedeutend waren. Die Konzentration allein stellte keinen signifikanten Einflussfaktor dar. Dies bedeutet, dass die zeitliche Komponente und in diesem Zusammenhang auch die repetitive Gabe von Gentamicin einen entscheidenden Einfluss – zumindest auf die Wachstumskinetik und den Zellindex – hatten (Abb. 12 & 13). Bei einer Erhöhung der Applikationsfrequenz von Gentamicin könnte dementsprechend ein höherer negativer Einfluss auf die Zellen ersichtlich werden.

Die Konzentration der Antibiotika intra- beziehungsweise extrazellulär hängt *in vivo* von unterschiedlichen Faktoren ab. Hierzu gehören die Darreichung der Antibiotika, sowie die Liberation, die Absorption, die Distribution, der Metabolismus und die Exkretion. Somit wird eine potenzielle Zellschädigung durch die Antibiotikakonzentration am Wirkort ebenfalls beeinflusst. Die Betrachtung eines *Ex-vivo*-Modells ist von entscheidender Wichtigkeit, da diese Vorgänge realitätsnäher nachvollzogen werden können.

8.3 Fusidinsäure

8.3.1 Klinische Dosierung

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass Fusidinsäure in einer Dosierung von 1mg/ml innerhalb von 24 Stunden nach Applikation letal für die Zellen war. Dieser Effekt ließ unabhängig von den Spendenden und der Methodenwahl beobachten (Abb. 12 & 13).

Es gibt nur wenige Studien, die den Einfluss von Fusidinsäure auf Zellen untersuchen, die an der kutanen Wundheilung oder der Konstruktion von *in vitro* gezüchteten Hautersatzprodukten beteiligt sind. Es wurde aber *in vitro* beobachtet, dass die Migration von Leukozyten durch Fusidinsäure gehemmt wird, was vor allem in der Inflammationsphase einen negativen Effekt auf die Wundheilung darstellen könnte (Forsgren und Schmeling 1977, Naess et al. 1990). Die Toxizität von Fusidinsäure auf Keratinozyten *in vitro* wurde mittels Neutralrot-Aufnahme-Assay über 24 Stunden nach Zugabe der Substanz untersucht (Teepe et al. 1993). Dabei wurden verschiedene Konzentrationen getestet, wobei die höchste Dosierung von 0,05 % Fusidinsäure

(0,5 mg/ml) weit unterhalb der topischen klinischen Dosierung (20 mg/ml) lag. Bereits bei Dosierungen unter 0,001 % (0,1 mg/ml) Fusidinsäure war eine Schädigung der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu beobachten (Teepe et al. 1993).

In Versuchen mit embryonalen Fibroblasten wurde beobachtet, dass Fusidinsäure die Zellmembran schädigte (Thelestam und Mollby 1980). Nach der Inkubation mit Fusidinsäure in den Konzentrationen von 120 µg/ml bis 1200 µg/ml konnten bereits nach 30 min zytoplasmatische Marker als Zeichen einer Membranschädigung im Zellüberstand nachgewiesen werden (Thelestam und Mollby 1980). Die Membranschädigung war in den Konzentrationen 120 µg/ml und 400 µg/ml noch nicht sehr ausgeprägt, nahm aber mit einer höheren Konzentration zu (Thelestam und Mollby 1980). Bei der in dieser Arbeit genutzten Dosierung von 1 mg/ml wurden die Membranschädigungen als ausgeprägt beschrieben, was mit den Beobachtungen der untersuchten hSGSCs übereinstimmt (Thelestam und Mollby 1980).

Die drastischen Effekte der Fusidinsäure führten schon nach kurzer Zeit zu so geringen Zellzahlen, dass oft die Nachweisbarkeitsgrenze der genutzten Methodik erreicht wurde. Aufgrund der Ergebnisse, Nullwerte beziehungsweise schwankende Ergebnisse bei den Zellzahlbestimmungen zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation.

Auch die Untersuchung der Wirkmechanismen per Durchflusszytometrie wurde durch die nur wenigen detektierten Zellen erschwert. Da der Großteil dieser wenigen Treffer bereits einen Tag nach Fusidinsäure-Zugabe Annexin- oder PI-positiv waren, werden die Erkenntnisse der anderen Methoden unterstützt, dass Fusidinsäure sehr schnell zu einer irreversiblen Schädigung und damit einem Absterben der Zellen führte. In der Literatur wurde berichtet, dass Fusidinsäure die Proteinbiosynthese durch einen Einfluss auf ribosomale Prozesse eukaryontischer Zellen negativ beeinflusst (Tanaka et al. 1969, Mazumder 1975a, Mazumder 1975b). Ob dies die letale Wirkung innerhalb des doch kurzen Zeitraumes erklären könnte, ist eher unwahrscheinlich. Da Fusidinsäure aber in den Zellen akkumuliert, sind weitere intrazelluläre Interaktionen möglich (Lemaire et al. 2011). Ein Einfluss des pH-Wertes durch die Fusidinsäure war sehr unwahrscheinlich, weil eine pH-Messung der Medien vor den Versuchen einen pH von 7,6 mit 1 mg/ml und einen pH von 7,64 ohne Fusidinsäure gezeigt hatte.

8.3.2 Dosisanpassung von Fusidinsäure

Da Fusidinsäure in der Konzentration von 1 mg/ml letal war, wurde eine dosisabhängige Änderung der Proliferation mit geringeren Konzentrationen untersucht.

Bei 0,05 mg/ml und 0,1 mg/ml Fusidinsäure konnte eine Proliferation von hSGSCs stattfinden. Die Impedanzmessungen ergaben ein ähnliches Bild. Zudem konnte durch die hohe Dichte an Messzeitpunkten die Auswirkung der Repetitionsdosis nach dem Mediumwechsel gut erkannt werden. Die langsame Erholung der Zellindizes könnten hier bei den beiden geringsten Dosierungen auf einen Zerfall der Substanz oder einen nur geringen Stressimpuls durch das Antibiotikum zurückzuführen sein. Bei Chromatographie-Versuchen konnte die Stabilität der Fusidinsäure mit Dosierungen von 0,125–0,25 mg/ml über 24 Stunden nachgewiesen werden (Lemaire et al. 2011). Also spielt der Zerfall der Substanz eher keine Rolle. Wahrscheinlich konnten Dosierungen unterhalb von 0,25 mg/ml Fusidinsäure keine endgültige Schädigung der Zellen durch die repetitive Applikation bewirken. Die erhobenen Daten passen zu den Beobachtungen in der Studie zur Membranschädigung, wobei niedrigen Konzentrationen Fusidinsäure nur geringe Schädigungen nachgewiesen wurden, die jedoch mit einer Dosiserhöhung stark zunahm (Thelestam und Mollby 1980).

Im Gegensatz zu den Gentamicin-Gruppen konnte in Versuchen der Zellzahlbestimmung bei den Fusidinsäuregruppen die Konzentration allein als signifikanter Einflussfaktor eruiert werden. Dies spiegelte sich bei den Impedanzmessungen jedoch nicht wider. Hier waren nur der Experimenttag und die Interaktion zwischen dem Experimenttag und den Konzentrationen von Bedeutung. Möglicherweise spielt hier die punktuelle Betrachtung der Impedanzmessung zu den Zeitpunkten der Zellzahlbestimmung für die statistische Berechnung eine Rolle.

Zusammenfassend können die hSGSCs bei sehr geringen Fusidinsäurekonzentrationen noch proliferieren. Dies müsste in Kopplung mit mikrobiologischen Untersuchungen weitergehend differenziert betrachtet werden.

8.4 Antibiotika und Stammzellen in einem *Ex-vivo*-Hautmodell

Beim *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell *Punch-in-a-Punch* wird eine Hautstanze aus Spender*innenhaut gewonnen und kultiviert. Das Setzen einer (definierten) Wunde in diese Stanze ermöglicht es, die Wundheilung zu verfolgen und die Wirkungen verschiedener Substanzen zur Wundbehandlung zu beobachten.

Dieses *Ex-vivo*-Modell wurde genutzt, um einen ersten Ausblick auf den Einfluss von Gentamicin und Fusidinsäure zusammen mit hSGSCs in einem komplexeren System beurteilen zu können. Die Proliferationshemmung von Gentamicin und die Letalität von Fusidinsäure *in vitro* führten zunächst zu der Schlussfolgerung, dass eine simultane Anwendung mit Gentamicin möglich sein sollte, während Fusidinsäure nicht geeignet schien. Der Entschluss auch im *Ex-vivo*-Modell auf die Dosierung von 1mg/ml Fusidinsäure zurückzugreifen wurde aufgrund der Berichte von protektiven Faktoren, wie zum Beispiel Proteinbindung oder das physiologische Zusammenspiel von Epidermis und Dermis, gefasst (Carsin et al. 2000, Junker et al. 2015).

Wie bei Liao et al. und Sturmheit et al. konnte eine abgrenzende Zellschicht nach Kultivierung mit hSGSCs im inneren Punch nachgewiesen werden (Sturmheit et al. , Liao et al. 2019). Die Heilung der künstlichen Wunde war ebenfalls nach Zugabe von Gentamicin oder Fusidinsäure in klinischer Dosierung zu beobachten. Letzteres ist unter der Berücksichtigung der letalen *In-vitro*-Ergebnisse nach Kultivierung in Fusidinsäurehaltigem Medium bedeutsam. Als mögliche Erklärung für den im Gegensatz zu den *In-Vitro*-Versuchen nicht letalen Effekt der Fusidinsäure kommt zunächst das geringe Volumen des Mediums in Betracht. Der innere *Punch* wurde lediglich mit ~80.000 Zellen in 2 µl Medium befüllt. Um eine gleichmäßige Verteilung des Antibiotika-haltigen Mediums bei diesen geringen Volumina zu gewährleisten, wurde ein Spülschritt durchgeführt. Das Zellpellet wurde einmal im entsprechenden Medium (DMEM, Gentamicin-haltiges DMEM beziehungsweise Fusidinsäure-haltiges DMEM) gewaschen. Danach erfolgte das Resuspendieren im entsprechenden Medium zum Ausbringen der Zellsuspension in den inneren *Punch*. Dennoch könnte dieses geringe Volumen, vor allem in Verbindung mit und in Relation zu den physiologischen Puffersystemen der Stanze, der Grund sein, warum keine erhöhten LDH-Ausschüttungen der Antibiotikagruppen im Vergleich zur DMEM-Kontrollgruppe beobachtet werden konnten. Die Proteinbindung – und in einer *In-vivo*-Umgebung auch der Blutfluss beziehungsweise die physiologische Wechselwirkung zwischen Keratinozyten und der Dermis – wurden als mögliche protektive Faktoren bei Anwendung topischer Antibiotika, auch in hohen Dosierungen, diskutiert (Carsin et al. 2000, Junker et al. 2015). Nach der Transplantation von CEAs bei Verbrennungswunden wurden mit Polymixin, Neomycin und Kortikosteroiden getränkte Verbände angewendet (Carsin et al. 2000). Unter dieser Behandlung wurden weniger Infektionen bei gleichzeitig nur geringen negativen Effekten auf die transplantierten Keratinozyten beobachtet (Carsin et al.

2000). Da auch die Antibiotika Gentamicin und Fusidinsäure in der Regel in einer Kombinationstherapie angewendet werden, müsste auch eine solche Therapie in Betracht gezogen und weitergehend untersucht werden (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2010, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2020).

In einem Vollhautwundmodell an Ratten wurde die topische Applikation von Fusidinsäure (0,25 g), Rifampicin (0,1 ml) und PBS als Kontrollgruppe und deren Auswirkung auf die Wundheilung über 21 Tage betrachtet (Gurel et al. 2015). Die Dosierung wurde in der Studie nicht genau angegeben. Bei Verwendung einer Creme mit 20 mg/g Fusidinsäure könnte es sich etwa um 5 mg/0,25 g auf einer Wundfläche von 0,79 cm² handeln. Bezüglich der Vergleichsgruppen konnte im Hinblick auf die Ausbildung des Wundschorfes, die Fibrinproduktion und die Ödembildung kein Unterschied beobachtet werden. Das Aufkommen von Makrophagen und Lymphozyten war ebenfalls in allen Gruppen ähnlich. Die epitheliale Proliferation war erst nach 21 Tagen in den Kontrollgruppen ausgeprägter als in den beiden Antibiotikagruppen. Zu diesem Zeitpunkt konnten in den Fusidinsäure- und Kontrollgruppen eine erhöhte Anzahl an Fibroblasten sowie Kollagenfasern nachgewiesen werden. Dies werteten die Autoren als eine verlängerte Proliferationsphase und somit als eine mögliche verlängerte Wundheilung durch die Antibiotikaeinwirkung (Gurel et al. 2015). In dieser Arbeit konnte ebenfalls kein Unterschied bei der Epithelialisierung der Wunde beobachtet werden. Dabei ist zu beachten, dass eine tiefgreifende histologische Analyse, um den Phasenverlauf der Wundheilung genauer zu betrachten, in diesem Rahmen nicht durchgeführt worden ist.

In den Versuchen für diese Arbeit wuchsen bei den Stanzen aller Zelltherapie-Gruppen abgrenzende Zellschichten ein. Dies spricht für eine positive Beeinflussung der Wundheilung durch hSGSCs, auch bei gleichzeitiger Applikation von Gentamicin oder Fusidinsäure in den hier getesteten Dosierungen. Eine feuchte Wundbehandlung lediglich mit DMEM im inneren Punch führte zu keinem vollständigen Einwachsen einer abgrenzenden Zellschicht (Abb. 17). Dies war bereits in vorherigen Versuchsreihen nachgewiesen worden (Sturmheit et al. , Liao et al. 2019). Nach der Normalisierung auf die interne Kontrollgruppe (Wundbehandlung mit hSGSC 14 im jeweiligen Experiment) konnte über die Gruppen hinweg kein signifikanter Unterschied in der Zungenlänge, -fläche oder residualen Wundfläche zwischen der Kontroll-, Gentamicin-, oder Fusidinsäuregruppe

beobachtet werden. Einer gleichzeitigen Anwendung von hSGSCs und Antibiotika scheint demnach nichts im Wege zu stehen.

In einem Tiermodell konnte bereits während der dermalen Regeneration eine verbesserte Vaskularisierung nachgewiesen werden und auch in einem humanen *Punch-in-a-Punch*-Wundheilungsmodell bestand der Verdacht auf eine Stimulation der Angiogenese (Danner et al. 2012, Liao et al. 2019). Diese könnte die protektiven Faktoren, wie beispielsweise Proteinbindung und Blutfluss, *in vivo* weiter verstärken und toxische Einflüsse durch die Behandlung mit Antibiotika abmildern. Des Weiteren könnte eine bessere Versorgung des Wundareals, vor allem im Hinblick auf chronische Wunden mit einer schlechten Durchblutung, die Wundheilung additiv fördern.

Als weiterer Schritt, um eine Anwendung *in vivo* zu ermöglichen, wird eine passende Applikationsform der hSGSCs benötigt. In diesem *Ex-vivo*-Modell wurde eine Zellsuspension in den inneren Punch eingebracht. Ein Ausbringen in wässriger Lösung ist aufgrund der physikalischen Eigenschaften nicht geeignet, da eine Lagerung der Patientin oder des Patienten möglich sein muss. Dies ist insbesondere bei der Versorgung von Ulzerationen, die sich häufig an den Beinen, also abhängende Körperpartien befinden, und gerade bei mobilen Patient*innen von Bedeutung. Außerdem würde sich bei einer notwendigen Bettruhe mit eingeschränkten Lagerungsmöglichkeiten das Komplikationsrisiko erhöhen, beispielsweise durch Thrombosen oder Dekubiti. Bei intensivmedizinisch betreuten Verbrennungspatient*innen, vor allem wenn ein ausgedehntes Verletzungsmuster besteht, ist eine Lagerung unter jeglichen Umständen bereits erschwert. Unter diesen Aspekten und in Anbetracht dessen, dass eventuell bereits empfindliche Transplantationen oder Deckungen im Behandlungsverlauf erfolgten, ist eine unempfindlichere Applikationstechnik notwendig.

In einigen Versuchen konnten hSGSCs erfolgreich in beziehungsweise mit Matrices, beispielsweise Matrigel® oder Hydrogel, kultiviert werden (Danner et al. 2012, Mehnert et al. 2014). Dies könnte sowohl die Möglichkeit eines robusteren Applikationsweges als auch die Grundlage von Zellkombinationen darstellen, ähnlich wie bei bereits eingesetzten Produkten (Tabelle 3 im Anhang) (Ronfard et al. 2000). Gegebenenfalls ist das Einbinden eines Antibiotikums auf diesem Wege auch möglich. Bei Eingriffen am Knochen wird Gentamicin ebenfalls lokal angewendet. Es ist in Knochenzement oder auch in Antibiotika-Ketten oder Kollagen-Schwämmen zu finden. Im Gegensatz zu den ersten beiden

Möglichkeiten sind diese Schwämme resorbierbar und müssen dementsprechend nicht entfernt werden (Schimmer et al. 2017). Es erfolgt eine retardierte Freisetzung, die insbesondere im Hinblick auf die vulnerable Phase nach der Transplantation von Vorteil sein könnte, da sich keine zusätzliche Manipulation als notwendig erweisen würde. Die vulnerable Phase nach der Transplantation von Keratinozyten wird mit zwei bis sechs Wochen während der Ausbildung der physiologischen kutanen Verankerung angegeben (Meuli und Raghunath 1997).

Da die Stagnation der Zellproliferation und der metabolischen Aktivität im zeitlichen Verlauf nach der Repetitionsdosis deutlich wurde, wäre die Applikationsfrequenz des Stoffes *in vivo* möglicherweise von Bedeutung. In diesem Zusammenhang wäre zu erörtern, ob eine Applikation von Antibiotika repetitiv oder – ähnlich wie bei einer *Single-Shot*-Antibiose – einmalig vor beziehungsweise während einer Intervention erfolgen sollte. Eine systemische prophylaktische Antibiotikatherapie, wie sie in Studien mit CEAs durchgeführt wurde, kann auf diese Weise gegebenenfalls reduziert werden (Carsin et al. 2000).

Das Alter der Hautspendenden in den Versuchen für diese Arbeit lag über dem der hSGSC-Spendenden. Während die hSGSC Spendenden zwischen 17 und 38 Jahren alt waren, lag das Alter der Hautspendenden zwischen 52 und 76 Jahren. Die Tatsache, dass sich unabhängig vom Alter eine abgrenzende Zellschicht bei allen drei Spendenden entwickle, deutet auf die bestehende Regenerationskapazität der Haut *ex vivo* und auf eine vielversprechende Anwendung *in vivo* hin. Bisher erfolgten bereits zahlreiche Transplantationen von autologen und allogenen Keratinozyten in Form von CEAs beziehungsweise Kombinationsprodukten mit Kollagen oder Fibroblasten. Die Vergleichbarkeit der Studien ist bei inkonstanten Beurteilungsparametern und den teils kurzen Beobachtungszeiträumen und unterschiedlichen Produkten erschwert (Meuli und Raghunath 1997). Bei der Versorgung von einem älteren Patientenklentel wurden bei unterschiedlichen Indikationen sowohl erfolgreiche als auch ernüchternde Ergebnisse allogener und autologer Transplantationen beschrieben (Leigh und Purkis 1986, Leigh et al. 1987, Harris et al. 1993, Meuli und Raghunath 1997, Tausche et al. 2004).

Es bedarf näherer Klärung, ob eine autologe hSGSC-Transplantation die Wundheilung positiver beeinflusst oder gegebenenfalls eine allogene hSGSC-Transplantation mit gegebenenfalls jüngeren und fraglich aktiveren Zellen vielversprechender sein könnte. Allerdings ergab sich bei den hSGSC 36 als *in vitro* proliferationsstarke Zelllinie kein Trend

zu einer erhöhten Zungenlänge oder Zungenfläche während der *Ex-vivo*-Versuche. Die Betrachtung der parakrinen Kapazitäten könnte hier neue Erkenntnisse bringen.

Bei der Nutzung allogener Zellen stellt sich die Frage, ob diese auch weiterhin im transplantierten Areal nachweisbar sein würden und ob sich hieraus Komplikationen, wie beispielsweise Abstoßungsreaktionen ergeben könnten. Bei autologen CEA-Transplantationen nach Verbrennungen wurde ein jüngeres Alter als signifikanter Faktor für ein besseres initiales Anwachsen des Transplantates beobachtet (Carsin et al. 2000). Die Altersspanne der Patient*innen betrug in dieser Studie 2,5 bis 70 Jahre (Carsin et al. 2000). Vier Wochen nach der Transplantation eines Kombinationsproduktes von Keratinozyten und Fibroblasten auf eine chronische Wunde konnte teilweise allogene DNS im transplantierten Areal nachgewiesen werden. Dies war nach acht Wochen nicht mehr der Fall (Phillips et al. 2002). Bei akuten Wunden wurde ebenfalls berichtet, dass nach vier Wochen teils eine Persistenz allogener DNS nachgewiesen werden konnte, wobei spätere Zeitpunkte nicht betrachtet wurden (Phillips et al. 2002).

Der Nachweis von Spender*innenzellen im *Punch-in-a-Punch*-Modell oder auch nach einer *In-vivo*-Anwendung könnte beispielsweise durch die Paarung eines genetisch männlichen Zellspenders bei einer genetisch weiblichen Empfängerin durch den Nachweis des Y-Chromosomes via *Fluorescence-in-situ-Hybridization* gelingen. Eine Beobachtung über einen ähnlichen Zeitraum von vier bis acht Wochen wie bei der oben genannten Studie ist im *Punch-in-a-Punch-ex-vivo*-Modell, aufgrund der eingeschränkten Kultivierungsdauer nicht möglich

In den *Ex-vivo*-Versuchen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Hier besteht der Bedarf, größer angelegte Studien durchzuführen, um dies mit einer größeren Stichprobe und weiteren Auswertungsparametern zu überprüfen. Die ist insbesondere aufgrund der in dieser Arbeit geringen Anzahl an Datenpunkten, die für die statistische Auswertung zur Verfügung standen, relevant. In dieser Arbeit wurde als Ausblick zunächst der Fokus auf die drei Medium-Stimulationen gelegt und die Zelllinien zunächst nicht näher betrachtet, um einen Vergleich der Substanzen zu ermöglichen. In zukünftigen Experimenten wäre daher eine differenziertere Betrachtung notwendig.

Als weitere Auswertungsparameter würden sich beispielsweise intensivere histologische Auswertungen oder die Nutzung der optischen Kohärenz-Tomographie, wie sie bei Sturmheit et al. durchgeführt wurde, dafür anbieten (Sturmheit et al.). Des Weiteren bedarf der Schädigungsmechanismus der beiden Substanzen weiterer Untersuchungen. Hier sind

zum Beispiel DNS-Veränderungen durch reaktive Sauerstoffspezies und die Analyse von Hypoxie-induzierten Faktoren, wie sie bei Gentamicin beschrieben worden sind, von Bedeutung (Elliott und Jiang 2019). Die Kontrolle von Membranschädigungen von hSGSCs unter dem Einfluss von Fusidinsäure ist bei ähnlichen Berichten für andere Zelllinien von Interesse (Thelestam und Mollby 1980). Des Weiteren stehen die Evaluationen einer Dosisanpassung in mikrobiologischen Untersuchungen sowie einer geeigneten Applikationsart für die Zellen in einem Verbund mit den Substanzen aus.

Die unterschiedlichen Ergebnisse des *Ex-vivo*-Modells im Vergleich zu den verschiedenen Methoden der *In-vitro*-Versuche zeigen, dass eine Betrachtung des Zusammenspiels von Zellen und Medikamenten in einem komplexeren System von Bedeutung ist. Auch wenn das *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell aufwendiger ist, so ist es doch realitätsnäher und hat das Potenzial den Bedarf an Tierversuchen zu reduzieren.

9 Zusammenfassung

Vor allem Verbrennungspatient*innen profitierten schon seit den 1980er Jahren von Hauttransplantaten aus *in vitro* kultivierten Zellen. Die Indikationen wurden im Laufe der Zeit umfassender, genau wie die genutzten Zelllinien sowie Kombinationen von Zelllinien oder Zellen mit Materialien. Als unerwünschte Wirkung gelten Transplantatversagen aufgrund von Infektionen, die durch Anwendungen von Antibiotika verhindert werden könnten.

Für humane Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen (hSGSCs) konnten bisher in Wundheilungsversuchen bei einem Maus- sowie einem humanen *Ex-vivo*-Modell wundheilungsfördernde Kapazitäten nachgewiesen werden.

Hinsichtlich einer potenziellen simultanen Anwendung von hSGSCs und antimikrobiellen Substanzen wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen der Antibiotika Gentamicin und Fusidinsäure auf die Proliferation, Viabilität und metabolische Aktivität von hSGSCs untersucht. Bei einer der klinischen Dosierung angelehnten Konzentration von 1,4 mg/ml Gentamicin und 1 mg/ml Fusidinsäure konnten eine signifikante Abnahme der Proliferation und der metabolischen Aktivität der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Fusidinsäure wirkte sogar letal für die Zellen, was bei der Erhebung der Vitalität via durchflusszytometrischer Bestimmung Annexin- und PI-positiver Fraktionen nochmals deutlich wurde. Bei den Gentamicin-Gruppen wurde kein Trend zu höheren Annexin-beziehungsweise PI-positiven Fraktionsanteilen beobachtet. Eine genauere Untersuchung unterschiedlicher Dosierungen von Gentamicin (0,14–2,8 mg/ml) und Fusidinsäure (0,05–1 mg/ml) zeigte eine mögliche Erhöhung der Dosis für Gentamicin, während nur bei den geringsten Konzentrationen von Fusidinsäure die Zellen *in vitro* weiter proliferieren konnten. In einem *Ex-vivo*-Modell wurde bei Hautstanzen mit einem Laser eine künstliche Wunde gesetzt, die anschließend mit hSGSCs und Antibiotika in klinischer Dosierung behandelt wurde. Dabei ergaben sich bei Vitalitätstestungen und mikroskopischen Auswertungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen. Durch die Unterschiede zwischen den vielfältigen *In-vitro*-Methoden und dem *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell wird die Bedeutung der aufwändigeren, aber realitätsnäheren Untersuchungsmodelle deutlich. Die gleichzeitige Nutzung von Zellen und Antibiotika scheint nach den ersten Erkenntnissen möglich zu sein, auch wenn weitere Versuche, zum Beispiel mit einer Kombination verschiedener Medikamente oder mikrobiologische Betrachtungen, notwendig sind.

10 Literaturverzeichnis

- Abdo J, Sopko N und Milner S (2020). "The applied anatomy of human skin: A model for regeneration." Wound Medicine 28: 100179.
- Assadian O und Kramer A (2012). Lokalbehandlung sekundär heilender Wunden - Wundinfektionen und Wundantiseptik. Wundatlas - Kompendium der komplexen Wundbehandlung. H. Lippert. Stuttgart, Thieme: 76-90.
- Aust M (2011). Wundheilung und Wundbehandlung - Grundlagen der Wundbehandlung. Praxis der Plastischen Chirurgie. P. Vogt. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 13-17.
- Aust M, Reimers K und Sorg H (2011). Wundheilung und Wundbehandlung - Biologische Grundlagen der Wundheilung. Praxis der Plastischen Chirurgie. P. Vogt. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 3-11.
- Battistella M, Vercaigne L, Cote D und Lok C (2010). "Antibiotic lock: in vitro stability of gentamicin and sodium citrate stored in dialysis catheters at 37 degrees C." Hemodial Int 14(3): 322-326.
- Biedermann T, Pontiggia L, Bottcher-Haberzeth S, Tharakan S, Braziulis E, Schiestl C, Meuli M und Reichmann E (2010). "Human eccrine sweat gland cells can reconstitute a stratified epidermis." J Invest Dermatol 130(8): 1996-2009.
- Bookstaver P, Rokas K, Norris L, Edwards J und Sherertz R (2013). "Stability and compatibility of antimicrobial lock solutions." Am J Health Syst Pharm 70(24): 2185-2198.
- Bottcher-Haberzeth S, Biedermann T, Pontiggia L, Braziulis E, Schiestl C, Hendriks B, Eichhoff OM, Widmer DS, Meuli-Simmen C, Meuli M und Reichmann E (2013). "Human eccrine sweat gland cells turn into melanin-uptaking keratinocytes in dermo-epidermal skin substitutes." J Invest Dermatol 133(2): 316-324.
- Brockmann I, Ehrenpfordt J, Sturmheit T, Brandenburger M, Kruse C, Zille M, Rose D und Boltze J (2018). "Skin-Derived Stem Cells for Wound Treatment Using Cultured Epidermal Autografts: Clinical Applications and Challenges." Stem Cells Int 2018: 4623615.
- Carey M und Small D (1971). "Micellar properties of sodium fusidate, a steroid antibiotic structurally resembling the bile salts." J Lipid Res 12(5): 604-613.
- Carsin H, Ainaud P, Le Bever H, Rives J, Lakhel A, Stephanazzi J, Lambert F und Perrot J (2000). "Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients." Burns 26(4): 379-387.
- Chan R, Zamora D, Wrice N, Baer D, Renz E, Christy R und Natesan S (2012). "Development of a vascularized skin construct using adipose-derived stem cells from debrided burned skin." Stem Cells Int 2012: 841203.
- Cooper M, Boyce S, Hansbrough J, Foreman T und Frank D (1990). "Cytotoxicity to cultured human keratinocytes of topical antimicrobial agents." J Surg Res 48(3): 190-195.
- Cooper M, Laxer J und Hansbrough J (1991). "The cytotoxic effects of commonly used topical antimicrobial agents on human fibroblasts and keratinocytes." J Trauma 31(6): 775-782; discussion 782-774.
- Cui CY und Schlessinger D (2015). "Eccrine sweat gland development and sweat secretion." Exp Dermatol 24(9): 644-650.
- Danner S, Kremer M, Petschnik A, Nagel S, Zhang Z, Hopfner U, Reckhenrich A, Weber C, Schenck T, Becker T, Kruse C, Machens H und Egana J (2012). "The use of human sweat gland-derived stem cells for enhancing vascularization during dermal regeneration." J Invest Dermatol 132(6): 1707-1716.
- Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin (DGV). (2021). "Leitlinie „Behandlung thermischer Verletzungen des Erwachsenen“ - S2k - AWMF-Registernummer: 044-00." Tag des Zugriffs: 08.07.2023, https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/044-0011_S2k_Behandlung-thermischer-Verletzungen-des-Erwachsenen_2021-07.pdf.

- Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. (2012). "Leitlinie „Lokaltherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz“ - S3- AWMF-Registernummer: 091/001." Tag des Zugriffs: 08.07.2023, https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/091-0011_S3_Lokaltherapie_chronischer_Wunden_2012-ungueltig.pdf.
- Dissemond J (2014). "[Chronic wounds and bacteria. Clinical relevance, detection and therapy]." *Hautarzt* 65(1): 10-14.
- Elliott R und Jiang X (2019). "The adverse effect of gentamicin on cell metabolism in three cultured mammary cell lines: "Are cell culture data skewed?"" *PLoS One* 14(4): e0214586.
- Flournoy D (1978). "Inactivation of netilmicin by carbenicillin." *Infection* 6(5): 241.
- Forsgren A und Schmeling D (1977). "Effect of antibiotics of chemotaxis of human leukocytes." *Antimicrob Agents Chemother* 11(4): 580-584.
- Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S und Kempson I (2021). "The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis." *Int J Mol Sci* 22(23).
- Giaever I und Keese C (1991). "Micromotion of mammalian cells measured electrically." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17): 7896-7900.
- Glew R und Pavuk R (1983). "Stability of gentamicin, tobramycin, and amikacin in combination with four beta-lactam antibiotics." *Antimicrob Agents Chemother* 24(4): 474-477.
- Gravante G, Di Fede M, Araco A, Grimaldi M, De Angelis B, Arpino A, Cervelli V und Montone A (2007). "A randomized trial comparing ReCell system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns." *Burns* 33(8): 966-972.
- Greer S, Metcalf J, Wang Y und Ohh M (2012). "The updated biology of hypoxia-inducible factor." *EMBO J* 31(11): 2448-2460.
- Gurel M, Nayci S, Turgut A und Bozkurt E (2015). "Comparison of the effects of topical fusidic acid and rifamycin on wound healing in rats." *Int Wound J* 12(1): 106-110.
- Han G und Ceilley R (2017). "Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments." *Adv Ther* 34(3): 599-610.
- Harris I, Bottomley W, Wood E und Cunliffe W (1993). "Use of autografts for the treatment of leg ulcers in elderly patients." *Clin Exp Dermatol* 18(5): 417-420.
- Hecken J. (2019). "Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Häusliche Krankenpflege-Richtlinie: Versorgung von chronischen und schwer heilenden Wunden." Tag des Zugriffs: 08.07.2023, <https://www.aerzteblatt.de/treffer?mode=s&wo=17&typ=16&aid=211770&s=Wunden&s=chronische>.
- Henderson J, Polk R und Kline B (1981). "In vitro inactivation of gentamicin, tobramycin, and netilmicin by carbenicillin, azlocillin, or mezlocillin." *Am J Hosp Pharm* 38(8): 1167-1170.
- Hirsch T, Rothoefl T, Teig N, Bauer J, Pellegrini G, De Rosa L, Scaglione D, Reichelt J, Klausegger A, Kneisz D, Romano O, Secone Seconetti A, Contin R, Enzo E, Jurman I, Carulli S, Jacobsen F, Luecke T, Lehnhardt M, Fischer M, Kueckelhaus M, Quagliano D, Morgante M, Biccato S, Bondanza S und De Luca M (2017). "Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells." *Nature* 551(7680): 327-332.
- Horch R, Nord D, Augustin M, Germann G, Leffler M und Dragu A (2008). "[Economic aspects of surgical wound therapies]." *Chirurg* 79(6): 518-525.

- Hyldig K, Riis S, Pennisi C, Zachar V und Fink T (2017). "Implications of Extracellular Matrix Production by Adipose Tissue-Derived Stem Cells for Development of Wound Healing Therapies." Int J Mol Sci 18(6).
- Ichim T, O'Heeron P und Kesari S (2018). "Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells." J Transl Med 16(1): 212.
- Jockenhofer F, Gollnick H, Herberger K, Isbary G, Renner R, Stucker M, Valesky E, Wollina U, Weichenthal M, Karrer S, Klode J und Dissemond J (2013). "Bacteriological pathogen spectrum of chronic leg ulcers: Results of a multicenter trial in dermatologic wound care centers differentiated by regions." J Dtsch Dermatol Ges 11(11): 1057-1063.
- Jones S, Blazevic D und Balfour H (1976). "Stability of gentamicin in serum." Antimicrob Agents Chemother 10(5): 866-867.
- Junker J, Lee C, Samaan S, Hackl F, Kiwanuka E, Minasian R, Tsai D, Tracy L, Onderdonk A, Eriksson E und Catterson E (2015). "Topical delivery of ultrahigh concentrations of gentamicin is highly effective in reducing bacterial levels in infected porcine full-thickness wounds." Plast Reconstr Surg 135(1): 151-159.
- Kagiwada H, Fukuchi T, Machida H, Yamashita K und Ohgushi H (2008). "Effect of gentamicin on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells." Journal of toxicologic pathology 21(1): 61-67.
- Karow T (2012). Antimikrobielle Pharmaka und Infektionskrankheiten. Pharmakologie und Toxikologie. T. Karow.
- Kaur A, Midha S, Giri S und Mohanty S (2019). "Functional Skin Grafts: Where Biomaterials Meet Stem Cells." Stem Cells Int 2019: 1286054.
- Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth CP, O'Carroll SJ, du Mez E, Angel CE und Graham ES (2015). "Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time." Biosensors (Basel) 5(2): 199-222.
- Klein S, Schreml S, Dolderer J, Gehmert S, Niederbichler A, Landthaler M und Prantl L (2013). "Evidence-based topical management of chronic wounds according to the T.I.M.E. principle." J Dtsch Dermatol Ges 11(9): 819-829.
- Kober J, Gugerell A, Schmid M, Kamolz L und Keck M (2015). "Generation of a Fibrin Based Three-Layered Skin Substitute." Biomed Res Int 2015: 170427.
- Kobiela K, Kandyba E und Leung Y (2015). Skin and skin appendage regeneration. Translational Regenerative Medicine, Elsevier: 269-292.
- Köster I und Schubert I (2015). Epidemiologie und Versorgung von Patienten mit chronischen Wunden. Eine Analyse auf der Basis der Versichertenstichprobe AOK Hessen/KV Hessen. Abschlussbericht für MedInform - Informations- und Seminarservice Medizintechnologie, PMV Forschungsgruppe: 198.
- Kueckelhaus M, Rothoefl T, De Rosa L, Yeni B, Ohmann T, Maier C, Eitner L, Metze D, Losi L, Secone Seconetti A, De Luca M und Hirsch T (2021). "Transgenic Epidermal Cultures for Junctional Epidermolysis Bullosa - 5-Year Outcomes." N Engl J Med 385(24): 2264-2270.
- Kujath P und Michelsen A (2008). "Wounds - from physiology to wound dressing." Dtsch Arztebl Int 105(13): 239-248.
- Kyaw B, Jarbrink K, Martinengo L, Car J, Harding K und Schmidtchen A (2018). "Need for Improved Definition of "Chronic Wounds" in Clinical Studies." Acta Derm Venereol 98(1): 157-158.
- Langer A und Rogowski W (2009). "Systematic review of economic evaluations of human cell-derived wound care products for the treatment of venous leg and diabetic foot ulcers." BMC Health Serv Res 9: 115.

- Leigh I, Purkis P, Navsaria H und Phillips T (1987). "Treatment of chronic venous ulcers with sheets of cultured allogenic keratinocytes." Br J Dermatol 117(5): 591-597.
- Leigh IM und Purkis PE (1986). "Culture grafted leg ulcers." Clin Exp Dermatol 11(6): 650-652.
- Lemaire S, Van Bambeke F, Pierard D, Appelbaum P und Tulkens P (2011). "Activity of fusidic acid against extracellular and intracellular Staphylococcus aureus: influence of pH and comparison with linezolid and clindamycin." Clinical Infectious Diseases 52(suppl_7): S493-S503.
- Liao T, Lehmann J, Sternstein S, Yay A, Zhang G, Matthiessen A, Schumann S, Siemers F, Kruse C, Hundt J, Langan E, Tiede S und Paus R (2019). "Nestin(+) progenitor cells isolated from adult human sweat gland stroma promote reepithelialisation and may stimulate angiogenesis in wounded human skin ex vivo." Arch Dermatol Res 311(4): 325-330.
- Lipsky B und Hoey C (2009). "Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds." Clin Infect Dis 49(10): 1541-1549.
- Loots M, Lamme E, Zeegelaar J, Mekkes J, Bos J und Middelkoop E (1998). "Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds." J Invest Dermatol 111(5): 850-857.
- Lopes B, Sousa P, Alvites R, Branquinho M, Sousa A, Mendonça C, Atayde L und Maurício A (2021). "The Application of Mesenchymal Stem Cells on Wound Repair and Regeneration." Applied Sciences 11(7): 3000.
- Marks J und Miller J (2019). Structure and Function of the Skin. Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology J. J. M. James G. Marks, Elsevier. Sixth Edition.
- Matsumura H, Meyer N, Mann R und Heimbach D (1998). "Melting graft-wound syndrome." J Burn Care Rehabil 19(4): 292-295.
- Mazini L, Rochette L, Admou B, Amal S und Malka G (2020). "Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing." Int J Mol Sci 21(4).
- Mazumder R (1975a). "Inhibition by fusidic acid of an eukaryotic factor-promoted and 40S ribosomal subunit-dependent GTP'ase activity." FEBS Lett 51(1): 341-345.
- Mazumder R (1975b). "Sites of action of fusidic acid in eukaryotes. Inhibition by fusidic acid of a ribosome-independent GTPase from Artemia salina embryos." Eur J Biochem 58(2): 549-554.
- Mehnert J, Kisch T und Brandenburger M (2014). "Co-culture systems of human sweat gland derived stem cells and peripheral nerve cells: an in vitro approach for peripheral nerve regeneration." Cell Physiol Biochem 34(4): 1027-1037.
- Meuli M und Raghunath M (1997). "Burns (Part 2). Tops and flops using cultured epithelial autografts in children." Pediatr Surg Int 12(7): 471-477.
- Monfort A, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo J und Izeta A (2013). "Production of human tissue-engineered skin trilayer on a plasma-based hypodermis." J Tissue Eng Regen Med 7(6): 479-490.
- Naess A, Flo R und Solberg C (1990). "Effect of fusidic acid on migration and chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 9(1): 42-44.
- Nagel S, Rohr F, Weber C, Kier J, Siemers F, Kruse C, Danner S, Brandenburger M und Matthiessen AE (2013). "Multipotent nestin-positive stem cells reside in the stroma of human eccrine and apocrine sweat glands and can be propagated robustly in vitro." PLoS One 8(10): e78365.
- O'Reilly M, Young L, Kirkwood N, Richardson G, Kros C und Moore A (2019). "Gentamicin Affects the Bioenergetics of Isolated Mitochondria and Collapses the

- Mitochondrial Membrane Potential in Cochlear Sensory Hair Cells." Front Cell Neurosci 13: 416.
- O'Connor N, Mulliken J, Banks-Schlegel S, Kehinde O und Green H (1981). "Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells." Lancet 1(8211): 75-78.
- Petschnik A, Klatte J, Evers L, Kruse C, Paus R und Danner S (2010). "Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations." Br J Dermatol 162(2): 380-383.
- Phillips T, Manzoor J, Rojas A, Isaacs C, Carson P, Sabolinski M, Young J und Falanga V (2002). "The longevity of a bilayered skin substitute after application to venous ulcers." Arch Dermatol 138(8): 1079-1081.
- Ratiopharm. (2019). "Fachinformation Fusidinsäure-ratiopharm(R) 20 mg/g Creme." Tag des Zugriffs: 08.07.2023, <https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/label/Fusidinsaure-ratiopharm%2020%20mgg%20Creme%20-%204.pdf?pzn=10962562>.
- Rheinwald JG und Green H (1975). "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." Cell 6(3): 331-343.
- Rittié L, Sachs DL, Orringer JS, Voorhees JJ und Fisher GJ (2013). "Eccrine sweat glands are major contributors to reepithelialization of human wounds." Am J Pathol 182(1): 163-171.
- Ronfard V, Rives J, Neveux Y, Carsin H und Barrandon Y (2000). "Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix." Transplantation 70(11): 1588-1598.
- Scheithauer M und Riechelmann H (2003). "[Review part I: basic mechanisms of cutaneous woundhealing]." Laryngorhinootologie 82(1): 31-35.
- Schimmer C, Gross J, Ramm E, Morfeld BC, Hoffmann G, Panholzer B, Hedderich J, Leyh R, Cremer J und Petzina R (2017). "Prevention of surgical site sternal infections in cardiac surgery: a two-centre prospective randomized controlled study." Eur J Cardiothorac Surg 51(1): 67-72.
- Sierra-Sanchez A, Kim K, Blasco-Morente G und Arias-Santiago S (2021). "Cellular human tissue-engineered skin substitutes investigated for deep and difficult to heal injuries." NPJ Regen Med 6(1): 35.
- Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, Hainzl A, Schatz S, Qi Y, Schlecht A, Weiss J, Wlaschek M, Sunderkotter C und Scharffetter-Kochanek K (2011). "An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice." J Clin Invest 121(3): 985-997.
- Singer A und Clark R (1999). "Cutaneous wound healing." N Engl J Med 341(10): 738-746.
- Singh R, Franke K und Wielockx B (2012). "Hypoxia-mediated regulation of stem cell fate." High Alt Med Biol 13(3): 162-168.
- Spanholtz T, Theodorou P, Amini P und Spilker G (2009). "Severe burn injuries: acute and long-term treatment." Dtsch Arztebl Int 106(38): 607-613.
- Sturmheit T, Nissen N, Pfündl R, Landt S, Pfeiffer T, Draxinger W, Kren C, Wendt D, Ludwig R, Koop N, Huber R, Paus R, Brandenburger M, Kruse C und Hundt J Sweat gland-derived progenitor cells promote re-epithelialization in a newly standardised human skin wound healing assay
(In vitro culture of wounded full thickness human skin punches for wound healing assays employing sweat gland-derived Nestin+ progenitor cells) Publikation in Vorbereitung.
- Surin A, Sharipov R, Krasil'nikova I, Boyarkina D, Lisina O, Gorbacheva L, Avetisyan A und Pinelis V (2017). "Disruption of Functional Activity of Mitochondria during MTT Assay of Viability of Cultured Neurons." Biochemistry (Mosc) 82(6): 737-749.

- Tanaka N, Nishimura T, Kinoshita T und Umezawa H (1969). "The effect of fusidic acid on protein synthesis in a mammalian system." J Antibiot (Tokyo) 22(4): 181-182.
- Tausche A, Richter-Huhn G und Sebastian G (2004). "[Treatment of recalcitrant wounds with autologous epidermal equivalents. After excision of multiple cylindromas of the scalp]." Hautarzt 55(3): 296-300.
- Teepe R, Koebrugge E, Lowik C, Petit P, Bosboom R, Twiss I, Boxma H, Vermeer B und Ponc M (1993). "Cytotoxic effects of topical antimicrobial and antiseptic agents on human keratinocytes in vitro." J Trauma 35(1): 8-19.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2010). "Fusidic acid - Rationale for the EUCAST clinical breakpoints, version 1.0." Tag des Zugriffs: 08.07.2023, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Fusidic_acid_rationale_1.0_2010_Oct.pdf.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2020). "Gentamicin - Rationale for the EUCAST clinical breakpoints, version 2.0." Tag des Zugriffs: 08.07.2023, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Gentamicin_rationale_1.2_0906.pdf.
- Thelestam M und Mollby R (1980). "Cultured human fibroblasts as a model for evaluation of potential in vivo toxicity of membrane damaging antibiotics." Chem Biol Interact 29(3): 315-325.
- Trottier V, Marceau-Fortier G, Germain L, Vincent C und Fradette J (2008). "IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes." Stem Cells 26(10): 2713-2723.
- Tsai D, Tracy L, Lee C, Hackl F, Kiwanuka E, Minasian R, Onderdonk A, Junker J, Eriksson E und Caterson E (2016). "Full-thickness porcine burns infected with *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* can be effectively treated with topical antibiotics." Wound Repair Regen 24(2): 356-365.
- Unal S, Ersoz G, Demirkan F, Arslan E, Tutuncu N und Sari A (2005). "Analysis of skin-graft loss due to infection: infection-related graft loss." Ann Plast Surg 55(1): 102-106.
- Welsch U und Deller T (2010). Haut. Lehrbuch Histologie. München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer 3. Auflage: 465-483.
- Weyand B (2011a). Techniken der Defektdeckung - Transplantate. Praxis der Plastischen Chirurgie. P. Vogt. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 77—85.
- Weyand B (2011b). Techniken der Defektdeckung — Lappenplastiken. Praxis der Plastischen Chirurgie. P. Vogt. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 87—95.
- Witzel F, Fritsche-Guenther R, Lehmann N, Sieber A und Bluthgen N (2015). "Analysis of impedance-based cellular growth assays." Bioinformatics 31(16): 2705-2712.

11 Anhang

Tabelle 2: Verbrennungsgrade und ihre Charakteristika

Verbrennungsgrad	Symptome	Betroffene Hautschicht
1	Rötung Schmerz Schwellung	Epidermis
2a	Rötung Schmerz Blasen	Oberflächliche Dermis Hautanhangsgebilde intakt Rekapillarisation
2b	Kaum Schmerzen Rötung Blasen	Tiefe Dermis Hautanhangsgebilde betroffen Rekapillarisation schwach
3	Keine Schmerzen Nekrose Schwarzer/weißer oder lederartiger Wundgrund	Komplette Dermis
4	Verkohlung	Unterhautfettgewebe Faszien/Muskeln Knochen

Tabelle erstellt nach (Spanholtz et al. 2009, Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin (DGV) 2021)

Tabelle 3: Übersicht natürlich vorkommender Zellen zur Zelltherapie

Zellen	Ursprung	Vorteile	Nachteile	Referenzen
Epidermale Stammzellen				
<i>Epidermal stem cells</i> (Epi-SCs)	Interfollikuläre Epidermis	Exzision (ca. 3 - 9 cm ²) ausreichend Adulte Spendende / Autotransplantation mögl. Verschiedene Applikationsarten (z.B. CEAs, Sprays) Langjährige Erfahrung Kombinationen mit Trägermaterialien/Fibroblasten erprobt Studien / Fallberichte Kommerzielle Nutzung Allogen: schnelle Verfügbarkeit	Kosten Je nach Art ggf. empfindliche Transplantate (Trägerstoffe wie Gaze, Fibrin, Hyaluronsäure) Keine Anhangsgebilde Autolog: Kultivierungszeit (3-4 Wochen) Transplantatversagen Ulzerationen & maligne Transformationen Allogen: Abstoßung mögl.	(Gravante et al. 2007, Brockmann et al. 2018, Kaur et al. 2019, Sierra-Sanchez et al. 2021)
<i>Hair Follicle Stem Cells</i> (HF-SCs)	Haarfollikel	Haarfollikel ausreichend (40-350 anagene Haarfollikel) Kommerzielle Nutzung	s.o.	(Brockmann et al. 2018)
Keratinocyten aus Schweißdrüsen	Schweißdrüsen	Hautexzision Bildung einer stratifizierten Epidermis auf Fibroblasten & Kollagenhydrogel (Transplantation auf Ratten) Kombination mit Melanozyten führt zu physiolog. Verteilung der Melanozyten & Pigmentierung	Bisher keine humane Anwendung	(Biedermann et al. 2010, Bottcher-Haberzeth et al. 2013)
Fibroblasten		Exzision (ca. 3 - 9 cm ²) ausreichend Proliferation <i>In vitro</i> Induktion Differenzierung (u.a. adipogen, osteogen) Immunsuppressive Faktoren Unterschiedlichste Nischen	Unterschiedliche Nischen = unterschiedliche Subtypen? Allogen: Abstoßung mögl.	(Ichim et al. 2018)
Keratinocyten + Fibroblasten + Melanozyten	autolog	Spray Autolog Vitiligo-Therapie	Erfolg altersabhängig Melanozyten schwierig zu kultivieren Kancerogenität d. Melanozyten mögl.	(Kaur et al. 2019, Sierra-Sanchez et al. 2021)
Keratinocyten + Fibroblasten (<i>Bilayered-Skin-Substitute</i>)		Parakrine Faktoren Studien Abdeckung der Wunde Extrazelluläre Matrix Bisher keine Immunogenität der transplantierten Zellen Zulassung (z.B. FDA) Kein Nachweis allogener DNS Ausbildung reifer Epidermis und Dermis im Verlauf Gute ästhetische Resultate	Teils bovines Kollagen Studiengrößen	(Phillips et al. 2002, Ichim et al. 2018)
<i>Sweat Gland stroma derived Stem cells</i> (hSGSCs)	Schweißdrüsen -Stroma	Probe-Exzisionen ausreichend Adulte Spendende / Autotransplantation Parakrine Faktoren Vielfersprechend im <i>Ex-vivo</i> -Modell	Bisher keine <i>in vivo</i> Erfahrung	(Sturmheit et al., Danner et al. 2012, Nagel et al. 2013, Liao et al. 2019)
Mesenchymale Stammzellen (MSC)		Immunsuppression bzw. Immunmodulation über parakrine Faktoren (Reduktion Abstoßung) Studien Nutzen von Zellen oder konditioniertem Medium Unterschiedlichste Nischen		(Spanholtz et al. 2009, Ichim et al. 2018, Lopes et al. 2021, Sierra-Sanchez et al. 2021)

Zellen	Ursprung	Vorteile	Nachteile	Referenzen
Mesenchymale Knochenmarksstammzellen (<i>bone marrow derived mesenchymal stem cells</i> — BM-MSCs)	Knochenmark	Charakterisierung Geringe Immunogenität Vierversprechende Unterstützung der Wundheilung	Knochenmarkpunktion schmerzhaft & invasiv Geringer Stammzellanteil <i>In vitro</i> geringes Wachstum	(Ichim et al. 2018, Lopes et al. 2021)
Mesenchymale Nabelschnurstammzellen (<i>umbilical cord-derived stem cells</i> — UC-MSCs)	Nabelschnur	Nicht-invasive Gewinnung Hohes Proliferationsvermögen Unterstützen Gewebe-Regeneration und Wundheilung Differenzierung in epidermale Gewebe möglich Proliferation von dermalen Fibroblasten	i.d.R. keine Autotransplantation	(Mazini et al. 2020, Lopes et al. 2021)
Stammzellen aus Fettgewebe (<i>adipose tissue-derived stem cells</i> — ASCs)	Fettgewebe	Exzision oder Fettabsaugung Direkte Nutzung möglich (kein Zeitverzug durch Kultivierung) Autologe / allogene Nutzung Parakrine Faktoren (Proliferation, Differenzierung, Migration Unterstützen Wundheilung) Makrophagen Beeinflussung (Balance pro-/anti-inflammatorische Botenstoffe) Fibroblasten Beeinflussung (Zell-Zell-Kontakte, parakrin) Differenzierung (in Fibroblasten, Angioblasten, Keratinozyten) Synthese Proteine der Extrazellulärmatrix Kombinationen <i>Skin-Substitute</i> (Verfestigung Transplantat)	Heterogene Zellpopulation Lokalanästhetika könnten negative Auswirkung auf Zellen haben	(Chan et al. 2012, Mazini et al. 2020, Lopes et al. 2021)
Bilayered-Skin-Substitute	Keratinozyten + ASCs	Morphologisch Aufbau ähnlich normaler Haut Gute dermal-epidermale Verbindung Kein Trägermaterial Autolog möglich	Experimentell Bisher Maus-Modell	(Trottier et al. 2008)
Trilayered-Skin-Substitutes	Keratinozyten + Fibroblasten + ASCs (Fibrin) o. + BM-MSCs (Plasma Hydrogel)	3D-Transplantat mit allen Defektschichten Morphologisch Aufbau ähnlich normaler Haut Positiver Effekt auf Differenzierung Keratinozyten	Experimentell (bisher <i>in vitro</i>) Keine Vaskularisierung Umsetzung unterschiedlicher extrazellulär Matrix-Zonen (Induktion zur Differenzierung?)	(Trottier et al. 2008, Monfort et al. 2013, Kober et al. 2015)



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
KLINIK FÜR DERMATOLOGIE,
ALLERGOLOGIE UND VENEROLOGIE



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Fischer
Klinik für Dermatologie und Venerologie

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500- 4639
Fax: (0451) 500- 3026
email: erdmann@zuv.uni-luebeck.de

im Hause

Datum: 28.11.06
Aktenzeichen:
(immer angeben !) 06-109

nachrichtlich:
Herrn Prof. Zillikens, Direktor der
Klinik für Dermatologie und Venerologie

Sitzung der Ethik-Kommission am 18. Juli 2006
Antragsteller: Herr Dr. Fischer / Herr Prof. Zillikens

Titel: In-vitro-Untersuchung der Biologie des humanen Haarfollikels in bezug auf Wachstumseigenschaften, Apoptose, Wachstumsregulation, Pigmentierung und Immunprivileg im Haarorgankulturmodell
Ihr Schreiben vom 15. November 2006

Sehr geehrter Herr Dr. Fischer,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.
Die Kommission hat keine Bedenken.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
 Prof. Dr. F. Hohagen
(Psychiatrie)
Prof. Dr. Dendorfer
(Pharmakologie)

Frau H. Müller
(Pflege)
 Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)
Herr Dr. Fieber
(Richter am Landgericht Lübeck)
Prof. Schwinger

Herr Prof. Dr. Schunkert
(Medizinische Klinik I)
 Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)
 Herr D. Stojan

Abbildung 21: Genehmigung Ethikantrag — Aktenzeichen 06-109



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
KLINIK FÜR DERMATOLOGIE,
ALLERGOLOGIE UND VENEROLOGIE



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Klinik für Dermatologie, Allergologie
und Venerologie
Herrn Prof. Dr. med. Ralf Paus
- Experimentelle Dermatologie –
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Prof. Dr. Dr. Heiner Raspe
Telefon: (0451) 7 99 25 20
Fax: (0451) 7 99 25 22
email: Heiner.Raspe@uk-sh.de

Aktenzeichen:
(immer angeben !) 11.12.08
Ra-gr
AZ 06-109


Amendment für Ethikantrag

Hochverehrter Herr Kollege Paus,

als Vorsitzender der von Ihnen mit Schreiben vom 08.12.2008 adressierten „Hohen“ Ethikkommission gebe ich mir die Ehre, Ihr Amendment zu Ihrem Ethikantrag 06-109 ohne Anrufung der Gesamtkommission positiv zu bescheiden.

Hochachtungsvoll und mit allen guten Wünschen für einen positiven Verlauf Ihrer Forschung bleibe ich

Ihr sehr ergebener


Prof. Dr. med. Dr. phil. Hans-Heinrich Raspe

P.S.: Ich danke der Pathologie, Sie auf die aus Sicht der Kommission gegebenen Notwendigkeit des Amendments aufmerksam gemacht zu haben.

Nachrichtlich: Frau J. Erdmann, Dekanat
Frau Dr. A. Hüppe, IfS

Abbildung 22: Genehmigung erstes Amendment Ethikantrag — Aktenzeichen 06-109



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
PD Dr. med. Tobias Fischer
Klinik für Dermatologie und Venerologie

im Hause

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 500 4639
Fax: +49 451 500 3026
janine.erdmann@medizin.uni-
luebeck.de

Aktenzeichen: 06-109

Datum: 15. März 2012

In-vitro-Untersuchung der Biologie des humanen Haarfollikels in bezug auf Wachstumseigenschaften, Apoptose, Wachstumsregulation, Pigmentierung und Immunprivileg im Haarorgankulturmodell

Hier: Amendment 2 –Ihr Schreiben vom 13. März 2012

Sehr geehrter Herr Dr. Fischer,

das Amendment bezüglich der Nutzung von Haut aus anderen behaarten Arealen mit den folgenden Unterlagen habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen:

- Aufklärung und Einwilligung sowie
- Studienprotokoll.

Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Bitte beachten Sie folgenden Hinweis: Die Haarproben können nur vernichtet werden, wenn diese in pseudonymisierter Form vorliegen.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

Abbildung 23: Genehmigung zweites Amendment Ethikantrag — Aktenzeichen 06-109

a

Linie	Tag	Stimulation	1stQu	median	3rdQu	mean	sd
31	d1	DMEM	9840.00	10640.00	10680.00	9632.00	2270.75
31	d1	Fusidinsäure	0.00	84.00	254.00	118.80	128.98
31	d1	Gentamicin	6880.00	7040.00	7280.00	6994.40	2067.79
33	d1	DMEM	29300.00	33900.00	45700.00	37500.00	13498.89
33	d1	Fusidinsäure	84.50	86.00	152.00	115.00	89.86
33	d1	Gentamicin	29000.00	29800.00	33450.00	32800.00	6358.62
36	d1	DMEM	28360.00	28760.00	29010.00	30326.67	4491.73
36	d1	Fusidinsäure	84.50	128.00	171.50	118.67	61.34
36	d1	Gentamicin	30720.00	31500.00	35550.00	32186.67	4146.72
31	d3	DMEM	12560.00	13240.00	16360.00	14096.00	2444.68
31	d3	Fusidinsäure	84.00	86.00	86.00	102.40	93.48
31	d3	Gentamicin	10160.00	11040.00	12240.00	10640.00	2025.24
33	d3	DMEM	66200.00	72600.00	75100.00	71333.33	5805.74
33	d3	Fusidinsäure	0.00	43.00	149.00	71.00	83.61
33	d3	Gentamicin	54600.00	58600.00	61700.00	58333.33	5815.38
36	d3	DMEM	80850.00	89400.00	95700.00	88800.00	10011.19
36	d3	Fusidinsäure	105.50	214.00	321.00	214.00	161.00
36	d3	Gentamicin	71100.00	84000.00	85650.00	80000.00	10930.32
31	d5	DMEM	13760.00	15840.00	18160.00	15824.00	3761.98
31	d5	Fusidinsäure	86.00	86.00	172.00	120.80	98.76
31	d5	Gentamicin	11880.00	13240.00	13400.00	12904.00	2449.75
33	d5	DMEM	66900.00	72900.00	78900.00	75700.00	11468.74
33	d5	Fusidinsäure	214.00	637.00	868.00	679.33	603.11
33	d5	Gentamicin	56565.00	61500.00	62250.00	59180.00	5604.74
36	d5	DMEM	100200.00	102000.00	111600.00	105066.67	8596.43
36	d5	Fusidinsäure	106.25	256.50	407.50	342.83	372.34
36	d5	Gentamicin	95800.00	98000.00	105600.00	99200.00	11291.06
31	d7	DMEM	28160.00	28520.00	29560.00	28304.00	9621.25
31	d7	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.00	17.20	38.46
31	d7	Gentamicin	9600.00	15280.00	16120.00	13672.00	3908.80
33	d7	DMEM	95600.00	108800.00	112400.00	109333.33	27442.06
33	d7	Fusidinsäure	191.00	255.00	317.50	325.00	270.41
33	d7	Gentamicin	61880.00	73200.00	75760.00	69920.00	9591.46
36	d7	DMEM	125000.00	127500.00	143500.00	144166.67	36983.33
36	d7	Fusidinsäure	105.50	170.00	233.00	155.67	99.51
36	d7	Gentamicin	92450.00	94500.00	98875.00	99966.67	19124.82

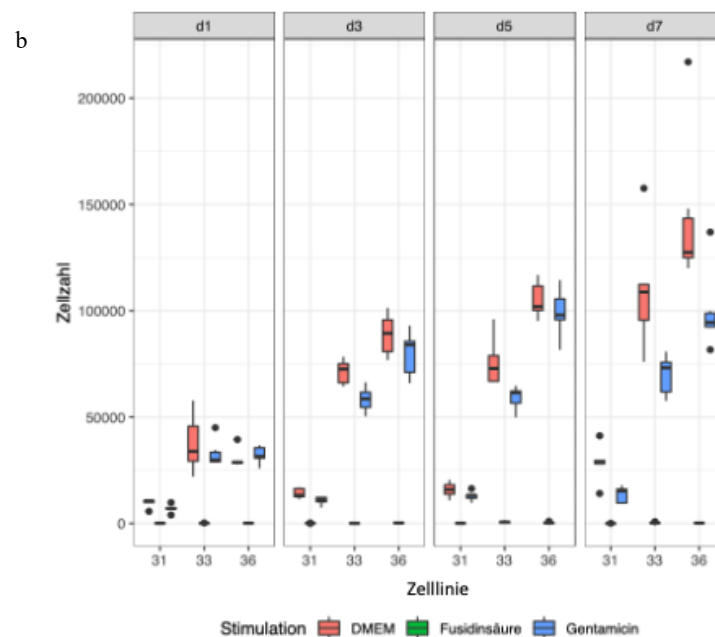


Abbildung 24: Datengrundlage Zellzahlbestimmungen (klinische Dosierung)

a) Datentabelle für die Ergebnisse der Wachstumskinetik während der klinischen Dosierung

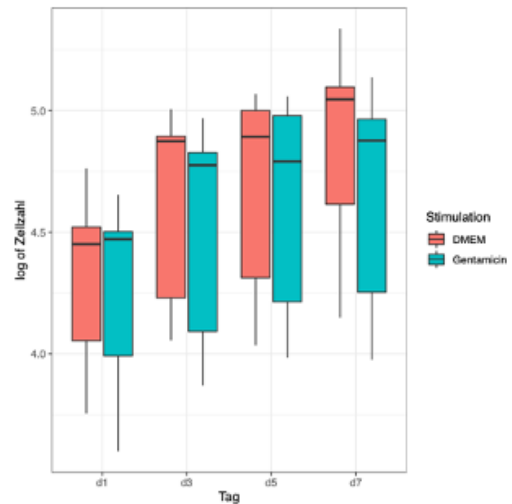
b) Ergebnisse als Boxplot aufgetragen

(Daten entnommen aus der statistischen Auswertung der biometrischen Beratung)

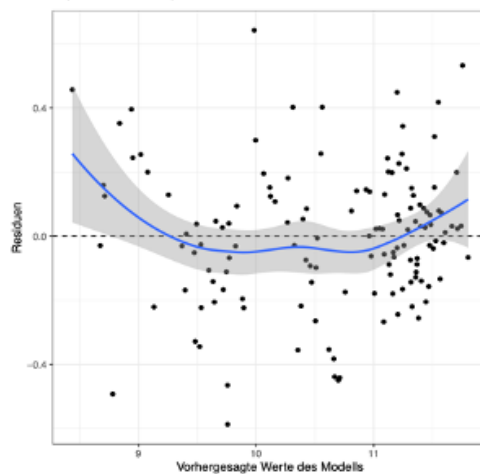
a Zusammenfassung der logarithmierten Zellzahlbestimmungen für Hypothese 1a (Gentamicin)

Linie	Tag	Stimulation	1stQu	median	3rdQu	mean	sd
31	d1	DMEM	3.99	4.03	4.03	3.97	0.12
31	d1	Gentamicin	3.84	3.85	3.86	3.83	0.14
33	d1	DMEM	4.47	4.53	4.66	4.55	0.16
33	d1	Gentamicin	4.46	4.47	4.52	4.51	0.08
36	d1	DMEM	4.45	4.46	4.46	4.48	0.06
36	d1	Gentamicin	4.49	4.50	4.55	4.50	0.06
31	d3	DMEM	4.10	4.12	4.21	4.14	0.08
31	d3	Gentamicin	4.01	4.04	4.09	4.02	0.09
33	d3	DMEM	4.82	4.86	4.88	4.85	0.04
33	d3	Gentamicin	4.74	4.77	4.79	4.76	0.04
36	d3	DMEM	4.91	4.95	4.98	4.95	0.05
36	d3	Gentamicin	4.85	4.92	4.93	4.90	0.06
31	d5	DMEM	4.14	4.20	4.26	4.19	0.11
31	d5	Gentamicin	4.07	4.12	4.13	4.10	0.08
33	d5	DMEM	4.83	4.86	4.90	4.88	0.06
33	d5	Gentamicin	4.75	4.79	4.79	4.77	0.04
36	d5	DMEM	5.00	5.01	5.05	5.02	0.04
36	d5	Gentamicin	4.98	4.99	5.02	4.99	0.05
31	d7	DMEM	4.45	4.46	4.47	4.43	0.17
31	d7	Gentamicin	3.98	4.18	4.21	4.12	0.13
33	d7	DMEM	4.98	5.04	5.05	5.03	0.11
33	d7	Gentamicin	4.79	4.86	4.88	4.84	0.06
36	d7	DMEM	5.10	5.11	5.16	5.15	0.10
36	d7	Gentamicin	4.97	4.98	5.00	4.99	0.08

b Boxplots der logarithmierten Zellzahlen an den unterschiedlichen Tagen für die Gentamicin- und Kontrollgruppe.



c Residuen versus vorhergesagte Werte des Modells zur Auswertung von Hypothese 1a (Gentamicin)



d Q-Q Plot des Modells zur Auswertung von Hypothese 1a (Gentamicin)

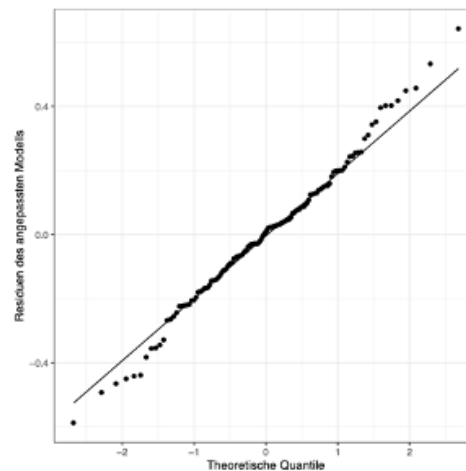


Abbildung 25: Statistische Grundlagen Gentamicin Hypothese 1a (Proliferation)

a) Zusammenfassung der logarithmierten Zellzahlen für Hypothese 1a (Gentamicin)

b) Boxplots der logarithmierten Zellzahlen an den unterschiedlichen Tagen für die Gentamicin- und Kontrollgruppe

c) Residuen versus vorhergesagte Werte des Modells zur Auswertung von Hypothese 1a (Gentamicin)

d) Q-Q-Plot des Modells zur Auswertung von Hypothese 1a (Gentamicin)

(Daten entnommen aus der statistischen Auswertung der biometrischen Beratung)

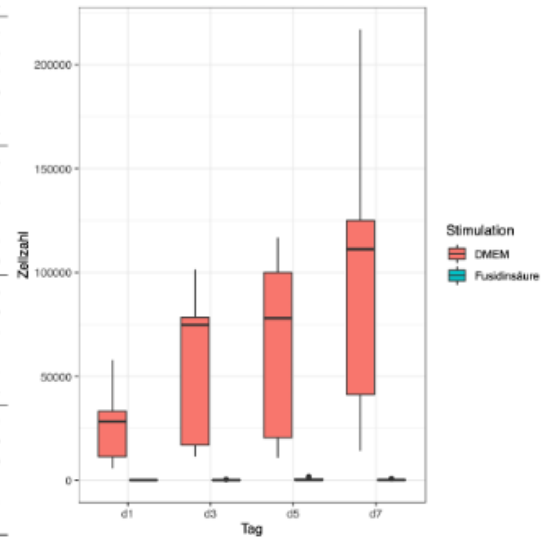
a

Zusammenfassung der Zellzahlen für Hypothese 1a (Fusidinsäure)

Linie	Tag	Stimulation	1stQu	median	3rdQu	mean	sd
31	d1	DMEM	9840.00	10640.00	10680.00	9632.00	2270.75
31	d1	Fusidinsäure	0.00	84.00	254.00	118.80	128.98
33	d1	DMEM	29300.00	33900.00	45700.00	37500.00	13498.89
33	d1	Fusidinsäure	84.50	86.00	152.00	115.00	89.86
36	d1	DMEM	28360.00	28760.00	29010.00	30326.67	4491.73
36	d1	Fusidinsäure	84.50	128.00	171.50	118.67	61.34
31	d3	DMEM	12560.00	13240.00	16360.00	14096.00	2444.68
31	d3	Fusidinsäure	84.00	86.00	86.00	102.40	93.48
33	d3	DMEM	66200.00	72600.00	75100.00	71333.33	5805.74
33	d3	Fusidinsäure	0.00	43.00	149.00	71.00	83.61
36	d3	DMEM	80850.00	89400.00	95700.00	88800.00	10011.19
36	d3	Fusidinsäure	105.50	214.00	321.00	214.00	161.00
31	d5	DMEM	13760.00	15840.00	18160.00	15824.00	3761.98
31	d5	Fusidinsäure	86.00	86.00	172.00	120.80	98.76
33	d5	DMEM	66900.00	72900.00	78900.00	75700.00	11468.74
33	d5	Fusidinsäure	214.00	637.00	868.00	679.33	603.11
36	d5	DMEM	100200.00	102000.00	111600.00	105066.67	8596.43
36	d5	Fusidinsäure	106.25	256.50	407.50	342.83	372.34
31	d7	DMEM	28160.00	28520.00	29560.00	28304.00	9621.25
31	d7	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.00	17.20	38.46
33	d7	DMEM	95600.00	108800.00	112400.00	109333.33	27442.06
33	d7	Fusidinsäure	191.00	255.00	317.50	325.00	270.41
36	d7	DMEM	125000.00	127500.00	143500.00	144166.67	36983.33
36	d7	Fusidinsäure	105.50	170.00	233.00	155.67	99.51

b

Boxplots der Zellzahlen an den unterschiedlichen Tagen für die Fusidinsäure- und Kontrollgruppe.



Q-Q Plot des Modells zur Auswertung von Hypothese 1a (Fusidinsäure)

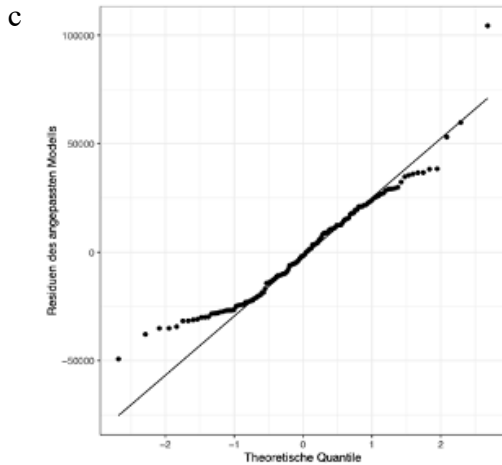


Abbildung 26: Statistische Grundlagen Fusidinsäure Hypothese 1a (Proliferation)
 a) Zusammenfassung der logarithmierten Zellzahlen für Hypothese 1a (Fusidinsäure)
 b) Boxplots der logarithmierten Zellzahlen an den unterschiedlichen Tagen für die Fusidinsäure- und Kontrollgruppe
 c) Residuen versus vorhergesagte Werte des Modells zur Auswertung von Hypothese 1a (Fusidinsäure)
 d) Q-Q-Plot des Modells zur Auswertung von Hypothese 1a (Fusidinsäure)
 (Daten entnommen aus der statistischen Auswertung der biometrischen Beratung)

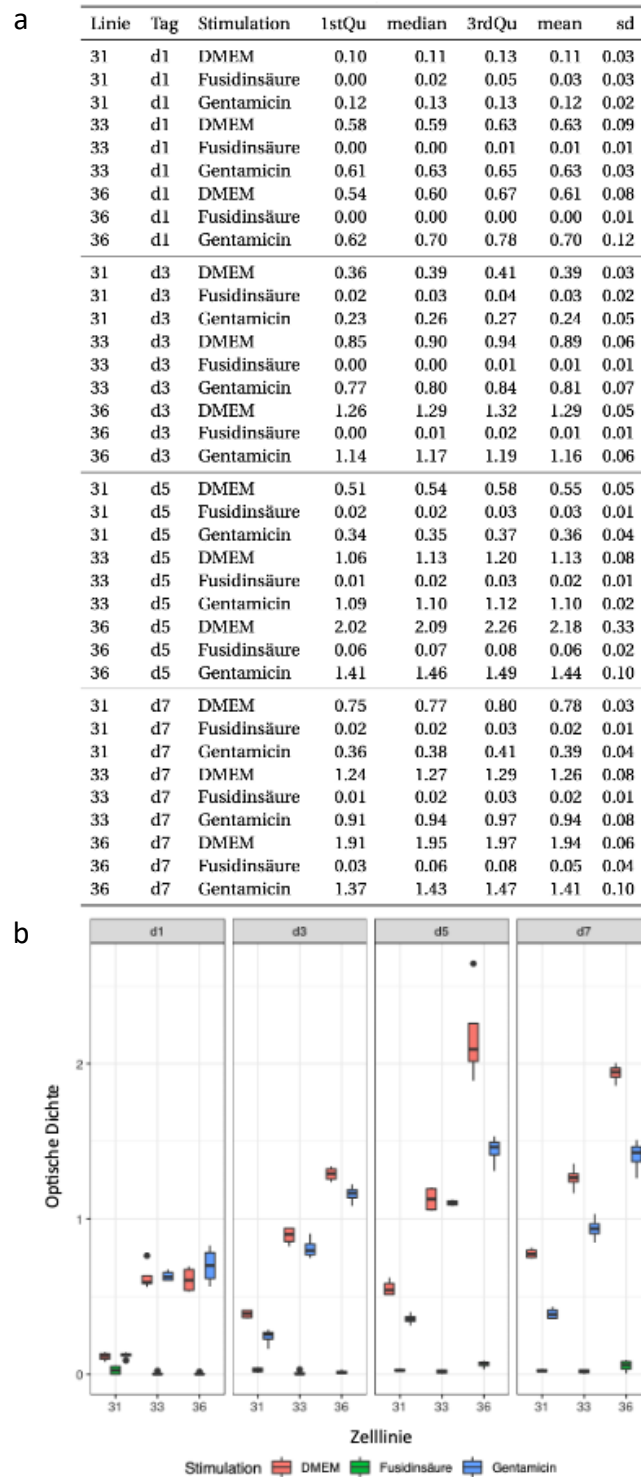


Abbildung 27: Datengrundlage MTT (klinische Dosierung)

a) Zusammenfassung der erhobenen Daten während des MTT-Assays

b) Boxplot der optischen Dichte während des MTT-Assays

(Daten entnommen aus der statistischen Auswertung der biometrischen Beratung)

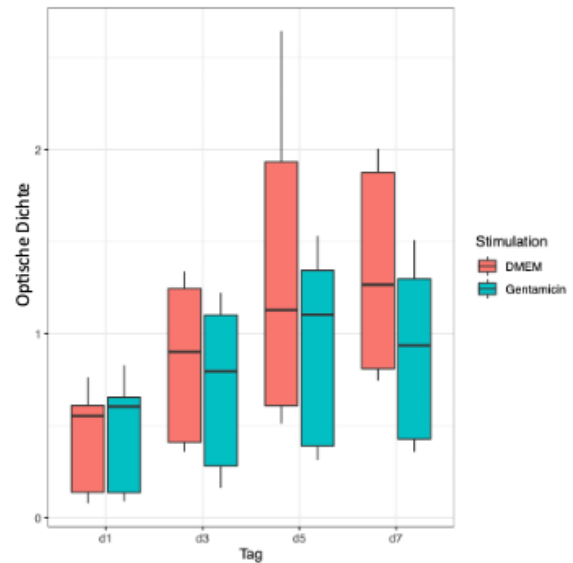
a

Zusammenfassung der logarithmierten Werte der optischen Dichte für Hypothese 1b (Gentamicin)

Linie	Tag	Stimulation	1stQu	median	3rdQu	mean	sd
31	d1	DMEM	0.10	0.11	0.13	0.11	0.03
31	d1	Gentamicin	0.12	0.13	0.13	0.12	0.02
33	d1	DMEM	0.58	0.59	0.63	0.63	0.09
33	d1	Gentamicin	0.61	0.63	0.65	0.63	0.03
36	d1	DMEM	0.54	0.60	0.67	0.61	0.08
36	d1	Gentamicin	0.62	0.70	0.78	0.70	0.12
31	d3	DMEM	0.36	0.39	0.41	0.39	0.03
31	d3	Gentamicin	0.23	0.26	0.27	0.24	0.05
33	d3	DMEM	0.85	0.90	0.94	0.89	0.06
33	d3	Gentamicin	0.77	0.80	0.84	0.81	0.07
36	d3	DMEM	1.26	1.29	1.32	1.29	0.05
36	d3	Gentamicin	1.14	1.17	1.19	1.16	0.06
31	d5	DMEM	0.51	0.54	0.58	0.55	0.05
31	d5	Gentamicin	0.34	0.35	0.37	0.36	0.04
33	d5	DMEM	1.06	1.13	1.20	1.13	0.08
33	d5	Gentamicin	1.09	1.10	1.12	1.10	0.02
36	d5	DMEM	2.02	2.09	2.26	2.18	0.33
36	d5	Gentamicin	1.41	1.46	1.49	1.44	0.10
31	d7	DMEM	0.75	0.77	0.80	0.78	0.03
31	d7	Gentamicin	0.36	0.38	0.41	0.39	0.04
33	d7	DMEM	1.24	1.27	1.29	1.26	0.08
33	d7	Gentamicin	0.91	0.94	0.97	0.94	0.08
36	d7	DMEM	1.91	1.95	1.97	1.94	0.06
36	d7	Gentamicin	1.37	1.43	1.47	1.41	0.10

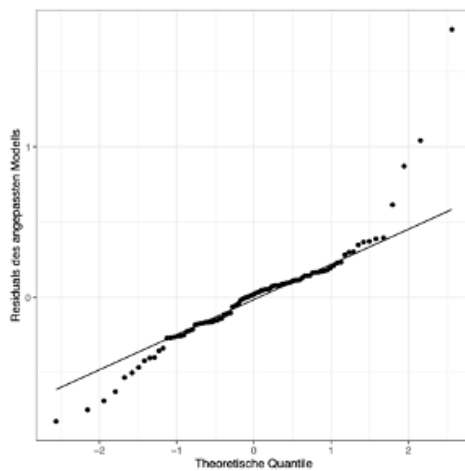
b

Boxplots der logarithmierten Werte der optischen Dichte an den unterschiedlichen Tagen für die Gentamicin- und Kontrollgruppe.



c

Residuen versus vorhergesagte Werte des Modells zur Auswertung von Hypothese 1b (Gentamicin)



d

Q-Q Plot des Modells zur Auswertung von Hypothese 1b (Gentamicin)

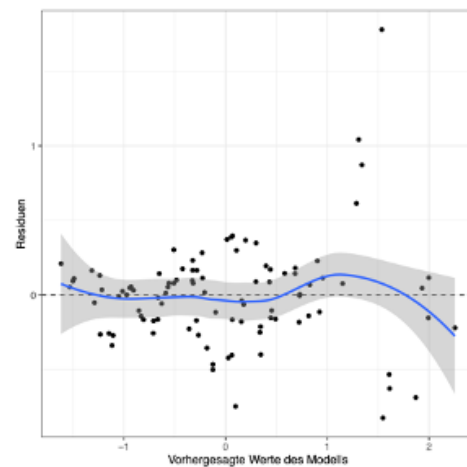


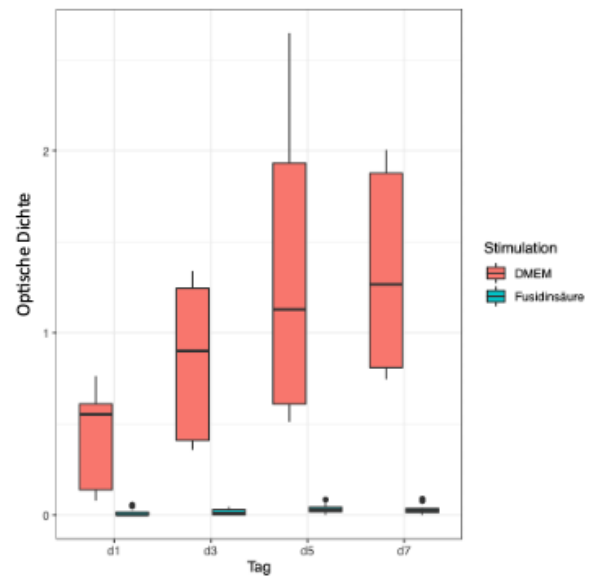
Abbildung 28: Statistische Grundlagen Gentamicin Hypothese 1b (MTT)

- Zusammenfassung der logarithmierten Werte der optischen Dichte für Hypothese 1b (Gentamicin)
 - Boxplots der logarithmierten Werte der optischen Dichte an den unterschiedlichen Tagen für die Gentamicin- und Kontrollgruppe
 - Residuen versus vorhergesagte Werte des Modells zur Auswertung von Hypothese 1b (Gentamicin)
 - Q-Q-Plot des Modells zur Auswertung von Hypothese 1b (Gentamicin)
- (Daten entnommen aus der statistischen Auswertung der biometrischen Beratung)

a Zusammenfassung der Werte der optischen Dichte für Hypothese 1b (Fusidinsäure)

Linie	Tag	Stimulation	1stQu	median	3rdQu	mean	sd
31	d1	DMEM	0.10	0.11	0.13	0.11	0.03
31	d1	Fusidinsäure	0.00	0.02	0.05	0.03	0.03
33	d1	DMEM	0.58	0.59	0.63	0.63	0.09
33	d1	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01
36	d1	DMEM	0.54	0.60	0.67	0.61	0.08
36	d1	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
31	d3	DMEM	0.36	0.39	0.41	0.39	0.03
31	d3	Fusidinsäure	0.02	0.03	0.04	0.03	0.02
33	d3	DMEM	0.85	0.90	0.94	0.89	0.06
33	d3	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01
36	d3	DMEM	1.26	1.29	1.32	1.29	0.05
36	d3	Fusidinsäure	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01
31	d5	DMEM	0.51	0.54	0.58	0.55	0.05
31	d5	Fusidinsäure	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01
33	d5	DMEM	1.06	1.13	1.20	1.13	0.08
33	d5	Fusidinsäure	0.01	0.02	0.03	0.02	0.01
36	d5	DMEM	2.02	2.09	2.26	2.18	0.33
36	d5	Fusidinsäure	0.06	0.07	0.08	0.06	0.02
31	d7	DMEM	0.75	0.77	0.80	0.78	0.03
31	d7	Fusidinsäure	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01
33	d7	DMEM	1.24	1.27	1.29	1.26	0.08
33	d7	Fusidinsäure	0.01	0.02	0.03	0.02	0.01
36	d7	DMEM	1.91	1.95	1.97	1.94	0.06
36	d7	Fusidinsäure	0.03	0.06	0.08	0.05	0.04

b Boxplots der Werte der optischen Dichte an den unterschiedlichen Tagen für die Fusidinsäure- und Kontrollgruppe.



c Residuen versus vorhergesagte Werte des Modells zur Auswertung von Hypothese 1b (Fusidinsäure)

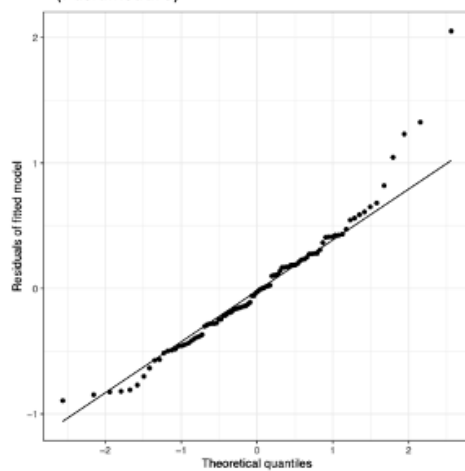


Abbildung 29: Statistische Grundlagen Fusidinsäure Hypothese 1b (MTT)

a) Zusammenfassung der Werte der optischen Dichte für Hypothese 1b (Fusidinsäure)

b) Boxplots der Werte der optischen Dichte an den unterschiedlichen Tagen für die Fusidinsäure- und Kontrollgruppe

c) Residuen versus vorhergesagte Werte des Modells zur Auswertung von Hypothese 1b (Fusidinsäure)

(Daten entnommen aus der statistischen Auswertung der biometrischen Beratung)

a

Linie	Tag	Stimulation	1stQu	median	3rdQu	mean	sd
31	d1	DMEM	0.24	0.24	0.26	0.25	0.07
31	d1	Fusidinsäure	0.01	0.03	0.05	0.03	0.03
31	d1	Gentamicin	0.17	0.22	0.26	0.22	0.07
33	d1	DMEM	0.57	0.73	0.82	0.71	0.20
33	d1	Fusidinsäure	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01
33	d1	Gentamicin	0.46	0.63	0.71	0.59	0.18
36	d1	DMEM	0.78	0.99	1.09	0.94	0.19
36	d1	Fusidinsäure	0.01	0.02	0.04	0.02	0.02
36	d1	Gentamicin	0.88	0.99	1.12	0.99	0.24
31	d3	DMEM	0.46	0.51	0.54	0.52	0.19
31	d3	Fusidinsäure	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01
31	d3	Gentamicin	0.16	0.21	0.33	0.24	0.11
33	d3	DMEM	1.67	1.98	2.32	1.96	0.44
33	d3	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
33	d3	Gentamicin	0.66	1.10	1.28	1.02	0.42
36	d3	DMEM	2.53	2.87	3.19	2.84	0.50
36	d3	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
36	d3	Gentamicin	2.39	2.53	2.84	2.56	0.54
31	d5	DMEM	0.81	0.91	0.98	0.88	0.20
31	d5	Fusidinsäure	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
31	d5	Gentamicin	0.21	0.27	0.42	0.31	0.15
33	d5	DMEM	2.47	2.95	3.12	2.81	0.42
33	d5	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
33	d5	Gentamicin	0.57	0.85	1.18	0.93	0.57
36	d5	DMEM	4.19	4.47	4.71	4.50	0.61
36	d5	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
36	d5	Gentamicin	2.96	3.11	3.65	3.26	0.46
31	d7	DMEM	1.19	1.33	1.54	1.36	0.39
31	d7	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
31	d7	Gentamicin	0.16	0.20	0.34	0.24	0.12
33	d7	DMEM	3.00	3.15	3.33	3.10	0.29
33	d7	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
33	d7	Gentamicin	0.45	0.66	0.97	0.73	0.48
36	d7	DMEM	4.74	4.92	5.05	4.91	0.39
36	d7	Fusidinsäure	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
36	d7	Gentamicin	2.59	2.81	2.88	2.77	0.23

b

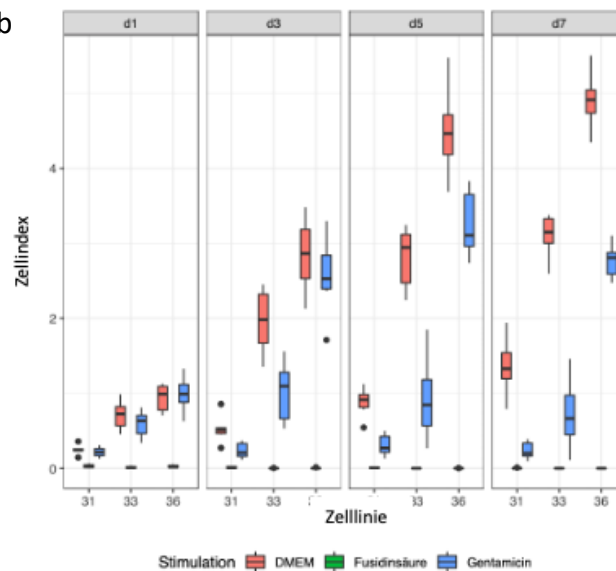


Abbildung 30: Datengrundlage Impedanzmessungen (klinische Dosierung)

a) Zusammenfassung der Daten der Impedanzmessungen während der klinischen Dosierungsversuche

b) Boxplot der Zellindizes der Impedanzmessungen während der klinischen Dosierungsversuche

(Daten entnommen aus der statistischen Auswertung der biometrischen Beratung)

a Hypothese 2a

Ergebnisse der repeated measurement Korrelation für jede Stimulation

Stimulation	r	p	KI_lower	KI_upper
DMEM	0.84	2.3298E-03	0.33	0.97
Fusidinsäure	-0.13	5.9564E-01	-0.59	0.39
Gentamicin	0.68	5.6767E-04	0.33	0.86

Aus dem gesamten Datensatz wurden nur die Replikate an den Tagen betrachtet, für die sowohl Zellzahlen als auch Impedanzmessungen vorlagen. Für jede Stimulation wurden die Repeated-Measurement-Korrelation berechnet. Die Ergebnisse sind in der obigen Abbildung zu sehen.

b Hypothese 2b

Ergebnisse der repeated measurement Korrelation für jede Stimulation

Stimulation	r	p	KI_lower	KI_upper
DMEM	0.98	1.2959E-06	0.87	1.00
Fusidinsäure	-0.37	2.9872E-01	-0.85	0.46
Gentamicin	0.69	2.5933E-02	-0.02	0.94

Aus dem gesamten Datensatz wurden nur die Replikate an den Tagen betrachtet, für die sowohl Zellzahlen als auch Werte der optischen Dichte des MTT-Assays vorlagen. Für jede Stimulation wurden die Repeated-Measurement-Korrelationen berechnet. Die Ergebnisse sind in der obigen Abbildung zu sehen.

Abbildung 31: *Repeated-Measurement*-Korrelationen für Hypothese 2a & 2b (Daten entnommen aus der statistischen Auswertung der biometrischen Beratung)

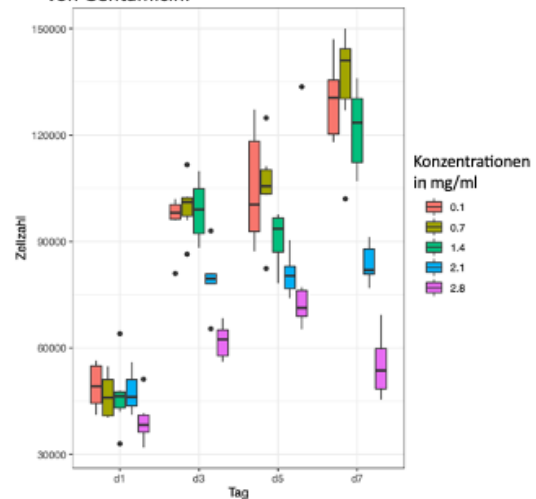
a

Zusammenfassung der Zellzahlen unterschiedlicher Konzentrationen von Gentamicin (Hypothese 3)

Tag	Konzentration	1stQu	median	3rdQu	mean	sd
d1	0.10	44400.00	49200.00	54900.00	49266.67	6476.62
d1	0.70	40900.00	46000.00	51100.00	46533.33	6438.22
d1	1.40	43100.00	46400.00	47600.00	46633.33	10108.54
d1	2.10	43700.00	46200.00	51100.00	47533.33	5653.55
d1	2.80	36290.00	38320.00	41100.00	39573.33	6574.99
d3	0.10	96300.00	98100.00	100350.00	96000.00	7674.37
d3	0.70	97200.00	101100.00	102300.00	99800.00	8302.29
d3	1.40	92250.00	99000.00	104850.00	98800.00	8708.62
d3	2.10	78150.00	79500.00	80850.00	79400.00	8799.09
d3	2.80	57810.00	62400.00	65100.00	61930.00	4905.41
d5	0.10	92800.00	100400.00	118200.00	104933.33	16890.55
d5	0.70	103400.00	105600.00	110200.00	105466.67	13776.89
d5	1.40	87000.00	93600.00	96600.00	90906.67	7670.27
d5	2.10	76740.00	80320.00	83000.00	80746.67	5900.00
d5	2.80	68920.00	71280.00	76160.00	81226.67	25976.76
d7	0.10	120250.00	130500.00	135500.00	130000.00	11296.02
d7	0.70	130250.00	141000.00	144250.00	134333.33	17603.03
d7	1.40	112250.00	123500.00	130250.00	121833.33	11822.30
d7	2.10	80800.00	81950.00	87900.00	83733.33	5615.93
d7	2.80	48475.00	53650.00	59800.00	55100.00	9007.55

b

Boxplots der Zellzahlen an den unterschiedlichen Tagen für unterschiedlich starke Konzentrationen von Gentamicin.



c

Zusammenfassung der Zellzahlen unterschiedlicher Konzentrationen von Fusidinsäure (Hypothese 3)

Tag	Konzentration	1stQu	median	3rdQu	mean	sd
d1	0,05	38190.00	42200.00	43900.00	40366.67	4896.65
d1	0,1	28880.00	31380.00	34930.00	32013.33	6495.32
d1	0,25	21900.00	23600.00	26350.00	24466.67	3261.08
d1	0,5	2765.00	3140.00	4430.00	3510.00	1336.91
d1	1	107.00	172.00	237.00	214.67	208.16
d3	0,05	79800.00	87000.00	91500.00	85800.00	11652.98
d3	0,1	51285.00	53700.00	56385.00	53280.00	6458.74
d3	0,25	16440.00	17720.00	19120.00	17086.67	2797.76
d3	0,5	8.50	60.00	147.50	163.67	267.47
d3	1	0.00	0.00	126.00	57.00	88.32
d5	0,05	104200.00	112400.00	120600.00	112400.00	12276.81
d5	0,1	54200.00	58760.00	66860.00	59773.33	8588.80
d5	0,25	4280.00	4640.00	5420.00	4650.00	1663.53
d5	0,5	0.00	0.00	0.00	14.33	35.11
d5	1	21.50	86.00	86.00	142.33	226.21
d7	0,05	136250.00	142500.00	145000.00	141666.67	10500.79
d7	0,1	78350.00	80550.00	83725.00	79016.67	8926.46
d7	0,25	1726.00	2193.00	2915.00	2291.67	664.29
d7	0,5	0.00	0.00	63.00	43.00	72.44
d7	1	84.50	86.00	86.00	85.33	53.76

d

Boxplots der Zellzahlen an den unterschiedlichen Tagen für unterschiedlich starke Konzentrationen von Fusidinsäure.

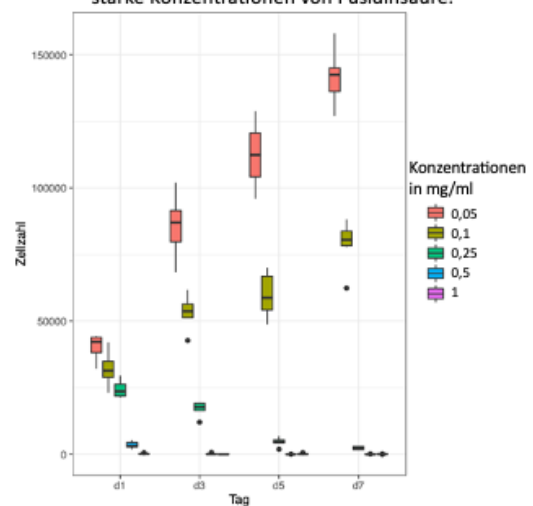


Abbildung 32: Statistische Grundlagen der Zellzahlbestimmung Gentamicin & Fusidinsäure Hypothese 3 (Dosisanpassungen)

a) Datentabelle für die Ergebnisse der Wachstumskinetik während der Dosisanpassung (Gentamicin)

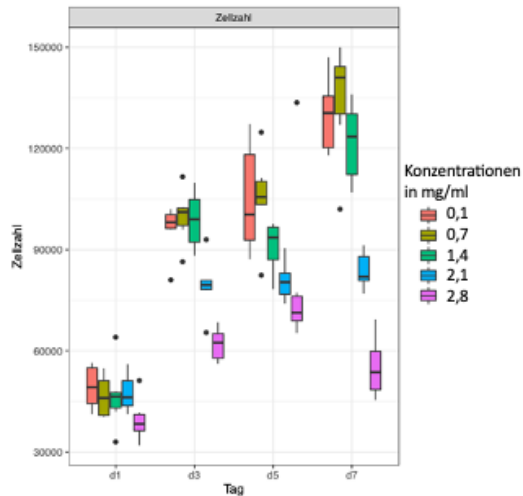
b) Boxplot der Zellzahlbestimmungen während der Dosisanpassung (Gentamicin)

c) Datentabelle für die Ergebnisse der Wachstumskinetik während der Dosisanpassung (Fusidinsäure)

d) Boxplot der Zellzahlbestimmungen während der Dosisanpassung (Fusidinsäure)

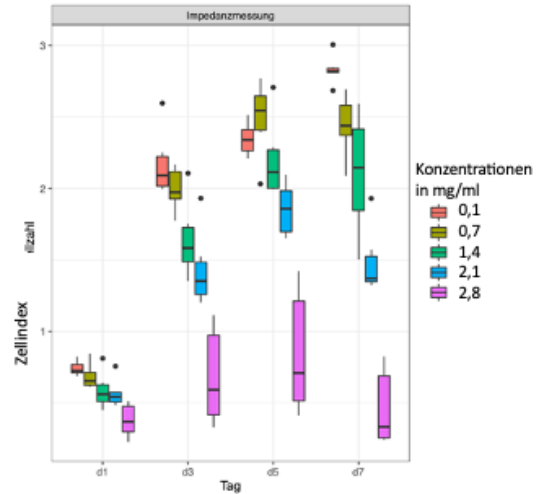
(Daten entnommen aus der statistischen Auswertung der biometrischen Beratung)

a Boxplots der Zellzahlen der Gentamicingruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen



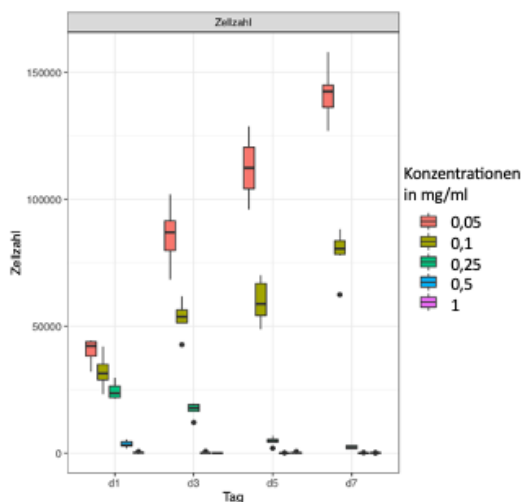
Berechnung eines linear gemischten Modells. Die Konzentration ($p=0,597$) allein hatte keinen signifikanten Einfluss. Der Tag der Messung ($p<0,01$) und die Interaktion zwischen der Konzentration und dem Tag der Messung ($p=5,48 \cdot 10^{-8}$) haben einen signifikanten Einfluss.

b Boxplots der Impedanzwerte der Gentamicingruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen



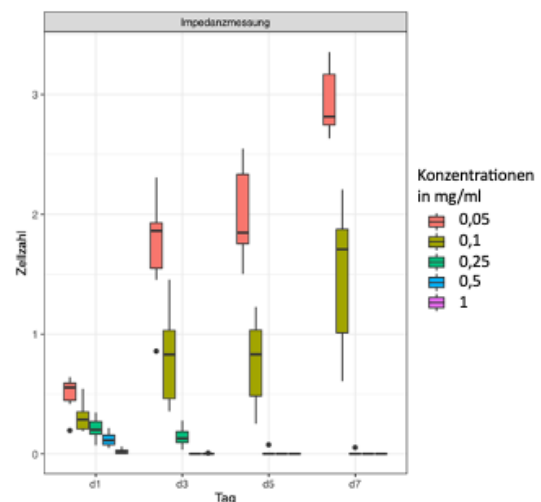
Berechnung eines linear gemischten Modells. Die Konzentration ($p=0,345$) allein hatte keinen signifikanten Einfluss. Der Tag der Messung ($p<0,01$) und die Interaktion zwischen der Konzentration und dem Tag der Messung ($p=2,89 \cdot 10^{-9}$) haben einen signifikanten Einfluss.

c Boxplots der Zellzahlen der Fusidinsäuregruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen



Berechnung eines linear gemischten Modells. Die Konzentration ($p=0,033$), der Tag der Messung ($p=7,01 \cdot 10^{-6}$) und die Interaktion zwischen der Konzentration und dem Tag der Messung ($p=0,001$) haben einen signifikanten Einfluss.

d Boxplots der Impedanzwerte der Fusidinsäuregruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen



Berechnung eines linear gemischten Modells. Die Konzentration ($p=0,502$) allein hatte keinen signifikanten Einfluss. Der Tag der Messung ($p=1,73 \cdot 10^{-14}$) und die Interaktion zwischen der Konzentration und dem Tag der Messung ($p=4,22 \cdot 10^{-9}$) haben einen signifikanten Einfluss.

Abbildung 33: Boxplots Gentamicin & Fusidinsäure Hypothese 4 (Dosisanpassungen)

- Boxplots der Zellzahlbestimmungen für unterschiedliche Dosierungen von Gentamicin
- Boxplots der Impedanzmessungen für unterschiedliche Dosierungen von Gentamicin
- Boxplots der Zellzahlbestimmungen für unterschiedliche Dosierungen von Fusidinsäure
- Boxplots der Zellzahlbestimmungen für unterschiedliche Dosierungen von Fusidinsäure (Daten entnommen aus der statistischen Auswertung der biometrischen Beratung)

Tabelle 4: Zellzahlbestimmungen im Rahmen des Zellproliferationsassay via Durchflusszytometrie

Tag	hSGSC 31		hSGSC 33		hSGSC 36	
	DMEM	Gentamicin	DMEM	Gentamicin	DMEM	Gentamicin
0	41.200		46.080		59.680	
3	24.480	20.160	93.600	76.200	113.760	142.800
6			159.000	111.936	200.340	192.390
9	51.000	20.460	256.500	119.700	229.500	150.975

Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen während des Proliferationsassays über neun Tage. Während der Versuche kam es zu einer Proliferation sowohl der Kontroll- als auch der Gentamicin-Gruppe. Das Zellwachstum der Kontrollgruppen lag über dem der Gentamicin-Gruppen. Zum Ende des Experimentes wurden die Unterschiede nochmals deutlicher.

Tabelle 5: Daten LDH-Bestimmung *Punch-in-a-Punch*-Versuche

P125 Experimenttag	DMEM (hSGSC 14)		Gentamicin (hSGSC 14)		Fusidinsäure (hSGSC 14)	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
d1 (d -1)	1,298	0,307	1,839	0,276	2,193	0,176
d2 (d0)	0,39	0,193	0,55	0,050	0,372	0,101
d4 (d2)	0,378	0,126	0,499	0,094	0,332	0,066
d6 (d4)	0,428	0,106	0,637	0,118	0,457	0,048
d8 (d6)	0,581	0,074	0,786	0,036	0,664	0,069

P127 Experiment-tag	DMEM (hSGSC 14)		DMEM (hSGSC 36)		Gentamicin (hSGSC 36)		Fusidinsäure (hSGSC 36)	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
d1 (d -1)	2,742	0,212	2,8	0,375	1,872	0,280	2,419	0,275
d2 (d0)	0,366	0,08	0,323	0,015	0,189	0,018	0,281	0,033
d4 (d2)	0,481	0,089	0,408	0,081	0,327	0,0314	0,434	0,031
d6 (d4)	0,959	0,122	0,653	0,118	0,509	0,062	0,749	0,044
d8 (d6)	1,692	0,17	1,225	0,124	0,832	0,048	0,994	0,128

P134 Experimenttag	DMEM (hSGSC 14)		DMEM (hSGSC 33)		Gentamicin (hSGSC 33)		Fusidinsäure (hSGSC 33)		Fusidinsäure (hSGSC 14)	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
d1 (d -1)	1,696	0,196	1,688	0,116	2,006	0,1178	1,3	0,0288	1,549	0,18
d2 (d0)	0,175	0,013	0,176	0,021	0,140	0,016	0,127	0,047	0,154	0,027
d4 (d2)	0,355	0,05	0,224	0,035	0,165	0,026	0,23	0,0811	0,205	0,017
d6 (d4)	0,549	0,058	0,459	0,034	0,371	0,094	0,34	0,120	0,311	0,085
d8 (d6)	0,607	0,126	0,467	0,021	0,477	0,151	0,381	0,111	0,323	0,076

Tabelle 6: Daten der *Punch-in-a-Punch*-Wundheilungsversuche

Spendender	Zellen	Substanz	Wunddurchmesser [mm]	Zungenlänge [mm]	Zungenfläche [mm ²]	Residuale Wundfläche [mm ²]
P134	hSGSC 33	Fusidinsäure	1,806	1,345	0,069	0,499
P134	hSGSC 33	Fusidinsäure	1,789	0,982	0,03	0,529
P134	hSGSC 33	Fusidinsäure	1,963	2,067	0,149	0,373
Mittelwert			1,853	1,465	0,083	0,467
P134	hSGSC 14	Fusidinsäure	1,797	1,892	0,082	0,3
P134	hSGSC 14	Fusidinsäure	1,682	1,746	0,152	0,166
P134	hSGSC 14	Fusidinsäure	1,823	1,907	0,091	0,304
Mittelwert			1,767	1,848	0,108	0,257
P127	hSGSC 36	Fusidinsäure	1,807	1,921	0,109	0,33
P127	hSGSC 36	Fusidinsäure	1,806	2,017	0,097	0,481
P127	hSGSC 36	Fusidinsäure	1,927	2,025	0,129	0,352
Mittelwert			1,847	1,988	0,112	0,388
P134	hSGSC 33	Gentamicin	1,839	2,032	0,079	0,385
P134	hSGSC 33	Gentamicin	1,695	1,814	0,11	0,285
P134	hSGSC 33	Gentamicin	1,921	1,989	0,143	0,133
Mittelwert			1,818	1,945	0,111	0,268
P127	hSGSC 36	Gentamicin	1,839	1,898	0,128	0,262
P127	hSGSC 36	Gentamicin	1,859	1,915	0,159	0,243
P127	hSGSC 36	Gentamicin	1,753	1,808	0,196	0,23
Mittelwert			1,817	1,874	0,161	0,245
P125	hSGSC 14	Gentamicin	2	2,269	0,085	0,622
P125	hSGSC 14	Gentamicin	2,042	2,206	0,093	0,466
P125	hSGSC 14	Gentamicin	1,733	2,026	0,084	0,496
Mittelwert			1,925	2,167	0,087	0,528
P134	hSGSC 33	DMEM	1,882	1,949	0,107	0,421
P134	hSGSC 33	DMEM	1,702	1,895	0,083	0,306
P134	hSGSC 33	DMEM	1,748	1,913	0,113	0,364
Mittelwert			1,777	1,919	0,101	0,364
P134	hSGSC 14	DMEM	1,764	1,703	0,24	0,424
P134	hSGSC 14	DMEM	1,889	2,021	0,128	0,314
P134	hSGSC 14	DMEM	1,757	1,918	0,111	0,256
Mittelwert			1,803	1,881	0,160	0,331
P127	hSGSC 14	DMEM	1,973	2,149	0,073	0,468
P127	hSGSC 14	DMEM	1,87	1,945	0,179	0,298
P127	hSGSC 14	DMEM	2,176	2,486	0,121	0,788
Mittelwert			2,006	2,193	0,124	0,518
P127	hSGSC 36	DMEM	1,96	2,038	0,104	0,316
P127	hSGSC 36	DMEM	1,825	2,019	0,117	0,496

Spendender	Zellen	Substanz	Wunddurchmesser [mm]	Zungenlänge [mm]	Zungenfläche [mm²]	Residuale Wundfläche [mm²]
P127	hSGSC 36	DMEM	1,888	2,039	0,127	0,401
Mittelwert			1,891	2,032	0,116	0,404
P125	hSGSC 14	DMEM	2,191	2,507	0,069	0,775
P125	hSGSC 14	DMEM	1,819	2,05	0,088	0,484
P125	hSGSC 14	DMEM	1,856	2,067	0,088	0,449
Mittelwert			1,955	2,208	0,082	0,569

Tabelle 7: Normalisierte Daten der *Punch-in-a-Punch*-Wundheilungsversuche

Spender	Zellen	Substanz	Wunddurchmesser [mm]	Zungenlänge [mm]	Zungenvolumen [mm ³]	residuale Wundfläche [mm ²]
P134	hSGSC 33	Fusidinsäure	100,148	71,517	43,215	150,604
P134	hSGSC 33	Fusidinsäure	99,2051756	52,216	18,789	159,658
P134	hSGSC 33	Fusidinsäure	108,8539741	109,908	93,319	112,575
Mittelwert				77,880	51,775	140,946
P134	hSGSC 14	Fusidinsäure	99,64879852	100,603	51,357	90,543
P134	hSGSC 14	Fusidinsäure	93,27171904	92,839	95,198	50,101
P134	hSGSC 14	Fusidinsäure	101,090573	101,400	56,994	91,751
Mittelwert				98,281	67,850	77,465
P127	hSGSC 36	Fusidinsäure	90,06479482	87,584	87,668	63,707
P127	hSGSC 36	Fusidinsäure	90,01495265	91,960	78,016	92,857
P127	hSGSC 36	Fusidinsäure	96,04585479	92,325	103,753	67,954
Mittelwert				90,623	89,8123	74,839
P134	hSGSC 33	Gentamicin	101,9778189	108,047	49,4781	116,197
P134	hSGSC 33	Gentamicin	93,99260628	96,455	68,894	86,016
P134	hSGSC 33	Gentamicin	106,5249538	105,760	89,562	40,141
Mittelwert				103,421	69,311	80,785
P127	hSGSC 36	Gentamicin	91,65974414	86,535	102,949	50,579
P127	hSGSC 36	Gentamicin	92,65658747	87,310	127,882	46,911
P127	hSGSC 36	Gentamicin	87,37331783	82,432	157,641	44,402
Mittelwert				85,426	129,491	47,297
P125	hSGSC 14	Gentamicin	102,2843505	102,763	104,082	109,251
P125	hSGSC 14	Gentamicin	104,4323219	99,909	113,878	81,850
P125	hSGSC 14	Gentamicin	88,6293897	91,757	102,857	87,119
Mittelwert				98,143	106,939	92,740
P134	hSGSC 33	DMEM	104,3622921	103,633	67,015	127,062
P134	hSGSC 33	DMEM	94,38077634	100,762	51,983	92,354
P134	hSGSC 33	DMEM	96,93160813	101,719	70,772	109,859
Mittelwert				102,038	63,257	109,759
P127	hSGSC 36	DMEM	97,69064629	92,9179	83,646	61,004
P127	hSGSC 36	DMEM	90,96195381	92,0517	94,102	95,753
P127	hSGSC 36	DMEM	94,1020103	92,9635	102,145	77,413
Mittelwert				92,644	93,2976	78,057
P125	hSGSC 14	DMEM	112,052506	113,542	84,490	136,124
P125	hSGSC 14	DMEM	93,02761677	92,844	107,755	85,012
P125	hSGSC 14	DMEM	94,91987726	93,614	107,755	78,864
Mittelwert				100	100	100

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Charli Kruse für das Ermöglichen dieser Arbeit in diesem interessanten Arbeitsfeld und die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Ein außerordentlicher Dank gilt Dr. Tabea Sturmheit, ohne deren geduldiges Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten, konstruktiven Austausch und Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Auch Dr. Anna Emilia Matthießen und Dr. Matthias Brandenburger sowie Prof. Dr. Johannes Boltze gebührt ein besonderer Dank. Auch sie haben mit ihrer Unterstützung, Geduld, fachlichen Kompetenz und Korrekturen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Jennifer Hundt, Dr. Rebecca Pfündl und Christopher Kren für die Zusammenarbeit im Punch-in-a-Punch-Projekt bedanken.

Ich bedanke mich bei den beteiligten Mitarbeitenden des Institutes für Medizinische Biometrie und Statistik für die biometrische Beratung.

Dr. Eva Dietrich und Dr. Dorothee Rose sowie allen übrigen Kollegen aus dem Fraunhofer Institut möchte ich danken, dass sie mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Die Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren eine Bereicherung und haben mich immer ermutigt.

Viele Menschen haben mich auf meinem Weg begleitet und mich persönlich und professionell beeinflusst, von kurzen Abschnitten bis zu langjährigen Weggefährten. Meinen Freunden, die mich unermüdlich unterstützt, umsorgt und auch mal für die notwendige Ablenkung gesorgt haben, möchte ich ebenfalls von Herzen danken. Außerdem danke ich euch für zahlreiche Telefonate, eure Bereitschaft zur konstruktiven Kritik und zum Korrekturlesen. Ein großer Dank gilt meiner Familie, ohne meine Eltern und meine Brüder wäre ich nicht dort, wo ich jetzt bin. Danke für eure unentwegte Unterstützung und lieben, ermutigenden Worte. Mein besonderer Dank gilt Patrick für den IT-Support aber vor allem für sein Verständnis, seine Geduld und seine beständige Motivation. Danke, dass du mir den Rücken freigehalten hast und in jeder Lebenslage an meiner Seite bist.