

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie –  
Campus Virchow Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

*In-vitro-* und *In-vivo*-Studien zum Einsatz innovativer Wundversorgungssysteme für  
Verbrennungspatienten basierend auf einer Sprühtransplantation primär isolierter Hautzellen  
und einer aktiven Wundaufgabe aus Hohlfaserkapillaren

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jörn Plettig

aus Berlin

Datum der Promotion: 26. Februar 2016

*Für meine Familie*

## INHALTSVERZEICHNIS

Zur Dissertation eingereichte Publikationen	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung der Publikationen	
Abstract (Deutsch)	6
Abstract (Englisch)	7
Einleitung und Zielstellung	8
Methodik	9
Ergebnisse	15
Diskussion	19
Literaturverzeichnis	25
Anteilerklärung an den Publikationen	30
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	
Publikation I)	33 ff.
Publikation II)	34 ff.
Publikation III)	35 ff.
Publikation IV)	36 ff.
Publikation V)	37 ff.
Lebenslauf	38
Vollständige Publikationsliste	42
Erklärung über die Selbständigkeit	43
Danksagung	44

## ZUR DISSERTATION EINGEREICHTE PUBLIKATIONEN

I. *Phenotypical characterization of 6-21-week gestational age human dermis and epidermal cell isolation methods for in vitro studies on epidermal progenitors.*

Johnen C, Chinnici C, Triolo F, **Plettig J**, Bräutigam K, Amico G, Young M, Over P, Esteban-Vives R, Schmelzer E, Conaldi PG, Turner M, Thompson R, Zeilinger K, Rubin P, Vizzini G, Gridelli B, Gerlach JC. Burns. 2013 Mar;39(2):300-10. doi: 10.1016/j.burns.2012.05.025. Epub 2012 Jun 30. **Impact factor 2013: 1.836**

II. *Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells.*

Gerlach JC, Johnen C, Ottomann C, Bräutigam K, **Plettig J**, Belfekroun C, Münch S, Hartmann B. Int J Artif Organs. 2011 Mar;34(3):271-9. Erratum in: Int J Artif Organs. 2014 Feb;37(2):184. Ottoman, Christian [corrected to Ottomann, Christian]. **Impact factor 2011: 1.861**

III. *Autologous skin cell spray-transplantation for a deep dermal burn patient in an ambulant treatment room setting.*

Gerlach JC, Johnen C, McCoy E, Bräutigam K, **Plettig J**, Corcos A. Burns. 2011 Jun;37(4):e19-23. doi: 10.1016/j.burns.2011.01.022. Epub 2011 Feb 19. **Impact factor 2011: 1.962**

IV. *Active wound dressing with artificial capillaries for temporary wound irrigation and skin cell supply.*

**Plettig J**, Johnen CM, Bräutigam K, Zeilinger K, Borneman R, Gerlach JC. Artif Organs. 2012 Apr;36(4):446-9. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01363.x. Epub 2011 Nov 11. **Impact factor 2012: 1.964**

V. *Feasibility study of an active wound dressing based on hollow fiber membranes in a porcine wound model.*

**Plettig J**, Johnen CM, Bräutigam K, Knöspel F, Wönne EC, Schubert F, Plöger F, Unger JK, Reutzel-Selke A, Bornemann R, Zeilinger K, Gerlach JC. Burns. 2015 Jun;41(4):778-88. doi: 10.1016/j.burns.2014.09.022. Epub 2014 Oct 18. **Impact factor 2014: 1.836**

Auf die o. g. römische Bezifferung der Publikationen wird sich im Text mehrfach rückbezogen.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb. – Abbildung(en)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

*E. coli* – *Escherichia coli*

EDTA – Ethylendiamintetraacetat bzw. Ethylendiamintetraessigsäure

Fa. – Firma

h – Stunde(n)

H&E – Hämatoxylin und Eosin

HDF – humane(r) dermale(r) Fibroblast(en)

HEK – humane(r) epidermale(r) Keratinozyt(en)

Min. – Minute(n)

NK – Negativkontrolle

NUT – Nutriflex<sup>®</sup> peri Infusionslösung

NUT+G – Nutriflex<sup>®</sup> peri Infusionslösung plus rhGDF-5 (150 ng/ml) gelöst in 1 %-iger

Trehaloselösung mit 5 mM Natriumacetat Zusatz; pH 5,5

PBS – *phosphate buffered saline* (Phosphatgepufferte Salzlösung)

Pen/Strep – Penicillin-Streptomycin Mixtur

PES – Polyethersulfon

PK – Positivkontrolle

rhGDF-5 – rekombinanter humaner Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5

s. – siehe

S. – Seite(n)

s. o. – siehe oben

SSW – Schwangerschaftswoche(n)

s. u. – siehe unten

Tab. – Tabelle(n)

TRE – 1 %-ige Trehaloselösung in *aqua ad injectionem* plus 5 mM Natriumacetat; pH 5,5

TRE+G – rhGDF-5 (150 ng/ml) in 1 %-iger Trehaloselösung in *aqua ad injectionem* plus 5 mM

Natriumacetat; pH 5,5

VSS – *Vancouver Scar Scale*

## ABSTRACT – DEUTSCH

Die Therapie akuter Verbrennungen, insbesondere für Patienten mit Wunden des Grades II<sup>o</sup>b, ist bisher unbefriedigend gelöst. Die Dissertation evaluiert ein innovatives Therapiekonzept, basierend auf einer primären Hautzellisolation aus fötalem oder adultem Gewebe, einer autologen Sprühtransplantation sowie einer temporären Versorgung applizierter Zellen über aktive Wundauflagen aus perfundierten Hohlfaserkapillaren. Ziel ist es, über eine schonende Isolation den Ertrag basaler Keratinozyten-Vorläuferzellen zu erhöhen und diese gleichmäßig mit einem intraoperativen Sprühverfahren im defekten Wundgrund zu verteilen. Zur Überbrückung der initial suboptimalen Mikrozirkulation im Wundbett werden die Hohlfaserkapillaren mit therapeutischen Lösungen perfundiert. Optional können den Lösungen Wachstumsfaktoren, wie z. B. rhGDF-5, beigemischt werden. Die Hautzellisolation erfolgt über einen Dispase-Trypsin-Ansatz mit anschließender Abzentrifugation überschüssiger Enzyme und Zellwaschung. Die Sprühtransplantation wird über eine prozessorgesteuerte Pumpe und einen speziell entwickelten Sprühkopf realisiert. Die Wundaufgabe besteht aus einem Silikongerüst mit eingebetteten MicroPES<sup>®</sup> TF-10 Hohlfaserkapillaren, welche über ein Schlauchsystem perfundiert werden können.

Die Zellisolation und Sprühapplikation wurden in einer ersten Publikation *in vitro* mit humanen fötalen und adulten Keratinozyten sowie dermalen Fibroblasten getestet. In zwei klinischen Machbarkeitsstudien wurden diese Verfahren an geeigneten Verbrennungspatienten in einem intraoperativen, ambulanten Setting erprobt. In zwei weiteren Arbeiten wurde das Konzept einer aktiven Wundaufgabe vorgestellt und *in vitro* sowie *in vivo* evaluiert. Für die *In-vivo*-Studie kam ein Schweine-Wundmodell mit diversen Perfusionslösungen (mit und ohne rhGDF-5) zum Einsatz. Die Datenerhebung fand über mikroskopische Dokumentation, die Aufnahme morphometrischer und biochemischer Parameter, Zellzählungen, Immunhistochemie, Histologie und klinische Fallbeschreibungen statt. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Isolation und Sprühapplikation basaler epidermaler Progenitoren und dermaler Fibroblasten ohne Vitalitätseinbußen möglich ist. Eine klinische Sprühtransplantation lieferte an neun Verbrennungspatienten funktional und kosmetisch ansprechende Ergebnisse innerhalb des ersten Jahres nach der Behandlung. Im Schweine-Wundmodell konnte bereits durch Spülung der aktiven Wundaufgabe mit 1 %-iger Trehaloselösung eine geförderte Heilung beobachtet werden. Mit Zusatz des Faktors rhGDF-5 verstärkte sich der positive Trend in der Wundheilung. Perfusionsansätze mit weiteren Gruppen zeigten eine signifikant verschlechterte Wundheilung ( $p < 0,5$ ). Das vorgestellte Gesamtkonzept kann für Verbrennungspatienten des Grades II<sup>o</sup>b zu einem beschleunigten Wundverschluss und einer ästhetisch verbesserten Therapie führen.

## ABSTRACT – ENGLISCH

The treatment of acute burns, especially for patients with 2b degree wounds, is not resolved satisfactorily. The thesis evaluates an innovative therapeutic concept based on a primary skin cell isolation from fetal or adult tissue, an autologous spray-transplantation and a temporary wound supply via an active wound dressing based on hollow fiber capillaries. The aim is to increase the yield of regenerative basal keratinocyte precursor cells through a gentle isolation technique and to distribute them evenly in the damaged wound bed via intraoperative spray dispersion. To bridge the lack of microcirculation in the wound bed, the hollow fiber capillaries are perfused with therapeutic solutions that optionally contain regenerative growth factors such as rhGDF-5. The skin cell isolation is realised with a dispase-trypsin approach followed by centrifugation of excess enzymes and a wash step. The spray-transplantation is implemented via a processor-controlled pump and a specially developed spray nozzle. The active wound dressing consists of a silicone scaffold with embedded MicroPES<sup>®</sup> TF-10 hollow fiber capillaries and a supporting tubing system for perfusion.

The testing of the cell isolation and spray application was carried out in a published *in vitro* study using human fetal and adult keratinocytes as well as dermal fibroblasts. In two published clinical feasibility studies both methods were tested on suitable burn patients in an intraoperative ambulant setting. In two other published studies the concept of an active wound dressing was introduced and evaluated *in vitro* as well as *in vivo*. For the *in vivo* study, a porcine wound model was applied while using different perfusion solutions (with and without rhGDF-5). Data collection was conducted by means of microscopic documentation, recording morphometric and biochemical parameters, cell counts, immunohistochemistry, histology and clinical case reports. It was shown experimentally that a successful isolation and spray-transplantation of basal epidermal progenitors and dermal fibroblasts is possible without a loss of viability. A clinical spray-transplantation of nine burn patients led to functionally and cosmetically improved results within the first year after treatment. Flushing of 1 % trehalose solution via the active wound dressing demonstrated promoted wound healing in the porcine model already. With the addition of the factor rhGDF-5 the positive trend in wound healing was more pronounced. The otherwise tested perfusion setups showed a significantly impaired wound healing ( $p < 0.5$ ). The proposed concept may lead to accelerated wound closure and an aesthetically improved therapy for 2b degree burn patients.

## **EINLEITUNG**

Verbrennungen des Grades II<sup>o</sup>b zählen zu den schweren Verletzungen. Für diese Wunden besteht eine Lücke an therapeutischen Optionen. Denn einerseits wird auf eine konventionelle Spalthauttransplantation verzichtet, um zugunsten der natürlichen Heilung ein erneutes *overgrafting* zu vermeiden. Andererseits ist der natürliche Wundheilungsprozess oftmals gestört oder eine Reepithelialisierung bleibt vollends aus. Letzteres manifestiert sich in einer feuchten Wundoberfläche mit einer unfunktionalen Mikrozirkulation des dermalen Kapillarsystems [1,2]. Dies kann lokal die Versorgung mit Wundheilungsfaktoren reduzieren [3-8]. Infolgedessen verzögert sich die Wundheilung über Wochen; das Risiko von Infektionen steigt. Ein narbenfreies Abheilen ist mit diesem Hintergrund kaum möglich [9]. Mithin sollten ein frühzeitiger Wundverschluss und eine narbenfreie Heilung oberstes Ziel eines Therapieansatzes sein. Die konventionellen Methoden sind dahingehend jedoch limitiert [1,10]. So basieren gängige Hautzellisoliationsverfahren zumeist auf einer Trypsinbehandlung, wobei regenerative basale Keratinozyten ungenügend isoliert werden [1]. Folglich stehen erst nach einer mehrwöchigen *In-vitro*-Expansion ausreichend Zellen für eine Applikation zur Verfügung [11]. Während dieser langwierigen Kultivierung werden die basalen Progenitoren zerstört und ihr regeneratives Potenzial bleibt ungenutzt [12,13]. Komplikationen, die mit konventionellen Methoden auftreten können, sind Wundinfektionen, Narben- und Blasenbildungen, Hautverfärbungen sowie eine mangelnde Nährstoffversorgung der Transplantate [14]. Vor diesem Hintergrund besteht ein Bedarf an Optimierung von Zellisoliations-, Zellapplikations- und Wundversorgungssystemen. Die Dissertation stellt ein Therapiekonzept vor, welches diese Probleme in Kombination adressiert: Eine schonende Zellisolation über einen Dispase-Trypsin-Zentrifugationsansatz soll den Erhalt direkt applizierbarer Keratinozyten-Progenitoren ermöglichen. Diese können mittels einer Sprühtransplantation fein verteilte Inseln proliferierender Zellen im Wundgrund bilden. Aktive Wundaufgaben versorgen anschließend die eingebrachten Zellen mit Nährstoffen, Antibiotika und Wachstumsfaktoren [15].

## **ZIELSTELLUNG**

Ziel der Dissertation war die grundlegende *in vitro* und *in vivo* Evaluierung des Therapiekonzeptes und die Klärung der Frage, inwiefern eine klinische Einführung realisiert werden könnte. Anhand von fünf Arbeiten wurde das Konzept entwickelt und vorangebracht: Eine *in vitro* Zellisoliationsstudie untersuchte den Erhalt vitaler, sprühfähiger fötaler bzw. adulter Hautzellen. Zwei klinische Machbarkeitsstudien testeten an neun Verbrennungspatienten eine intraoperative Hautzellisolation und Sprühtransplantation. In zwei weiteren Arbeiten wurde das Konzept einer aktiven Wundaufgabe vorgestellt und *in vitro* sowie *in vivo* evaluiert.

## METHODIK

Sofern nicht anders angegeben, stammen alle Lösungen von der Biochrom AG (Berlin), alle Einwegartikel von Becton Dickinson Biosciences oder verbundenen Unternehmen davon (Bedford, MA, USA). Für methodische Details wird auf die Publikationen I – V verwiesen.

**Hautzellisolation aus fötalem Gewebe / Fötale Zellkultur (Publikation I):** Fötale Hautgewebe (6. – 21. SSW) entstammte medizinisch indizierten Schwangerschaftsabbrüchen des *Allegheny Health Reproductive Center*, Pittsburgh, PA, USA. Die Studie wurde vom *Institutional Review Board* der *University of Pittsburgh* genehmigt. Die Zellisolation erfolgte nach Aufklärung und Zustimmung der Spenderinnen. Die Gewebeproben wurden für 3 – 5 h bei 4 °C in PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit 100 U/ml Pen/Strep (Invitrogen) und 2,5 µg/ml Amphotericin B (Invitrogen) aufbewahrt. Es kamen sieben Isolationsmethoden zur Anwendung (siehe Tab. 1). Ziel war es, ein optimales fötales Alter für Ausgangsgewebe zur möglichen Generierung einer Zellbank von epidermalen fötalen Progenitorzellen zu bestimmen.

**Tabelle 1: Getestete Isolationsmethoden fötaler Keratinozyten**

<b>A</b>	Mechanisches Abreiben unter Trockenbedingungen
<b>B</b>	Mechanisches Abschaben von Hautzellen mittels Skalpell
<b>C</b>	0,05 %-iger Trypsinverdau des fötalen Gewebes für 2 Min., gefolgt von einem mechanischem Abschaben der angelösten Hautzellen
<b>D</b>	Bloßes Auswachsen aus dem fötalen Gewebe in kollagenbeschichteten Kulturschalen mit vorgelegtem <i>Growth-Medium</i> (s. u.)
<b>E</b>	Trypsinverdau des fötalen Gewebes für 2 Min.
	Trypsinverdau des fötalen Gewebes für 5 Min.
	Trypsinverdau des fötalen Gewebes für 15 Min.
<b>F</b>	Kollagenaseverdau des fötalen Gewebes für 2 Min.
	Kollagenaseverdau des fötalen Gewebes für 4 Min.
	Kollagenaseverdau des fötalen Gewebes für 8 Min.
	Kollagenaseverdau des fötalen Gewebes für 10 Min.
<b>G</b>	Dispaseverdau des fötalen Gewebes für 15 Min.

Als Positivkontrollen fungierten adulte Hautzellen aus Gewebe, welches kosmetischen Schönheitsoperationen entstammte ( $n = 6$ ). Die isolierten Zellen wurden in 60 mm Petrischalen mit Kollagenbeschichtung überführt (Collagen I Cellware) und in Reinkultur konventionell kultiviert (s. u.).

**Hautzellisolation aus adultem Gewebe (Publikationen I – V):** Spalthaut-Biopsien wurden nach Entnahme für maximal 48 h bei 4 °C in PBS mit Pen/Strep aufbewahrt. Daraufhin wurde subkutanes Fettgewebe entfernt und die Haut mit einem Skalpell in kleine Würfel geschnitten. Die Würfel wurden mit Dispase II (2,5 U/ml + PBS) für 16 – 20 h bei 4 °C im Kühlschrank bzw. für 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgte die Trennung von Epidermis und Dermis.

**Isolation humaner epidermaler Keratinozyten (HEK; Publikationen I – V):** Die Epidermis wurde in Kulturröhrchen mit 5 ml Trypsin / EDTA (0,05 % / 0,02 %) übertragen.

Die Trypsinbehandlung erfolgte über 15 Min. rotierend im Brutschrank bei 37 °C. Über ein 70 µm Zellsieb wurden die HEKs aus der Suspension gefiltert und in ein 15 µl Falcon®-Röhrchen zur fünfminütigen Zentrifugation bei 1000 rpm (216 g) und 4 °C überführt. Das Zellpellet wurde in Keratinozyten *Growth*-Medium resuspendiert: DMEM F0415 mit Ham's 12, Pen/Strep 120 µg/ml, Amphotericin B 250 µg/ml, L-Glutamin 5 mM, *HIT-Stock* Lösung sowie *Epidermal Growth Factor* (EGF). Es folgte eine Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer, Merck, Darmstadt). Die HEKs wurden in Kulturflaschen mit *Growth*-Medium aufgenommen und zwei bis drei Tage ohne Mediumwechsel kultiviert. Darauf folgte eine Umsetzung auf *EpiLife*® Medium (Life Technologies GmbH, Darmstadt): Serumfreies Medium mit 60 µM Calcium und Pen/Strep 10,000 U, Amphotericin B 250 µg/ml sowie dem Wachstumszusatz *EpiLife*® *Defined Growth Supplement* (EDGS, Life Technologies GmbH, Darmstadt).

**Isolation humaner dermaler Fibroblasten (HDF; Publikationen I – V):** Die Dermis-Würfel wurden in ein 15 ml Falcon®-Röhrchen überführt, das zu zwei Drittel mit Kollagenase A (100 mg/50 ml PBS) gefüllt war. Die Kollagenasebehandlung erfolgte für 1 h rotierend im Brutschrank bei 37 °C. Die weitere Isolation und das Passagieren glichen dem beschriebenen Ablauf für die HEKs. Die isolierten HDFs wurden in Kulturflaschen mit 1 – 5 ml vorgelegtem DMEM-Medium aufgenommen: F0415 (DMEM) mit Pen/Strep 120 µg/ml, Amphotericin B 250 µg/ml, L-Glutamin 5 mM sowie 10 % fötales Kälberserum.

**Immunhistochemie (Publikation I):** Die Immunhistochemie folgte einem Standardprotokoll (siehe Publikation I unter Punkt 2.3). CK15 (Klon EPR1614Y, Abcam, Cambridge, MA, USA) diente als primärer Antikörper für undifferenzierte basale HEK-Progenitoren. CK5 (Abcam, Cambridge, MA, USA) fungierte als Marker für differenzierte HEKs. Vimentin (Klon V9, Millipore, Billerica, MA, USA) diente als Marker für dermale Zellen. Melanozyten wurden mit Melan A (Klon NKI/beteb b, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), Merkel-Zellen mit CK20 (Klon Ks208, Dako, Glostrup, Dänemark) und dendritische Zellen mit CD1a (Klon 010, Santa Cruz Biotechnologies) angefärbt. Die Zellen wurden direkt in ihren Kulturgefäßen fixiert und immungefärbt. Mikroskopie: Nikon Eclipse 50i Mikroskop, ausgestattet mit einer Nikon DS Fi1 Kamera und Software (Nikon, Tokyo, Japan).

**Allgemeine Zellkulturbedingungen (Publikationen I – V):** Die Zellkultur und der Verdau mit Enzymen erfolgte stets in einem begasten Brutschrank (bspw. Typ Heraeus BB 6060, Kendro GmbH, Hanau) bei 37 °C in einer 5 %-igen CO<sub>2</sub> Luftatmosphäre. Ein konventioneller Mediumwechsel fand in der Routine alle drei Tage statt.

Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 – 80 % wurden die Zellen über eine fünfminütige 0,25 % / 0,02 % Trypsin/EDTA-Behandlung passagiert und darauf weiter expandiert.

**Allgemeine Histologie (Publikationen I – V):** Die Gewebe wurden in 4 % Formaldehyd und Paraffin eingebettet. Nach Entparaffinierung und einer schrittweisen Entwässerung über Ethanol-Stufen, wurden 3 µm-dicke Schnitte mittels eines Mikrotoms (Microm HM355s, Microm-International-GmbH, Walldorf) angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) eingefärbt (bspw. BioOptica, Mailand, Italien).

**Patientengruppe / Intraoperative Sprühtransplantation (Publikationen II, III):** Männliche ( $n = 7$ ) und weibliche Patienten ( $n = 2$ ) (mittleres Alter ca. 32 Jahre) mit einer verbrannten Körperoberfläche von ca. 13 % im Mittel wurden in einem ambulanten Setting gesprüht. Die medizinischen Einschlusskriterien waren: Verbrennungswunden des Grades II<sup>o</sup>b in moderater Ausweitung und mit verbliebenen Dermis-Anteilen bei ausbleibender Spontanheilung innerhalb der ersten 14 Tage nach Trauma (s. Tab. 1 in Publikation II, S. 273). In den Jahren 2007 und 2008 wurden am Unfallkrankenhaus Berlin-Marzahn (UKB) acht Patienten und im Jahre 2009 am *Merci Hospital* in Pittsburgh ein Patient intraoperativ gesprüht. Eine Einwilligung der Patienten erfolgte nach Aufklärung in allen Fällen.

**Zellsprühgerät (Publikationen I – V):** Das Zellsprühgerät wurde von der Fa. StemCell Systems GmbH (Berlin) entwickelt. Es besteht aus einem prozessorbasierten Steuergerät, das den Kompressor beinhaltet, und einem Sprühkopf, der über einen Luftschlauch und ein Datenverbindungskabel mit dem Steuergerät verbunden ist (s. Abb. 1B in Publikation IV). Der Sprühkopf besitzt eine sterilisierbare Sprühdüse, eine Halterung für konventionelle Luer-Lock Spritzen sowie einen motorisierten Schlitten zur Realisierung des Mediumflusses. Im Sprühkopf wird die Zellsuspension mit anschließender Vernebelung auf eine turbulente Strömung beschleunigt. Die Suspension zerstäubt am Düsenausgang als Kegelstrahl. Der Mediumfluss ist in einem Bereich von 0,8 – 5 ml / Min., in 2 %-Schritten justierbar. Der Luftstrom ist in einem Bereich von 1,5 – 9 l / Min., in 2 %-Schritten regulierbar. Daraus ergibt sich ein möglicher Gesamtdruck von 1014,35 – 1063,77 hPa. Verschiedene Sprühmodi sind möglich.

**Sprühapplikation / Datenerhebung (Publikationen I – III):** Für die Studie zum Sprühen fötaler Keratinozyten sind aus  $n = 4$  Spenderinnen fötale HEKs gepoolt und in Passage 3<sup>o</sup> gesprüht worden. Daraus resultierten  $n = 8$  Sprühansätze in 60 mm Kollagen-beschichteten Petrischalen. Parallel wurden  $n = 8$  Ansätze mit geträufelten adulten Zellen als Positivkontrollen mitgeführt. Die Folgekultur fand über drei weitere Passagen konventionell statt. Vor der klinischen Sprühapplikation wurden die Wunden desinfiziert (bspw. mit Chlorhexidin-Cetrimid-Lösung) und ein scharfes *Debridement* wurde unter lokaler Betäubung oder Vollnarkose

durchgeführt. Die autologe Hautzellisolation und das Sprühen der Zellen erfolgten intraoperativ in einer Sitzung. Alle Patienten wurden mit ihren eigenen Keratinozyten versorgt, die zuvor aus ca.  $2 - 3 \times 3 - 4$  cm großen Exzisions-Biopsien gesunden Gewebes über ein Dermatom (ca. 0,2 mm Tiefe; Humeca D 42, Asclepios, Gutach) gewonnen wurden. In der Klinik wurden die isolierten Zellen in medizinisch zugelassener Ringer-Laktat-Lösung (B.Braun, Melsungen) aufgenommen. Ein Anteil der erhaltenen Zellen wurde in Brutschrankkultur zur Kontrolle überführt. Vor Applikation wurde der Sprühkopf mit 1 ml Ethanol (70 %) gereinigt und desinfiziert. Darauf wurde mit reinem Kulturmedium nachgespült. Für die Sprühtransplantation wurde die Zellsuspension in eine 1 – 2 ml Luer-Lock Spritze überführt. Folglich wurde die Spritze in den Schlitten eingelegt. Das Sprühgerät wurde als *Point-of-Care-Device* auf den aufgefrischten Wundgrund aus ca. 15 – 20 cm Entfernung angewendet. Jeder Sprühvorgang erfolgte mit einem Standardprogramm: Luftdruck = 3,7 l / Min.; Mediumfluss = 4,2 l / Min.; Gesamtdruck = ca. 8,2 mmHg. Für die klinische Nachbehandlung wird auf die Publikationen II und III verwiesen. Um den Heilungsverlauf zu beurteilen wurde neben der subjektiven Einschätzung durch die Kliniker die *Vancouver Scar Scale* (VSS) verwendet [16]. Als klinische Endpunkte dienten: i) die Zeit bis zur vollen Reepithelialisierung und ii) die ästhetische und funktionale Qualität der Wunden sechs Monate nach der Behandlung.

**Prototyp – aktive Wundauflage (Publikationen IV, V):** Der Prototyp einer aktiven Wundauflage für die Tierstudie besteht aus einer ca.  $5 \times 5$  cm großen Hohlfasermembran aus medizinisch zugelassenen, mikroporösen Polyethersulfon-Ultrafiltrationskapillaren (*Cut-off*  $\leq 600.000$  MG) vom Typ MicroPES<sup>®</sup> TF-10 (Membrana, Wuppertal), eingebettet in einem Gerüst aus Elastosil<sup>®</sup> E43 Silikonkleber (Wacker, München); s. Abb. 1.

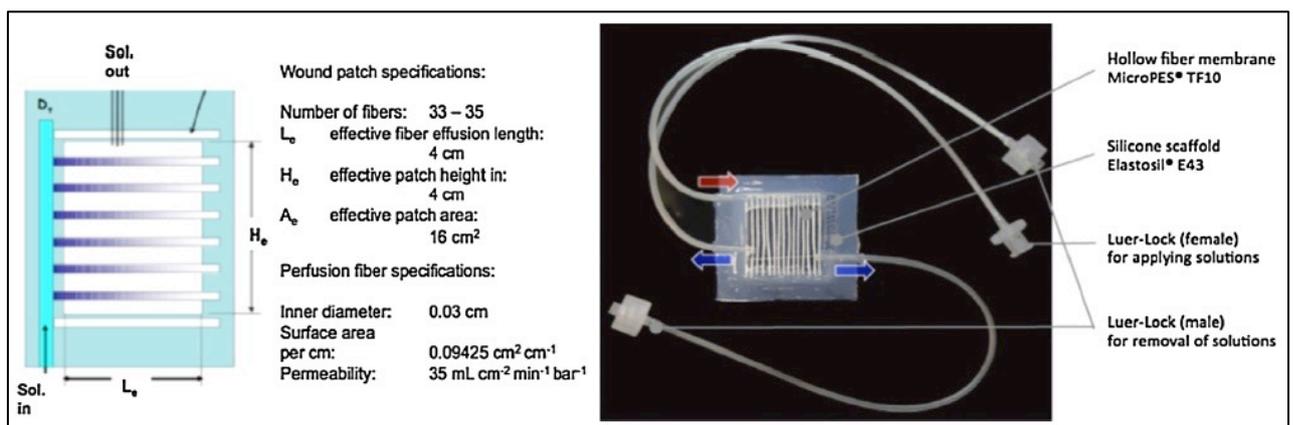


Abb. 1: Prototyp aktive Wundauflage (Schweinemodell) – Abbildung entnommen aus Publikation V, Fig. 1, S. 780, mit Genehmigung von © 2014 Elsevier Ltd und ISBI.

Die Auflage ist über die Kapillaren im Wundbereich perfundierbar. Die offenen, der Membran aufliegenden Schlauchenden (VMQ Silikonschlauch,  $\varnothing = 25 \times 30$  mm; Deutsch & Neumann, Berlin) dienen der Entfernung von verbrauchten Nährlösungen. Um die filigrane Membran zu schützen, wurde sie mit einer dünnen Schicht aus Elastosil<sup>®</sup> E43 Silikonkautschuk bedeckt. Diese Maßnahme vermied ein Auslaufen der Spüllösungen während der Applikation.

**Schweine-Wundmodell / Tierversuch (Publikation V):** Die Zulassung für den Versuch wurde von der deutschen Behörde für Tierforschung erhalten (LAGeSo, Berlin). Die Tierhaltung folgte den Richtlinien der Europäischen und Deutschen Gesellschaft für Versuchstierwissenschaften. Acht gesunde Schweine der Deutschen Landrasse ( $n = 8$ ), vier männliche und vier weibliche, mit einem Körpergewicht von  $50 \pm 5$  kg und einem Alter von 3 – 4 Monaten, wurden paarweise zunächst für je 10 – 14 Tage zur Eingewöhnung untergebracht. Die Haltebedingungen und die Vollnarkose sind vorbeschrieben [17,18]. Jedem Schwein wurden in Bauchlage mit einem sterilen Akku-Dermatom (Humeca D80, Humeca BV, Enschede, Niederlande) fünf Wunden in gleicher Größe (5 x 5 cm), Tiefe (1,2 mm) und Ausrichtung auf dem Rücken gesetzt. Diese Exzisionswunden simulierten Verbrennungen des Grades II<sup>b</sup>. Die Fixierung der Wundauflagen erfolgte nach natürlicher Hämostase und Entfernung größerer Koagel über chirurgische Nähte an den Silikonrändern. Es folgte eine initiale Spülung der Auflagen mit je 10 ml Lösung der entsprechenden Versuchsgruppen (s. u.), wobei sich ein Reservoir in den Wunden ausbildete. An beiden Flanken der Schweine wurde zusätzlich ein Klettverband aus Stoff chirurgisch angenäht. Dies ermöglichte den mechanischen Schutz der Auflagen und einen wiederholten Zugriff zum Wechseln der Spüllösungen. Je zwei Schweine wurden in parallelen Ställen gehalten und über neun Tage beobachtet. Analgesie erfolgte über die ersten sechs Tage mit Fentanyl-Pflastern (Duragesic 75  $\mu$ g/h, Johnson & Johnson, Neuss). Einmal morgens, zwischen 10 – 11 Uhr, und einmal abends, zwischen 17 – 18 Uhr, wurden die Lösungen gewechselt und so die Wunden mit je 10 ml frischer Perfusionslösung gespült. Ein Austausch der Wundauflagen erfolgte nicht. Alle Tiere wurden an Tag 9 gemäß SOP nach *i. m.* Prämedikation mit Azaperon, Ketamin und Xylazin, über einen peripher venösen Zugang mit einer Überdosis Natriumthiopental, gefolgt von Kaliumchloridlösung, getötet.

**Experimenteller Wachstumsfaktor rhGDF-5 (Publikation V):** Der rekombinante humane Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5 (rhGDF-5) ist ein hochwirksames Peptidhormon, welches die Entwicklung zahlreicher Zellen und Gewebe beeinflusst. Er wurde ursprünglich aus embryonalem Hautgewebe isoliert [19-26]. Der Faktor wird über Klonierung in dem *E. coli* Stamm W3110 BP von der Fa. Biopharm GmbH (Heidelberg) produziert [27]. Er kam unseres Wissens nach erstmalig in einem Schweine-Wundmodell zum Einsatz.

**Perfusionslösungen / Versuchsgruppen Wundspülung (Publikation V):** 3,1 mg/ml rhGDF-5 wurden in 10 mM HCl verdünnt, um eine 1 mg/ml Stammlösung zu erhalten. 1 g T9531 D-(+)-Trehalosedihydrat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde in 100 ml 5 mM Na-Acetat (pH 5) verdünnt und filtriert, um eine 1 %-ige Trehaloselösung zu erhalten. Nutriflex® peri Infusionslösungen (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) wurden direkt verwendet. Die adsorptive Kapazität für rhGDF-5 durch die Kapillarmembranen und Silikonschläuche der Wundaufgaben, wurde in einem vorbereitenden *In-vitro*-Test untersucht, so dass die unten angegebenen Endkonzentrationen sollgemäß erzielt wurden (siehe Publikation V; Supplemental Materials). **Gruppe 1 (TRE):** 1 %-ige Trehaloselösung in *aqua ad injectionem* plus 5 mM Natriumacetat; pH 5,5. **Gruppe 2 (TRE+G):** rhGDF-5 (150 ng/ml) in 1 %-iger Trehaloselösung in *aqua ad injectionem* plus 5 mM Natriumacetat; pH 5,5. **Gruppe 3 (NUT):** Nutriflex® peri Infusionslösung. **Gruppe 4 (NUT+G):** Nutriflex® peri Infusionslösung plus rhGDF-5 (150 ng/ml) gelöst in 1 %-iger Trehaloselösung mit 5 mM Natriumacetat Zusatz; pH 5,5. **Gruppe 5 (NK):** Trockene Negativ-Kontrollwunde ohne Wundspülung. Diese Wunde wurde mit V.A.C. Folie (Kinetic Concepts, Inc., San Antonio, TX) bedeckt, in der Luftlöcher eingestochen waren. Zum mechanischen Schutz war die NK-Wunde von einem chirurgisch fixierten Silikonring umgeben. **Gruppe 6 (PK):** Positivkontrolle – Gesunde Haut vom Schweinerücken.

**Beurteilung Wundheilungsfortschritt im Tiermodell (Publikation V):** Der Wundheilungsfortschritt wurde anhand einer standardisierten Fotodokumentation, einem grafisch bestimmten Reepithelialisierungsgrad, einem *Score* für die Wundverzerrung und über eine Biopsienahme der Läsionen an Tag 9 beurteilt. Für die mikroskopische Beurteilung wurden H&E Färbungen mit deskriptiver Analyse der Epidermis und des Granulationsgewebes herangezogen. Ferner wurden anhand der histologischen Schnitte morphometrische Messungen zur Dicke der Epidermis und des Granulationsgewebes durchgeführt.

**Allgemeine Datenerhebung (Publikationen I – V):** Für die Beurteilung des *in vitro* Zellzustandes wurden mikroskopische Fotos und biochemische Daten generiert, ausgewertet sowie grafisch verarbeitet. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Beobachtung des Zellkulturverhaltens in puncto Größe und Anordnung der Zellen, Koloniebildung, Verhältnis Cytoplasma zu Zellkern, Zellbewegungen und Mitosen stets über Phasenkontrastmikroskopie (Axiovert 25 Mikroskop, Zeiss, Göttingen). Biochemisch wurden der Glukoseverbrauch, die Laktatbildung und die LDH-Freisetzung verfolgt.

**Datenverarbeitung / Statistik (Publikationen I – V):** Die Evaluierung der fötalen Zellisolationmethoden erfolgte mithilfe von *Notched-Boxplots* und der Whisker Analyse unter Verwendung von Wessa.net Software (Version 1.1.23-r3). Alle Zellzählungen wurden dreimal

durchgeführt und gemittelt. Statistische Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) wurden mittels der SPSS Software Version 10 für MS-Windows® (SPSS Inc., Chicago, USA) und GraphPad Prism 5® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) ermittelt. Sofern nicht anders angegeben, sind alle Werte als Mittelwerte  $\pm$  SD ausgedrückt. Insbesondere fand für die Tierversuchsdaten eine Varianzanalyse (ANOVA) statt, gefolgt von einem Dunnett Post-hoc-Test.

## ERGEBNISSE

Es hat sich *in vitro* gezeigt, dass über einen Dispase-Trypsin-Zentrifugationsansatz die schonende Isolation fötaler und adulter Hautzellen, insbesondere basaler HEK-Vorläuferzellen, reproduzierbar möglich ist (Publikationen I – III). Darauf basierend konnte klinisch eine Sprühtransplantation vereinzelter, gleichmäßig verteilter HEKs ohne Vitalitätseinbußen erfolgen (Publikationen II, III). Ferner ist eine externe Versorgung adulter HEKs und HDFs über die aktiven Wundaufgaben *in vitro* möglich (Publikationen IV, V). Die regelmäßige Wundspülung mit 1 %-iger Trehaloselösung vermag die Wundheilung in dem verwendeten Schweinemodell zu fördern. Der Zusatz des regenerativen Faktors rhGDF-5 verstärkte sogar den positiven Trend einer geförderten Heilung (Publikation V). Die wesentlichen Ergebnisse sind im Einzelnen:

### Experimentelle fötale Hautzellisolation (Publikation I)

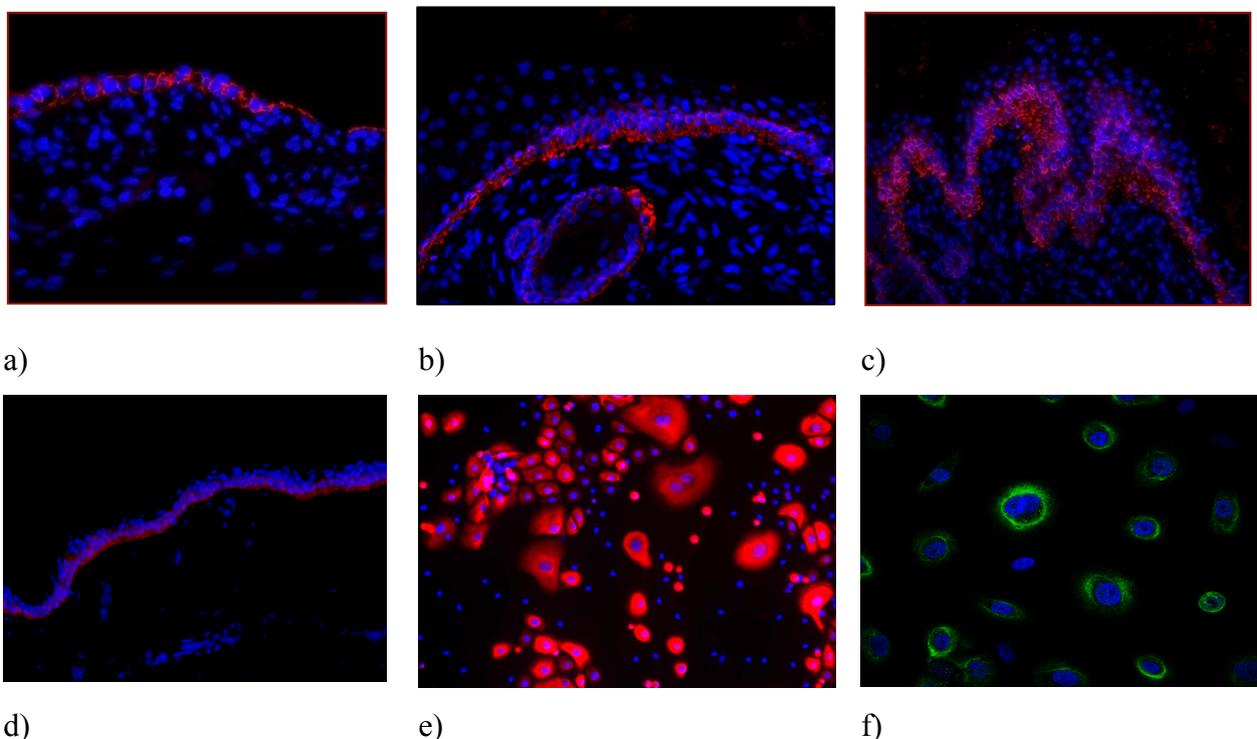


Abb. 2 a) – f): a) Anti-CK15 Färbung in der basalen Schicht von 8 Wochen altem fötalen Hautgewebe; CK15<sup>+</sup>-Zellen liegen einschichtig oben auf. b) Anti-CK15 Färbung mit 18 Wochen altem fötalen Hautgewebe; zeigt mehrschichtige CK15<sup>+</sup>-Zellen, auch in der Nähe einer Haarwurzel. c) Anti-CK15 Färbung mit 21 Wochen altem fötalen Hautgewebe; zeigt bereits CK15<sup>+</sup>-Zellen in mehrlagigen Schichten sowie Zellen oberhalb dieser Schichten,

die CK15<sup>+</sup> sind (Abb. 2 a)-c) in 160fach Vergrößerung). d) Dünne basale CK15<sup>+</sup>-Schicht in adulter Haut als Kontrolle. e) CK15<sup>+</sup>-Färbung in vereinzelt epidermalen Zellen während der Kultivierung; gewonnen aus Gewebe der 8. SSW mittels trockenem Abreiben (Methode A), Passage 0, 200fach Vergrößerung. f) Parallelfärbung mit CK5 (konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie); bestätigt den epidermalen Charakter der isolierten fötalen Zellen; die CK5<sup>+</sup>-Signale sind nicht gleichmäßig verteilt. Abbildungen entnommen aus Publikation I, Fig. 3, S. 6 mit Genehmigung von © 2012 Elsevier Ltd und ISBI.

**Isolationsmethoden fötaler HEKs (Publikation I):** Die Isolationsmethoden A) – G) gingen mit unterschiedlichen Ausbeuten und Kontaminationsraten durch fötale Fibroblasten einher. So wurde eine intensive Zellcharakterisierung allein mit den ertragreichsten und reinsten Methoden fortgeführt, nämlich Variante A) – trockenes Ausreiben, und Variante D) – Auswachsen (*outgrowth*). Die mittlere Zellausbeute betrug im Falle von A)  $590.000 \pm 171.254$  Zellen und im Falle von D)  $725.000 \pm 255.740$  Zellen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Methoden A) und D) festgestellt werden ( $p < 0,5$ ).

**H&E Histologie fötaler HEKs (Publikation I):** Die histologischen Befunde ließen eine einlagige fötale Epidermis allein in Biopsien aus der 6. – 9. SSW erkennen (siehe Figuren 1a – d in Publikation I). Die epidermale Schicht wurde bereits ab der 10. SSW zweilagig (Fig. 1e in Publikation I). Während der 18. – 21. SSW konnte nur eine stratifizierte Epidermis beobachtet werden (Figuren 1f – g in Publikation I). Die adulten Zellen der Kontrollgruppen zeigten durchweg eine mehrlagige Epidermis (Fig. 1h in Publikation I).

**Immunhistochemie fötaler HEKs (Publikation I):** Die Immunhistochemie bestätigte die histologischen Befunde (s. Abb. 2 a-f). Nur die Biopsien mit einem Alter aus der 6. – 9. SSW konnten über CK15 als einlagig markiert werden. In älteren fötalen Zellproben sowie in den adulten Kontrollen war die Epidermis nicht mehr einlagig und nur die basale Schicht CK15<sup>+</sup> angefärbt. Die CK5<sup>+</sup> / CK15<sup>+</sup> Parallelfärbungen bestätigten den erfolgreichen Transfer fötaler basaler HEKs in Kulturschalen. Die negativen Kontrollfärbungen für Merkel-Zellen, Melanozyten und dendritische Zellen bestätigten, dass diese in den Biopsien der 6. – 9. SSW nicht vorlagen. Lediglich in älterem Gewebe konnten sie fötal und adult detektiert werden.

**Sprühen fötaler HEKs (Publikation I):** Die gesprühten *in vitro* Ansätze fötaler HEKs konnten unauffällig kultiviert werden – ohne signifikante Unterschiede in puncto Zellmorphologie, Kulturverhalten (Proliferation, Migration, Passagieren) und Glukoseverbrauch gegenüber den geträufelten Kontrollkulturen ( $p < 0,5$ ).

**Intraoperative Hautzellisolation und Sprühtransplantation (Publikationen II, III):** Alle Patienten ( $n = 9$ ) konnten erfolgreich sprühtransplantiert werden. Die Wunden waren in allen Fällen nach ca. 13 Tagen (Mittelwert), im Sinne einer vollständigen Reepithelialisierung geheilt. Innerhalb von zwölf Monaten nach der Sprühtransplantation waren in allen Fällen die

Heilungsergebnisse kosmetisch ansprechend – ohne nennenswerte Verfärbungen oder Vernarbungen. Die kosmetischen Eindrücke wurden durch die *Vancouver Scar Scale* bestätigt. In allen Fällen nahmen die Bewertungspunkte von anfänglich drei bis auf einen Punkt innerhalb von zwölf Monaten nach der Behandlung ab. Kein Patient zeigte Nebenwirkungen oder Komplikationen. Die behandelte Körperoberfläche lag im Mittel bei 3 %. Das Verhältnis der gesunden Spenderareale zu behandelbarer Fläche lag bei 1:20 bis 1:60. Der Mittelwert lag bei 1:25. Alle Kontrollkulturen der isolierten Zellen zeigten ein unauffälliges Kulturverhalten ( $n = 9$ ).



**Abb. 3:** Männlicher, 43 Jahre alter US-Patient mit tieferdarker Verbrennung des Grades II<sup>b</sup> nach Kerosin-Explosionstrauma. Obere Zeile von links nach rechts: Sprühtransplantation 10 Tage nach dem Trauma (Behandlungstag 0) an rechtem Arm und Schulter vor Wundauffrischung; Intraoperative Zellisolierung; ambulanter Sprühvorgang. Untere Zeile von links nach rechts: Wund-Nachuntersuchung vier Tage nach Sprühtransplantation; nach 3 Monaten; nach 6 Monaten; und nach dem 12. Monat. Abbildung entnommen aus Publikation III, Fig. 1, S. e21 mit Genehmigung von © 2011 Elsevier Ltd und ISBI.

**Tierstudie – Schweine-Wundmodell (Publikation V):** Bei den acht getesteten Schweinen war die Narkose und Operation unauffällig. Die Blutanalysen bestätigten, dass bei den Schweinen keine systemischen Infektionen oder anderweitige Komorbiditäten vorlagen.

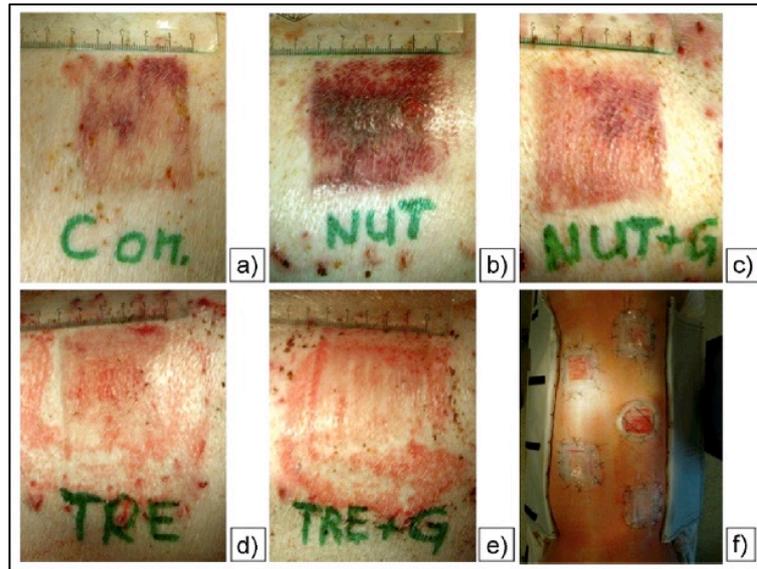


Abb. 4: Repräsentative Darstellung der makroskopischen Wundheilung ( $n = 1$ ), Tag 9: a) Negativkontrolle ohne Wundspülung; untere Hälfte erscheint reepithelialisiert; obere Hälfte zeigt teils starke Verfärbungen. b) Nutriflex® Spülung; keine Reepithelialisierung erkennbar; stark kontrastierter, verzerrter Wundbereich. c) Nutriflex® + rhGDF-5 Spülung; teils homogen rot gefärbter Wundbereich; teils stark kontrastierend und nicht reepithelialisiert. d) Trehalose-Perfusion; unterer Teil weitestgehend reepithelialisiert mit teils nativer Hautfärbung; oberer Teil leicht gerötet. e) Trehalose + rhGDF-5 Spülung; im gesamten Wundbereich teils native Hautfärbung zu erkennen; an den Rändern leichte Rötungen; im Zentrum vollständig reepithelialisiert. f) Versuchsanordnung Schweine-Exzisionswunden-Modell. Abbildung entnommen aus Publikation V, Fig. 2, S. 782 mit Genehmigung von © 2014 Elsevier Ltd und ISBI.

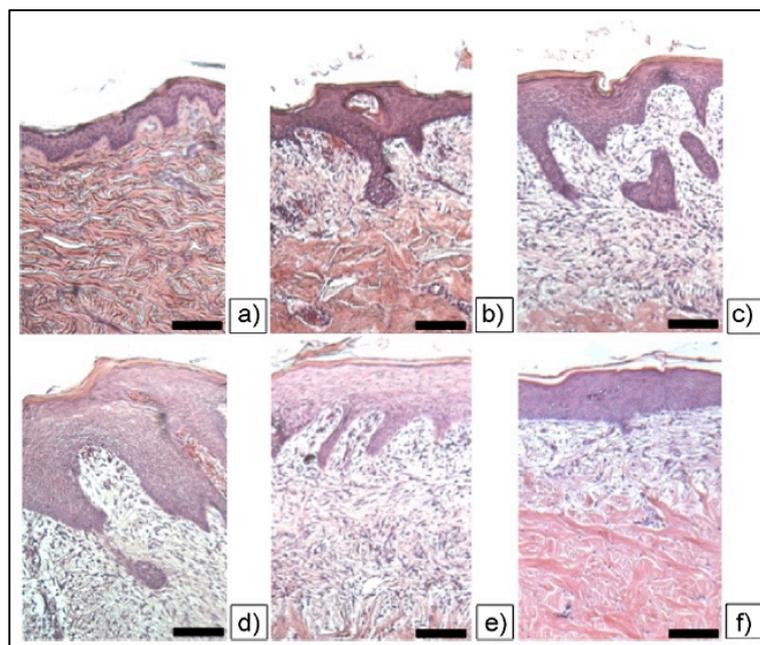


Abb. 5: Repräsentative Darstellung einer H&E Färbung der Wunden ( $n = 1$ ), Tag 9: a) gesunde Haut als Positivkontrolle; normales Erscheinungsbild nativer Schweinehaut. b) Negativkontrolle ohne Wundspülung; leicht verdickte und inhomogene Epidermis; dünnes Granulationsgewebe, teils unorganisiert. c) Nutriflex® Spülung; verdickte, unorganisierte Epidermis, teils mit zellulären Wirbeln; verdicktes Granulationsgewebe. d) Nutriflex® + rhGDF5; massiv verdickte Epidermis mit zellulären Wirbeln; massiv verdicktes Granulationsgewebe. e) Trehalose Spülung; leicht verdickte aber homogen strukturierte Epidermis mit Reteleisten und Hornabschilferungen; verdicktes Granulationsgewebe, gut organisiert. f) Trehalose + rhGDF-5 Spülung; ausdifferenzierte, geschichtete Epidermis mit funktionalem *Stratum corneum*; einsetzende Ausbildung der Reteleisten erkennbar; Granulationsgewebe erscheint organisiert und homogen. Abbildung entnommen aus Publikation V, Fig. 5, S. 784 mit Genehmigung von © 2014 Elsevier Ltd und ISBI.

**Makroskopische Wundheilung (Publikation V):** Eine repräsentative Wiedergabe der makroskopischen Ergebnisse kann Abb. 4 entnommen werden. Eine geförderte Wundheilung konnte in der Versuchsgruppe 1 (TRE) und stärker ausgeprägt in der Versuchsgruppe 2 (TRE+G) festgestellt werden. Dahingegen waren in den Versuchsgruppen 3 (NUT) und 4 (NUT+G) signifikant schlechtere Ergebnisse zu beobachten ( $p < 0,05$ ). Der visuelle Eindruck wurde durch die Reepithelialisierungsraten bestätigt (s. Abb. 3 in Publikation V, S. 782). Die histologischen H&E Schnitte deckten sich mit dem makroskopischen Eindruck (s. Abb. 5). Die histomorphometrischen Dickemessungen der Epidermis und des Granulationsgewebes waren ebenfalls im Einklang mit den makroskopischen Eindrücken (s. die Abb. 6 und 7 in Publikation V, S. 785). Über mikrobiologische Analysen der Wundabstriche konnte eine moderate Kolonialisierung mit herkömmlichen Keimen in allen Wunden festgestellt werden.

**Aktive Wundaufgabe – Machbarkeit und Sicherheit (Publikation V):** Eine zweimal tägliche Wundspülung war über die neun Tage Versuchszeitraum stets möglich. Unter den Auflagen bildete sich nach Applikation ein Reservoir an Spüllösung, was den feuchten Wundheilungsaspekt adressierte. Ein Anwachsen der Zellen oder ein Einwachsen der Kapillaren in den Wundgrund trat nicht auf. Aus medizinischer Sicht konnten keine sicherheitsrelevanten Auffälligkeiten festgestellt werden.

## **DISKUSSION**

Die klinisch etablierten Methoden zur Behandlung akuter Verbrennungswunden sind die Spalthauttransplantation (typischerweise erweitert als *Meshgrafts*) sowie Therapien auf Basis patienteneigener, *in vitro* gezüchteter Keratinozytentransplantate (sog. *CEA-Sheets*) [28,29]. Mit beiden Techniken können in der diskutierten medizinischen Indikation bisher nicht voll befriedigende Heilungsergebnisse, sowohl aus funktioneller als auch kosmetischer Sicht, erzielt werden. Bei großflächigen Defekten ist partiell nur eine Defektheilung über mehrere Wochen anstatt einer schnellen epithelialen Regeneration zu beobachten [10]. Als Hauptursachen solcher Problemwunden sind ein verzögerter epithelialer Wundverschluss und die Minderperfusion des Gewebes anzuführen [1,2]. Zudem ist bekannt, dass in Brandwunden endogene Wachstumsfaktoren verringert sind [3-8]. Insbesondere erscheint für Patienten mit Verbrennungen des Grades II<sup>b</sup> die Anwendung einer der genannten Methoden problematisch. Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung verbesserter Therapiekonzepte von Interesse. Ein moderner Hautersatz sollte über das bloße Auflegen einer dünnen Reepithelialisierungsschicht im Wundbereich hinausgehen und eine komplexe Regeneration ermöglichen. Hier erscheint das Einbeziehen von autologen Hautprogenitorzellen sinnvoll. Auch sollte die Versorgung

therapeutisch applizierter Zellen temporär überbrückt werden, bis das unterliegende Gewebe wieder funktionsfähig ist. In der vorliegenden Dissertation wird ein innovativer Ansatz zur Behandlung von Verbrennungswunden, insbesondere für Wunden des Grades II<sup>o</sup>b, vorgestellt. Ziel der Arbeit war es, moderne Aspekte der Wundtherapie in einem Gesamtkonzept zu vereinen und die klinische Machbarkeit der einzelnen Komponenten: i) Hautzellisolation, ii) Sprühtransplantation und iii) aktive Wundversorgung zu evaluieren – *in vitro* und *in vivo*.

**Experimentelle fötale Hautzellisolation (Publikation I):** Zunächst wurde ein Ansatz der Schaffung einer fötalen, nicht-autologen Zellbank experimentell untersucht. In der Literatur wird innerhalb der ersten Schwangerschaftswochen eine narbenfreie Wundheilung für die einschichtige fötale Epidermis beschrieben [30]. Jedoch wurde weder die Isolation fötaler HEKs aus Hautgewebe vor der 12. SSW noch deren therapeutische Anwendung getestet. Hohlfeld *et al.* untersuchten bisher die Generierung einer dermalen fötalen Zellbank [31,32]. Die Ergebnisse unserer Publikation I bestätigen, dass ebenso epidermale Progenitorzellen der 6.–9. SSW erfolgreich isoliert, kultiviert und sprühappliziert werden können. In Übereinstimmung mit der Literatur, war die Isolation epidermaler fötaler Progenitorzellen ab der 10. SSW nicht mehr möglich [30-35]. Es scheinen daher die jüngeren Zellen, die therapeutisch vielversprechendsten zu sein. Die getesteten Isolationsmethoden B), C) und E)–F) führten zu einer signifikanten Kontamination der Isolate mit fötalen Fibroblasten (s. Tab. 1 in Publikation I, S. 3). Dahingegen haben sich bei einer detaillierten Charakterisierung die Methoden A) und D) als annähernd gleichwertig in puncto Zellausbeute, Zellqualität, Kulturqualität und Grad an Kontaminationen mit Fibroblasten für die Isolation fötaler HEKs erwiesen. Die Parallelfärbungen von CK15<sup>+</sup>- und CK5<sup>+</sup>-Zellen bestätigten, dass basale fötale HEKs in eine routinemäßige Zellkultur erfolgreich überführt werden konnten. Mithin scheint eine mechanische Isolationsmethode (trockenes Abschaben – A) sowie ein bloßes Auswachsen (D) der Zellen zur Verfügung zu stehen, um reproduzierbar eine epidermale fötale Zellbank aufbauen zu können. Mit diesen Methoden wäre auch ein potenziell negativer Einfluss durch enzymatische Ansätze ausgeschlossen. Sofern dennoch geringe Kontaminationen mit fötalen Fibroblasten aufgetreten sind, konnten diese erfolgreich mittels einer moderaten Trypsinierung (2 Min.) unter dem Mikroskop abgelöst werden. Insbesondere konnten keinerlei Kontaminationen mit Merkel-Zellen, Melanozyten oder dendritischen Zellen über Immunfluoreszenz detektiert werden. Dies konnte so auch erwartet werden, da ontogenetisch die Entwicklung jener Zellen nicht unterhalb der 9. SSW stattfinden sollte [33-35]. Insgesamt spricht diese experimentelle Machbarkeitsstudie für einen richtungsweisenden Ansatz in der Isolation fötaler HEKs mittels der Methoden A) und D). Auf der anderen Seite zeigten die Isolate ein nur langsames Wachstum, was mit niedrigen

Populationsverdoppelungszeiten einhergeht. Aufgrund der langsamen *In-vitro*-Multiplikation der HEKs würden sich fötale nicht-autologe Zellen lediglich anbieten, um eine dermale Hautzellbank weiter zu entwickeln [36,37]. Dabei müssten insbesondere mögliche Abstoßungsreaktionen der Empfänger evaluiert werden. Mit diesem Hintergrund wurde nachfolgend die Nutzung adulter autologer Hautzellen unter Vermeidung einer *In-vitro*-Kultivierung weiter verfolgt. Dabei wurde ein Verfahren etabliert, mit welchem die Hautzellen direkt im Operationssaal von der Spenderarealbiopsie isoliert und sofort auf die Wunde gesprüht werden können – die intraoperative Methode. Um eine dabei geringer verfügbare Zellzahl zu kompensieren, wurde anstatt der bloßen Isolierung der Keratinozyten eine zusätzliche Isolation der epidermalen Progenitor- und Stammzellen der Basalzellschicht angestrebt.

**Intraoperative Hautzellisolation (Publikation II):** Im Gegensatz zu Wood *et al.* [38,39] findet die konzeptgemäße Hautzellisolation mittels eines 40-minütigen Dispase-Verdau statt, gefolgt von einer 15-minütigen Trypsin-Behandlung und einem siebenminütigen Waschschrift. Diese modifizierte Methode scheint geeignet, um die allgemeine Zellausbeute zu erhöhen und dabei die basalen HEKs vital beizubehalten [43,44]. Erst die Trennung von Epidermis und Dermis erlaubt dem Trypsin großflächig in der Grenzregion zu wirken, wo sich die basalen teilungsaktiven HEKs befinden. Zudem reduzieren sich die Trypsin-Inkubationszeiten durch den Dispase-Vorverdau, was wiederum zur Erhöhung der Vitalität der Zellen beiträgt. Der anschließende Waschschrift entfernt zurückgebliebene Enzyme und schützt abermals die Zellen. Hohe Ausbeuten an HEK-Progenitorzellen sind mit den konventionellen Methoden nach Wood *et al.* [38,39] kaum möglich. Mithin konnten über die Publikationen I und II sowohl experimentelle fötale Isolationsmethoden als auch für die intraoperative Sprühmethode klinisch geeignete Hautzellisolierungen etabliert und ein klinisches Konzept der Zellanwendung entwickelt werden.

**Intraoperative Sprühtransplantation (Publikationen II, III):** Die Sprühapplikation autologer Hautzellen wurde bereits beschrieben [40-44]. Für die vorliegenden Sprühstudien sind die isolierten HEKs in Ringer-Laktat-Lösung als Trägermedium aufgenommen worden. Diese Lösung ist klinisch zugelassen und inert gegenüber den Zellen. Entsprechend hat sich Ringer-Laktat in beiden Publikationen als geeignete Sprühlösung für klinische Studien herausgestellt. Bei den neun getesteten Patienten konnten aus kleinflächigen Biopsien (ca.  $2 - 3 \times 3 - 4$  cm) vielfach höhere Wundareale innerhalb von 10 – 21 Tagen reepithelialisiert und geschlossen werden – ohne Transplantationsnarben zu hinterlassen. Die autologen Melanozyten scheinen erfolgreich mitisoliert worden zu sein, wofür die hohe kosmetische Qualität der Wundheilung innerhalb des ersten Jahres *Follow-up* spricht. Denn bei keinem der Patienten war eine starke

Diskoloration oder Vernarbung der Transplantate erkennbar. Ein erneutes *overgrafting* konnte in allen Fällen verhindert werden. Diese klinischen Machbarkeitsstudien legen nahe, dass ein *Debridement* zur Auffrischung des Wundgrundes gefolgt von einer Sprühtransplantation zu akzeptablen Reepithelialisierungsraten und visuell ansprechenden Ergebnissen führen kann. Mithin konnte nachgewiesen werden, dass autologe Hautzellen für eine Sprühapplikation direkt in ausreichender Menge isoliert werden können. So konnten Verhältnisse von Spenderareal zu behandelter Körperoberfläche von bis zu 1:60 erzielt werden. Dies ist mit der Spalthauttransplantation, deren Verhältnisse von 1:4 bis 1:6 variieren [1], nicht möglich. In den stets parallel angesetzten *In-vitro*-Kontrollen der Isolate adhärten, proliferierten und migrierten die patienteneigenen Zellen unauffällig, was die schonende Hautzellisolation abermals belegte. Im Hinblick auf die einschlägige Literatur scheint der Einsatz intraoperativ isolierter und gesprühter, nicht-kultivierter Einzelzellen zu einer verkürzten Wundheilung und zu einem verbesserten kosmetischen Ergebnis beitragen zu können. Auf diese Weise werden vereinzelt auswachsende Inseln aus regenerativen basalen HEKs gleichmäßig im Wundgrund eingebracht, welche in alle Richtungen zu proliferieren und migrieren vermögen. Obwohl Gravante *et al.* einen Zeitvorteil beim Wundverschluss infrage stellen [45], sprechen die vorliegenden Ergebnisse aus ästhetischer und funktionaler Sicht für eine klinisch verbesserte Anwendung. Über diverse *In-vitro*-Vorstudien unserer Gruppe wurde bereits gezeigt, dass die verwendete Sprühapparatur die Zellen durch den Sprühvorgang selbst nicht in ihrer Vitalität beeinflussen [44]. Die Vorergebnisse zeigten, dass die Apparatur Zellsuspensionen sparsam, großflächig, in nahezu homogener Verteilung und ohne merkliche Vitalitätseinbußen aufzubringen vermag [44]. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte das Konzept in ersten klinischen Einsätzen bestätigt werden. Die Sprühstudien II und III weisen auch Limitierungen auf. So wurde der Wundheilungsverlauf sowohl von den Patienten als auch von den beteiligten Klinikern ausschließlich subjektiv bewertet. Da bei den humanen Machbarkeitsstudien II und III parallel keine Kontrollen mit konventionell isolierten Zellen gesprüht werden konnten, müssen diese Ergebnisse vorerst als Trend interpretiert werden. Ebenso konnten klinisch keine Wundkontrollen ohne Behandlung bzw. allein mit einem *Debridement*, aber ohne Zellsprühtransplantation, mitgeführt werden. Diese Kontrollen wären im Rahmen von klinischen Machbarkeitsstudien ethisch auch nicht vertretbar gewesen. Demzufolge wird für klinische Folgestudien ein *Multicenter*-randomisierter und kontrollierter Studienanspruch empfohlen, der mit einer höheren Anzahl geeigneter Patienten und unter Verwendung der oben erläuterten Kontrollen durchgeführt würde. Nichtsdestotrotz zeigen die Sprühstudien II und III die klinische Machbarkeit auf und legen die Grundlage für diesbezügliche Weiterentwicklungen.

Insbesondere an komplizierten Körperstellen, wie im Gesicht und an den Händen, erscheint die intraoperative Sprühapplikation vielversprechend. Denn die Applikation von Zellsuspensionen auf unebenen Wundflächen gestaltet sich, im Vergleich zum *Meshgrafting*, in der Regel unproblematisch.

**Experimentelles Sprühen fötaler HEKs (Publikation I):** Die Übertragbarkeit des Zellsprühverfahrens auf fötale Hautzellen konnte ebenfalls positiv getestet werden. Vorteil einer Sprühanwendung fötaler HEKs wäre, dass diese Zellen spenderunabhängig über eine Zellbank in ausreichender Menge zur Verfügung stehen könnten und dabei immunologisch verträglich sein sollten [36]. Neben potenzieller immunologischer Probleme zeigen die Ergebnisse zum Kulturverhalten dieser Zellen jedoch, dass eine Etablierung einer fötalen epidermalen Zellbank nur für dermale nicht aber für die kritischen epidermalen Zellen sinnvoll erscheint.

**Konzept einer aktiven Wundauflage (Publikation IV):** Es ist bekannt, dass die Wundheilung im feuchten Milieu schneller und mit geringerem Schmerz abläuft [46,47]. Therapeutische Zellen sind in feuchter Umgebung vitaler und können besser in das Wundareal einwandern. Daneben ist bekannt, dass eine Optimierung von Wundverbänden zu erfolgen hat, um mechanische Belastungen in der Wunde zu reduzieren (sog. „*off-loading*“) [48]. Konventionelle Verbände bestehen vorwiegend aus Gazen, Polymerfilmen, Schäumen und Gelen [10,48-50]. Sie sind als passive Auflagen starr und unfähig, eine akute Wunde lokal zu versorgen bzw. kontrolliert Nährstoffe, Antibiotika und Wachstumsfaktoren einzubringen. Die in der Publikation IV vorgestellte aktive Wundauflage ist entwickelt, um temporär den schlecht versorgten Wundgrund zu verbessern und mechanische Belastungen zu reduzieren.

**Aktive Wundauflage – Tierstudie (Publikation V):** Der Faktor rhGDF-5 wurde im Rahmen der eigens designten Tierstudie, unseres Wissens nach, erstmalig *in vivo* über Hohlfaserkapillaren appliziert. Die adsorptive Kapazität von rhGDF-5 aufgrund der Kapillaren und Silikonschläuche der Wundauflagen wurde in einem vorbereitenden *In-vitro*-Test untersucht. Darauf basierend konnte eine stabile Lösung mit 1 %-iger Trehalose und 150 ng/ml rhGDF-5 entwickelt werden, welche die Kapillaren zu annähernd 100 % passiert (s. Publikation V; Supplemental Materials). Dies war für eine *in vivo* Anwendung unerlässlich. Die Hypothese zum Tierversuch war, dass die wiederholte Wundspülung mit therapeutischen Perfusionslösungen (mit und ohne rhGDF-5) zu einer geförderten Wundheilung und ästhetisch ansprechenden Ergebnissen beiträgt. Es wurde sich an einem Schweinemodell von Singer *et al.* [51,52] orientiert und ein eigenes Exzisions-Wundmodell mittels Dermatom etabliert. Das Modell hat sich über die neun Tage Versuchszeitraum als adäquat erwiesen. Denn innerhalb der acht getesteten Tiere konnten keine gravierenden Unterschiede in den Negativkontrollen (natürliche

Wundheilung) festgestellt werden, was die statistische Vergleichbarkeit der Tiere ermöglichte. Im Ergebnis hat sich gezeigt, dass bereits eine zweimal tägliche Spülung mit 10 ml der 1 %-igen Trehaloselösung (TRE) eine geförderte Heilung in den Exzisionswunden erkennen ließ. Mit Zusatz von rhGDF-5 (TRE+G) war die Wundheilungsförderung sogar stärker ausgeprägt. Obwohl eine vollständige Heilung auch in der TRE+G Gruppe nicht beobachtet werden konnte, war hierbei der positive Heilungstrend durchweg am deutlichsten erkennbar. Die mittlere epidermale Dicke war allein bei der TRE+G Gruppe mit den Werten der gesunden Positivkontrollen (PK) vergleichbar. Das deutet auf einen positiven Einfluss durch rhGDF-5 gegenüber der TRE-Gruppe hin. Perfusionsansätze mit Nutriflex<sup>®</sup>-Lösungen (NUT; NUT+G) zeigten eine signifikant verschlechterte Wundheilung ( $p < 0,5$ ). Die in der Literatur zumeist beschriebenen Methoden zur topischen Verabreichung von Wachstumsfaktoren sind das Verstreichen oder Aufträufeln [53]. Stets nachteilig sind dabei die ungleichmäßige Verteilung und die mangelnde Reproduzierbarkeit. Diesen Problemen kann mit der aktiven Wundauflage begegnet werden. Deren Hohlfaserkapillaren ermöglichen die gleichmäßige und kontinuierliche Verteilung topisch aktiver Substanzen. Zudem konnten während des Versuchszeitraums keine sicherheitsbedenklichen Aspekte festgestellt werden. Die Kapillaren sind weder in den Wundgrund eingewachsen, noch haben sie Infektionen hervorgerufen.

### **Konklusion**

Das vorgestellte Gesamtkonzept erscheint geeignet, um die therapeutische Lücke für Patienten mit Verbrennungen des Grades II<sup>°</sup>b zu adressieren. Die Ergebnisse legen in der Gesamtschau nahe, dass eine zeitweise Versorgung primär isolierter und sprühapplizierter Hautzellen über die aktiven Wundauflagen möglich ist. Weitere Studien sind nötig, um bspw. verschiedene Perfusionsmodi der Wundauflagen sowie verschiedene Dosen der therapeutischen Wirkstoffe zu testen. Denkbar ist auch die Entwicklung eines klinischen Anwendungskits bestehend aus: i) den Lösungen für die autologe Zellisolation; ii) dem Hautzellsprühgerät zur Sprühtransplantation sowie iii) den aktiven Wundauflagen für die externe Versorgung.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Gerlach JC, Wolf SE, Johnen C, Hartmann B. Innovative regenerative medicine approaches to skin cell-based therapy for patients with burn injuries. *Principles of Regenerative Medicine*, Elsevier/Academic Press 2008;76:1298-1321.
- [2] Varkey M, Ding J, Tredget EE. Advances in skin substitutes – Potential of tissue engineered skin for facilitating anti-fibrotic healing. *J Funct Biomater*. 2015 Jul 9;6(3):547-63.
- [3] Graham A. The use of growth factors in clinical practice. *J Wound Care* 1998;7(10):536-40.
- [4] Limat A, French LE. Therapy with growth factors. *Curr Probl Dermatol* 1999;27:49-56.
- [5] Blakytyn R, Jude EB, Martin Gibson J, Boulton AJ, Ferguson MW *et al*. Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers. *J pathol* 2000;190(5):589-94.
- [6] Niessen FB, Andriessen MP, Schalkwijk J, Visser L, Timens W *et al*. Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *J pathol* 2001;194(2):207-16.
- [7] Efron PA, Moldawer LL. Cytokines and wound healing: the role of cytokine and anticytokine therapy in the repair response. *J Burn Care Rehabil* 2004;25(2):149-60.
- [8] Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- $\beta$  family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma* 2012;2(1):18-28.
- [9] Clark RAF, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 2007;127:1018–29.
- [10] Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci* 2008 Aug;97(8):2892-923.
- [11] Odessey R. Addendum: multicenter experience with cultured epidermal autograft for treatment of burns. *J Burn Care Rehabil* 1992 Jan-Feb;13(1):174-80.
- [12] Morasso MI, Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell* 2005;97:173-183.
- [13] Bickenbach JR, Grinnell KL. Epidermal stem cells: interactions in developmental environments. *Differentiation* 2004; 72: 371-380.
- [14] Chester DL, Balderson DS, Papini RP. A review of keratinocyte delivery to the wound bed. *J Burn Care Rehabil* 2004 May-Jun;25(3):266-75.

- [15] Plettig J, Johnen CM, Bräutigam K, Zeilinger K, Borneman R, Gerlach JC. Active wound dressing with artificial capillaries for temporary wound irrigation and skin cell supply. *Artif Organs* 2012;36(4):446-9.
- [16] Baryza MJ, Baryza GA. The Vancouver Scar Scale: an administration tool and its interrater reliability. *J Burn Care Rehabil* 1995 Sep-Oct;16(5):535-8.
- [17] Schnoor J, Schreck R, Baumert JH, Grosse-Siestrup C, Rossaint R, Unger JK. Influence of differences in body weight and volume management on experimental results in porcine models. *Int J Artif Organs* 2004;27(11):924-34.
- [18] Haacke N, Unger JK, Haidenhein C, Russ, Hiebl B, Niehues SM. Pig specific vascular anatomy allows acute infrarenal aortic occlusion without hind limb ischemia and stepwise occlusion without clinical signs. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011;48(1):173-85.
- [19] Hötten G, Neidhardt H, Jacobowsky B, Pohl J. Cloning and expression of recombinant human growth/differentiation factor 5. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204(2):646-52.
- [20] Kim DS, Korting HC, Schäfer-Korting M. Effects of growth factors on the proliferation of human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Pharmazie* 1998;53(1):51-57.
- [21] Battaglia TC. GDF-5 deficiency alters stress-relaxation properties in mouse skin. *J Dermatol Sci* 2005; 39(3):192-95.
- [22] Yamashita H, Shimizu A, Kato M, Nishitoh H, Ichijo H, Hanyu A *et al.* Growth/differentiation factor-5 induces angiogenesis in vivo. *Exp Cell Res* 1997; 235(1):218-26.
- [23] Kadomatsu H, Matsuyama T, Yoshimoto T, Negishi Y, Sekiya H, Yamamoto M *et al.* Injectable growth/differentiation factor-5-recombinant human collagen composite induces endochondral ossification via Sry-related HMG box 9 (Sox9) expression and angiogenesis in murine calvariae. *J Periodontal Res* 2008;43(5):483-89.
- [24] Sullivan AM, Opacka-Juffry J, Hötten G, Pohl J, Blunt SB. Growth/differentiation factor 5 protects nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1997;233(2-3):73-6.
- [25] Sullivan AM, O'Keeffe GW. The role of growth/differentiation factor 5 (GDF-5) in the induction and survival of midbrain dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease treatment. *J Anat* 2005;207(3):219-26.
- [26] Dadali T, Nishio Y, Hasslund S *et al.* GDF5 gene delivery accelerates wound healing in vitro. *Transactions of 53rd Orthopaedic Research Society Annual Meeting, San Diego, CA; 2007:pp. 1470 (Abstract).*

- [27] Honda J, Andou H, Mannen T, Sugimoto S. Direct refolding of recombinant human growth differentiation factor 5 for large-scale production process. *J Biosci Bioeng* 2000; 89(6):582-9.
- [28] Atiyeh BS, Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns* 2007 Jun;33(4):405-13.
- [29] Fang T, Lineaweaver WC, Sailes FC, Kisner C, Zhang F. Clinical application of cultured epithelial autografts on acellular dermal matrices in the treatment of extended burn injuries. *Ann Plast Surg* 2014 Nov;73(5):509-15.
- [30] Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP. Scarless fetal wound healing: a basic science review. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Oct;126(4):1172-80.
- [31] Hohlfield J, Hirt-Burri N, Gerber S, Scaletta C, Hohlfield P, Applegate LA. Tissue engineered fetal skin constructs for pediatric burns. *Lancet* 2005;366:840-842.
- [32] De Buys, Roessingh, AS, Hohlfield J, Scaletta C, Hirt-Burri N, Gerber S, Hohlfield P, Gebbers JO, Applegate LA. Development, characterization, and use of a fetal skin cell bank for tissue engineering in wound healing. *Cell Transplantation* 2006;15:823-834.
- [33] Cass DL, Meuli A, Adzick NS. Scar wars: implications of fetal wound healing for pediatric burn patients. *Pediatr Surg* 1997;12: 484-89.
- [34] Dang C, Ting K, Soo C, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal wound healing. Current perspectives. *Clin. Plastic Surg*. 2003;30:13-23.
- [35] Ersch J, Stallmach T. Assessing gestational age from histology of fetal skin: an autopsy study of 379 fetuses. *Obstetrics & Gynecology* 1999;Vol 94;No 5, Part 1.
- [36] Quintin A, Hirt-Burri N, Scaletta C, Schizas C, Pioletti DP, Applegate LA. Consistency and safety of cell banks for research and clinical use: preliminary analysis of fetal skin banks. *Cell Transplantation* 2007;16:675-684.
- [37] Crombleholm TM, Langer JC, Harrison MR, Zanjani ED. Transplantation of fetal cells. *AM. J. Obstet. Gynecol* 1991;164:218-230.
- [38] Wood FM, Stoner ML, Fowler BV, Fear MW. The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra dermal regeneration template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: a one-step process. *Burns*. 2007 Sep;33(6):693-700.
- [39] Wood FM, Giles N, Stevenson A, Rea S, Fear M. Characterisation of the cell suspension harvested from the dermal epidermal junction using a ReCell<sup>®</sup> kit. *Burns*. 2012 Feb;38(1):44-51.

- [40] Navarro FA, Stoner ML, Lee HB, Park CS, Wood FM, Orgill DP. Melanocyte repopulation in full-thickness wounds using a cell spray apparatus. *J Burn care Rehabil* 2001 Jan-Feb;22:41-6.
- [41] Navarro FA, Stoner ML, Park CS, Huertas JC, Lee HB, Wood FM, Orgill DP. Sprayed keratinocyte suspensions accelerated epidermal coverage in a porcine microwound model. *J Burn Care Rehabil* 2000 Nov-Dec; 21(6):513-8.
- [42] Hartmann B, Ekkernkamp A, Johnen C, Gerlach JC, Belfekroun C, Küntscher MV. Sprayed cultured epithelial autografts for deep dermal burns of the face and neck. *Ann Plast Surg* 2007; 58(1):70-73.
- [43] Johnen C, Hartmann B, Steffen I, Bräutigam K, Witascheck T, Toman N, Küntscher MV, Gerlach JC. Skin cell isolation and expansion for cell transplantation is limited in patients using tobacco, alcohol, or are exhibiting diabetes mellitus. *Burns* 2006; 32(2): 194-200.
- [44] Schlabe J, Johnen C, Schwartlander R, Moser V, Hartmann B, Gerlach JC, Küntscher MV. Isolation and culture of different epidermal and dermal cell types from human scalp suitable for the development of a therapeutical cell spray. *Burns* 2008 May;34(3):376-84.
- [45] Gravante B, Di Fede MD, Araco A *et al.* A randomized trial comparing ReCell<sup>®</sup> system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns. *Burns* 2007;33(8):966-972.
- [46] Davis K, Bills J, Barker J, Kim P, Lavery L. Simultaneous irrigation and negative pressure wound therapy enhances wound healing and reduces wound bioburden in a porcine model. *Wound Repair Regen* 2013 Nov-Dec;21(6):869-75.
- [47] Murphy PS, Evans GR. Advances in wound healing: a review of current wound healing products. *Plast Surg Int.* 2012:190436.
- [48] Wasiak J, Cleland H, Campbell F, Spinks A. Dressings for superficial and partial thickness burns. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Mar 28;3:CD002106.
- [49] Mayet N, Choonara YE, Kumar P, Tomar LK, Tyagi C, Du Toit LC, Pillay V. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. *J Pharm Sci* 2014 Aug;103(8):2211-30.
- [50] Cabodi M, Cross VL, Qu Z, Havenstrite KL, Schwartz S, Stroock AD. An active wound dressing for controlled convective mass transfer with the wound bed. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;82(1):210-22.

- [51] Singer AJ, Huang SS, Huang JS, McClain SA, Romanov A, Rooney J *et al.* A novel TGF-beta antagonist speeds reepithelialization and reduces scarring of partial thickness porcine burns. *J Burn Care Res* 2009;30(2):329-34.
- [52] Singer AJ, McClain SA. Development of a porcine excisional wound model. *Acad Emerg Med* 2003 Oct;10(10):1029-33.
- [53] Fabi S, Sundaram H. The potential of topical and injectable growth factors and cytokines for skin rejuvenation. *Facial Plast Surg.* 2014 Apr;30(2):157-71.

## ERKLÄRUNG ZU DEN ANTEILEN DES PROMOVENDEN AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN

Jörn Plettig hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

I. *Phenotypical characterization of 6-21-week gestational age human dermis and epidermal cell isolation methods for in vitro studies on epidermal progenitors.*

Johnen C, Chinnici C, Triolo F, **Plettig J**, Bräutigam K, Amico G, Young M, Over P, Esteban-Vives R, Schmelzer E, Conaldi PG, Turner M, Thompson R, Zeilinger K, Rubin P, Vizzini G, Gridelli B, Gerlach JC. Burns. 2013 Mar;39(2):300-10. doi: 10.1016/j.burns.2012.05.025. Epub 2012 Jun 30. **Impact factor 2013: 1.836**

*Anteil des Promovenden: 55 %*

*Beitrag im Einzelnen:* Beteiligung an allen Vor- und Nachbereitungen sowie den durchgeführten Zellkultur-Experimenten. Insbesondere: Literaturrecherche, Testung und Etablierung diverser mechanischer und enzymatischer Zellisolationmethoden, Durchführung der Isolation fötaler und adulter Hautzellen für die Sprühversuche, Durchführung der *In-vitro*-Sprühversuche in Petrischalen, Betreuung der allgemeinen Zellkultur, Probennahme und Auswertung der Zellkultur. Selbstständiges Anfertigen des Manuskripts, insbesondere die Zell- und Sprühversuche, die Statistik, die Figuren und die Tabellen betreffend. Beteiligung an Diskussionen zum Sachverhalt im Autorenkreis. Beteiligung am Revisionsprozess des Manuskripts.

II. *Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells.*

Gerlach JC, Johnen C, Ottomann C, Bräutigam K, **Plettig J**, Belfekroun C, Münch S, Hartmann B. Int J Artif Organs. 2011 Mar;34(3):271-9. Erratum in: Int J Artif Organs. 2014 Feb;37(2):184. Ottoman, Christian [corrected to Ottomann, Christian]. **Impact factor 2011: 1.861**

*Anteil des Promovenden: 45 %*

*Beitrag im Einzelnen:* Beteiligung an allen Nachbereitungen. Insbesondere: Literaturrecherche und Einordnung der Studie gegenüber dem Stand der Technik. Beiträge zur Anfertigung des Manuskripts, insbesondere den Einleitungs-, Ergebnis- und Diskussionsteil betreffend. Beteiligung an Diskussionen zum Sachverhalt im Autorenkreis. Beteiligung am Revisionsprozess des Manuskripts.

III. *Autologous skin cell spray-transplantation for a deep dermal burn patient in an ambulant treatment room setting.*

Gerlach JC, Johnen C, McCoy E, Bräutigam K, **Plettig J**, Corcos A. Burns. 2011 Jun;37(4):e19-23. doi: 10.1016/j.burns.2011.01.022. Epub 2011 Feb 19. **Impact factor 2011: 1.962**

*Anteil des Promovenden: 55 %*

*Beitrag im Einzelnen:* Beteiligung an allen Vor- und Nachbereitungen sowie an der durchgeführten intraoperativen Sprühmethode an einem US-Patienten. Insbesondere: Literaturrecherche, Durchführung der patienteneigenen Isolation von Keratinozyten und Vorbereitung der Sprühtransplantation, Durchführung der *In-vitro*-Kontrollkulturen. Beteiligung an der Auswertung des zwölf-monatigen *Follow-up*. Beteiligung an der Anfertigung des Manuskripts, insbesondere den Einleitungs-, Methoden-, Ergebnis- und Diskussionsteil betreffend. Beteiligung an Diskussionen zum Sachverhalt im Autorenkreis. Beteiligung am Revisionsprozess des Manuskripts.

IV. *Active wound dressing with artificial capillaries for temporary wound irrigation and skin cell supply.*

**Plettig J**, Johnen CM, Bräutigam K, Zeilinger K, Borneman R, Gerlach JC. Artif Organs. 2012 Apr;36(4):446-9. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01363.x. Epub 2011 Nov 11. **Impact factor 2012: 1.964**

*Anteil des Promovenden: 65 %*

*Beitrag im Einzelnen:* Beteiligung an allen Vor- und Nachbereitungen. Insbesondere: Literaturrecherche, Beiträge zur Verfeinerung des Konzepts einer aktiven Wundaufgabe. Selbstständiges Anfertigen des Manuskripts. Beteiligung an Diskussionen zum Sachverhalt im Autorenkreis. Beteiligung am Revisionsprozess des Manuskripts.

V. *Feasibility study of an active wound dressing based on hollow fiber membranes in a porcine wound model.*

**Plettig J**, Johnen CM, Bräutigam K, Knöspel F, Wönne EC, Schubert F, Plöger F, Unger JK, Reutzel-Selke A, Bornemann R, Zeilinger K, Gerlach JC. Burns. 2015 Jun;41(4):778-88. doi: 10.1016/j.burns.2014.09.022. Epub 2014 Oct 18. **Impact factor 2014: 1.836**

*Anteil des Promovenden: 70 %*

*Beitrag im Einzelnen:* Beteiligung an allen Vor- und Nachbereitungen sowie den durchgeführten *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimenten. Insbesondere: Literaturrecherche, Testung und Etablierung eines für die Versuche geeigneten Schweinemodells, Durchführung der Isolation adulter Hautzellen für die rhGDF-5 *In-vitro*-Vorversuche, Beteiligung an den Operationen der Schweine unter Betreuung von PD Dr. Juliane K. Unger, Betreuung der Tierversuche unter Anleitung von PD Dr. Juliane K. Unger, Wechsel der Spüllösungen in den Wunden, Probennahme und Auswertung der *In-vitro*- und *In-vivo*-Versuche, insbesondere die Biopsienahme, die H&E Färbungen und die morphometrischen Messungen der Epidermis und des Granulationsgewebes betreffend. Selbstständiges Anfertigen des Manuskripts, insbesondere die gesamten *In-vitro*- und *In-vivo*-Versuche, die Statistik, die Figuren und die Tabellen betreffend. Beteiligung an Diskussionen zum Sachverhalt im Autorenkreis. Beteiligung am Revisionsprozess des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden

---

## DRUCKEXEMPLARE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN

I. *Phenotypical characterization of 6-21-week gestational age human dermis and epidermal cell isolation methods for in vitro studies on epidermal progenitors.*

Johnen C, Chinnici C, Triolo F, **Plettig J**, Bräutigam K, Amico G, Young M, Over P, Esteban-Vives R, Schmelzer E, Conaldi PG, Turner M, Thompson R, Zeilinger K, Rubin P, Vizzini G, Gridelli B, Gerlach JC. *Burns*. 2013 Mar;39(2):300-10. doi: 10.1016/j.burns.2012.05.025. Epub 2012 Jun 30.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2012.05.025>

II. *Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells.*

Gerlach JC, Johnen C, Ottomann C, Bräutigam K, **Plettig J**, Belfekroun C, Münch S, Hartmann B. Int J Artif Organs. 2011 Mar;34(3):271-9. Erratum in: Int J Artif Organs. 2014 Feb;37(2):184. Ottoman, Christian [corrected to Ottomann, Christian].

<http://dx.doi.org/10.5301/IJAO.2014.12003>

III. *Autologous skin cell spray-transplantation for a deep dermal burn patient in an ambulant treatment room setting.*

Gerlach JC, Johnen C, McCoy E, Bräutigam K, **Plettig J**, Corcos A. Burns. 2011 Jun;37(4):e19-23. doi: 10.1016/j.burns.2011.01.022. Epub 2011 Feb 19.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2011.01.022>

IV. *Active wound dressing with artificial capillaries for temporary wound irrigation and skin cell supply.*

**Plettig J**, Johnen CM, Bräutigam K, Zeilinger K, Borneman R, Gerlach JC. *Artif Organs*. 2012 Apr;36(4):446-9. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01363.x. Epub 2011 Nov 11.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1525-1594.2011.01363.x>

V. *Feasibility study of an active wound dressing based on hollow fiber membranes in a porcine wound model.*

**Plettig J**, Johnen CM, Bräutigam K, Knöspel F, Wönne EC, Schubert F, Plöger F, Unger JK, Reutzel-Selke A, Bornemann R, Zeilinger K, Gerlach JC. *Burns*. 2015 Jun;41(4):778-88. doi: 10.1016/j.burns.2014.09.022. Epub 2014 Oct 18.

Mit angehängten *Supplemental Materials*.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2014.09.022>

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## VOLLSTÄNDIGE PUBLIKATIONSLISTE JÖRN PLETTIG

### Publikationen

Gerlach JC, Johnen C, Ottomann C, Bräutigam K, **Plettig J**, Belfekroun C, Münch S, Hartmann B. Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells. *Int J Artif Organs* 2011 Mar;34(3):271-9. Erratum in: *Int J Artif Organs* 2014 Feb;37(2):184. Ottoman, Christian [corrected to Ottomann, Christian].

Gerlach JC, Johnen C, McCoy E, Bräutigam K, **Plettig J**, Corcos A. Autologous skin cell spray-transplantation for a deep dermal burn patient in an ambulant treatment room setting. *Burns* 2011 Jun;37(4):e19-23.

**Plettig J**, Johnen CM, Bräutigam K, Zeilinger K, Borneman R, Gerlach JC. Active wound dressing with artificial capillaries for temporary wound irrigation and skin cell supply. *Artif Organs* 2012 Apr;36(4):446-9.

Johnen C, Chinnici C, Triolo F, **Plettig J**, Bräutigam K, Amico G, Young M, Over P, Esteban-Vives R, Schmelzer E, Conaldi PG, Turner M, Thompson R, Zeilinger K, Rubin P, Vizzini G, Gridelli B, Gerlach JC. Phenotypical characterization of 6-21-week gestational age human dermis and epidermal cell isolation methods for in vitro studies on epidermal progenitors. *Burns* 2013 Mar;39(2):300-10.

**Plettig J**, Johnen CM, Bräutigam K, Knöspel F, Wönne EC, Schubert F, Plöger F, Unger JK, Reutzel-Selke A, Bornemann R, Zeilinger K, Gerlach JC. *Burns*. Feasibility study of an active wound dressing based on hollow fiber membranes in a porcine wound model. 2015 Jun;41(4):778-88.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Jörn Plettig, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„*In-vitro-* und *In-vivo-*Studien zum Einsatz innovativer Wundversorgungssysteme für Verbrennungspatienten basierend auf einer Sprühtransplantation primär isolierter Hautzellen und einer aktiven Wundaufgabe aus Hohlfaserkapillaren“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der obenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

---

Unterschrift

## DANKSAGUNG

Der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen in meinem Leben nicht möglichen gewesen. Generell möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen bedanken, die mir bei den Forschungsarbeiten mit Rat und Tat zur Seite standen.

Die vielen „stillen“ Helfer aufzuzählen würde den Rahmen dieser Danksagung sprengen, dennoch danke ich Ihnen allen herzlichst.

Darüber hinaus danke ich:

Insbesondere meiner Familie – meinem Sohn und meiner Frau, meiner Mutter und ihrem Lebensgefährten sowie meinen Großeltern – für die jahrelange Unterstützung, die stets offenen Ohren und das immense Durchhaltevermögen. Ihr habt es mit möglich gemacht.

Christa Johnen, Kirsten Bräutigam, Jörg C. Gerlach, Fanny Knöspel, Thomas Bold, der Fa. Stem Cell Systems GmbH und dem gesamten Team der AG für Experimentelle Chirurgie der Charité Campus Virchow-Klinikum für das Fördern und Fordern, die Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten, die jahrelange Unterstützung und die tollen Zeiten neben der Arbeit.

Juliane K. Unger und der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin für die stets motivierende und angenehme Zusammenarbeit unsere Publikation und die vorliegende Dissertation betreffend.

Der Charité Campus Virchow-Klinikum für die langjährige Kooperation und die wissenschaftliche Unterstützung der Arbeitsgruppe in fachlicher und technischer Hinsicht sowie für die Möglichkeit zur Nutzung der Histologie-, Mikrobiologie- und Analyselabore.

Martin Pietsch, Nils Bohmer, Kathrin Wildbrett, Christoph Vahl, Martin Schwentner, Juliane Pasold für die Zeiten, die wir gemeinsam teilten – während und nach der Studienzeit.

\*\*\*