

Dissertation



Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Entwicklung eines *in vitro* Modells für Verbrennungen
ersten Grades zur Testung einer zellbasierten
Wundauflage**

**Development of an *in vitro* model for first degree burn
wounds to test a cell based wound dressing**

Vorgelegt von

**Verena Weigel
(geborene Schneider)**

Ausgeführt am

Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin

Würzburg, 2021



**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin**

Vorgelegt von

Verena Weigel
geb. Schneider

aus

Bad Mergentheim

Eingereicht am: 28.10.2021

Mitglieder des Promotionskomitees

Vorsitzender: Prof. Dr. Christian Janzen

1. Betreuer: Dr. Florian Groeber-Becker

2. Betreuer: Prof. Dr. Markus Engstler

3. Betreuer: Prof. Dr. Gerhard Winter

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

"The imagination of nature is far, far greater than the imagination of man"

Richard P. Feynman

Abstract

With 11 Million yearly cases worldwide, burn wounds still represent a large proportion of injuries requiring treatment in hospitals. While minor burns usually heal without problems, the treatment of deeper burns requires medical intervention to achieve complete healing. Cell-based therapeutics using keratinocytes are already showing great success in this area, but their availability is limited because these products cannot be stored at ambient temperatures for extended periods of time. However, due to the limited transferability of results from animal models, both the testing of new products and the study of wound healing in burn wounds is still difficult.

Therefore, two objectives were pursued in this work: To establish methods to enable the production of a cell-based therapeutic and to develop a model to study burn wounds. First, the cell culture conditions and protocols for the isolation and expansion of keratinocytes were adapted to comply with current regulations for the production of medical products. For this purpose, particular attention was focused on replacing media additives of animal origin with chemically defined alternatives. The cells could be isolated and expanded in this defined media conditions and multiple analysis confirmed that they did not lose characteristic features, such as the ability to form a stratified skin model. In addition, the cells were successfully frozen and preserved in an automated system using various cryoprotective substances. This allows, e.g. by faster cooling rates a later upscaling for larger production quantities.

Moreover, a model was established that reflects first-degree burn wounds. For this, a 3D *in vitro* skin model was wounded, using preheated metal rods, resulting in a thermal burn wound. Over a period of two weeks, the regeneration of the models was investigated with regard to various aspects. These included: Histomorphology, metabolism, secretion of inflammatory factors and the rate of reepithelialization. While the models were unable to achieve complete wound closure, they demonstrated many parallels to wound healing *in vivo*. In addition, to determine the suitability of the models for testing of active ingredients, a treatment with 5% dexpanthenol was performed. It resulted in improved histomorphology and increased numbers of proliferative cells in the models, but failed to accelerate re-epithelialization. In summary, this work established methods and protocols to produce and characterize a medical product consisting of keratinocytes. Furthermore, a model was developed which can be used to study wound healing and treatment of first degree burns and which can serve as a basis for the development of models of deeper burns.

Zusammenfassung

Mit jährlich circa 11 Millionen Fällen weltweit, stellen schwere Brandwunden bis heute einen großen Anteil an Verletzungen dar, die in Kliniken behandelt werden müssen. Während leichte Verbrennungen meist problemlos heilen, bedarf die Behandlung tieferer Verbrennungen medizinischer Intervention, um eine vollständige Heilung zu erzielen. Zellbasierte Therapeutika mit Keratinozyten zeigen hier bereits große Erfolge, jedoch ist ihre Verfügbarkeit stark eingeschränkt, da diese Produkte nicht über längere Zeiträume bei milden Temperaturen gelagert werden können. Aufgrund der eingeschränkten Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tiermodellen ist aber sowohl die Testung neuer Produkte, als auch die Erforschung der Wundheilung bei Brandwunden noch immer schwierig.

Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit zwei Ziele verfolgt: Die Etablierung von Methoden, um ein zellbasiertes Therapeutikum produzieren zu können und die Entwicklung eines Modells zur Untersuchung von Verbrennungswunden. Zunächst wurden hierfür die Zellkulturbedingungen und -protokolle zur Isolation und Expansion von Keratinozyten so angepasst, dass sie gängigen Regularien zur Produktion medizinischer Produkte entsprechen. Hierfür wurde vor allem darauf geachtet, Medienzusätze mit tierischem Ursprung durch chemisch definierte Alternativen zu ersetzen. Die Zellen konnten so isoliert und expandiert werden und zeigten in anschließenden Analysen, dass sie charakteristische Merkmale, wie die Fähigkeit ein stratifiziertes Hautmodell zu bilden, nicht verloren. Darüber hinaus gelang es, die Zellen mithilfe verschiedener protektiver Substanzen in einem automatisierten System erfolgreich einzufrieren und zu konservieren. Dies erlaubt, z.B. durch schnellere Kühlraten, eine spätere Hochskalierung.

Des Weiteren konnte ein Modell etabliert werden, das eine Verbrennung ersten Grades widerspiegelt. Hierfür wurde ein 3D *in vitro* Hautmodell mithilfe eines erhitzten Metallstabs verwundet, was zu einer thermischen Verbrennung führte. Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurde die Regeneration der Modelle hinsichtlich verschiedener Aspekte untersucht. Hierzu gehörten unter anderem: Histomorphologie, Metabolismus, Sekretion inflammatorischer Faktoren und die Reepithelialisierungsrate. Die Modelle konnten zwar keinen kompletten Wundschluss erreichen, zeigten jedoch viele Parallelen zur Wundheilung *in vivo* auf. Um die Eignung der Modelle zur Testung von Wirkstoffen zu ermitteln wurde außerdem eine Behandlung mit 5% Dexpanthenol getestet. Sie resultierte in einer verbesserten Histomorphologie und einer erhöhten Anzahl an proliferativen Zellen in den Modellen, beschleunigte jedoch die Reepithelialisierung nicht. Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit zum einen

Methoden etabliert werden, um ein medizinisches Produkt aus Keratinozyten herzustellen und zu charakterisieren. Zum anderen wurde ein Modell entwickelt, anhand dessen die Wundheilung und Behandlung von Verbrennungen ersten Grades untersucht werden kann und welches als Basis zur Entwicklung von Modellen von tieferen Verbrennungen dienen kann.

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT.....	V
ZUSAMMENFASSUNG	VI
INHALTSVERZEICHNIS	IX
LISTE DER VERÖFFENTLICHTEN WISSENSCHAFTLICHEN ARBEITEN.....	XI
LISTE DER ABBILDUNGEN	XII
LISTE DER TABELLEN.....	XIII
LISTE DER ABKÜRZUNGEN	XIV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 ANATOMIE DER HUMANEN HAUT UND MECHANISMUS DER WUNDHEILUNG	1
1.1.1 KLASSTIFIZIERUNG VON BRANDWUNDEN	4
1.1.2 BEHANDLUNG VON BRANDWUNDEN IN DER KLINIK.....	6
1.2 GRUNDLAGEN DER ZELL- UND GEWEBEKONSERVIERUNG.....	10
1.2.1 STRATEGIEN DER KONSERVIERUNG	10
1.2.2 HERAUSFORDERUNGEN BEI DER KRYOKONSERVIERUNG.....	11
1.2.3 ERFORSCHUNG VON BRANDWUNDEN UND PRÄKLINISCHE TESTUNG VON WUNDAUFLAGEN	13
2 ZIELSETZUNG.....	16
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 MATERIAL.....	17
3.2 METHODEN.....	27
4 ERGEBNISSE	37
4.1 ENTWICKLUNG EINES ZELLBASIERTEN THERAPEUTIKUMS	37
4.1.1 ETABLIERUNG VON METHODEN ZUR SERUMFREIEN ISOLATION UND KULTIVIERUNG VON KERATINOZYTEN.....	37
4.1.2 KRYOKONSERVIERUNG DES ZELLMATERIALS	46
4.1.3 KONTROLLIERTES EINFRIEREN VON ZELLEN IN SUSPENSION UND ALS ADHÄRENTER ZELLRASEN .	47
4.2 ETABLIERUNG EINES IN VITRO VERBRENNUNGSMODELLS.....	52
4.2.1 ETABLIERUNG EINES STANDARDISIERTEN VERFAHRENS ZUR THERMALEN VERWUNDUNG VON EPIDERMALEN MODELLEN	52
4.2.2 UNTERSUCHUNG DER REEPITHELIALISIERUNG VON BRANDVERLETZUNGEN AN HAUTÄQUIVALENTEN	54

4.2.3	PROOF OF CONCEPT TESTUNG EINES LYOPHILISIERTEN PRODUKTES.....	68
4.2.4	VORARBEITEN ZUR UNTERSUCHUNG VON VERBRENNUNGEN DER GRADE IIA UND IIB.....	69
5	DISKUSSION.....	71
5.1	KULTURBEDINGUNGEN FÜR KERATINOZYTEN ALS ATMP.....	72
5.2	KONSERVIERUNG VON KERATINOZYTEN FÜR EINE LANGFRISTIGE LAGERUNG	77
5.3	UNTERSUCHUNG VON VERBRENNUNGSWUNDEN AN <i>IN VITRO</i> MODELLEN	81
6	FAZIT UND AUSBLICK	87
7	REFERENCES	88
8	APPENDIX.....	102
8.1	SUPPLEMENTÄRE DATEN	102
8.2	DANKSAGUNGEN	104
8.3	AFFIDATIV	106
8.4	PUBLIKATIONSLISTE.....	107
8.5	CURRICULUM VITAE.....	108

Liste der veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten

Schneider V. et al., „A 3D in vitro model for burn wounds: Monitoring of regeneration on the epidermal level“ 2021, MDPI – Biomedicines.

Teile dieser Publikation sind in veränderter oder gleicher Form in den Kapiteln 4.2, 5.3, und 6 in dieser Dissertation dargestellt.

Die Publikation ist in einer Open Access Zeitschrift mit Creative Commons-BY Lizenz publiziert. Die Lizenzvereinbarung „Creative Commons Attribution 4.0 International“ (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) ermöglicht die Verwendung, die Adaption, die Verteilung und die Reproduktion der veröffentlichten Arbeit in jeglicher Form und in jeglichem Format.

Im Zuge dieser Dissertation wurden mehrere Studenten betreut, die ihre Masterthesen unter den folgenden Titeln anfertigten:

1. „Entwicklung von standardisierten Methoden zur Charakterisierung und Langzeit Konservierung von humanen in vitro 3D Hautäquivalenten“ Elvan Akyürek, 2019

Teile dieser Masterarbeit sind in veränderter oder gleicher Form in Kapitel 4.1.1 (Abbildung 10) dargestellt.

2. „Development of a human in vitro burn wound model: generation of first-to-third degree burns in full-thickness skin equivalents“ Saskia Zöphel, 2021

Teile dieser Masterarbeit sind in veränderter oder gleicher Form in Kapitel 4.2.4 (Abbildung 28) dargestellt

Liste der Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau der humanen Haut.	2
Abbildung 2: Übersicht der kutanen Wundheilung	4
Abbildung 3: Verbrennungsgrade von Brandwunden.....	6
Abbildung 4: Zonen von Verbrennungswunden.....	8
Abbildung 5: Isolation von Keratinozyten aus adulter Haut.....	39
Abbildung 6: Kultur von Zellen in serumhaltigen und –freien Konditionen.	40
Abbildung 7: Viabilität und Barriereeigenschaft von Modellen nach Vorkultur in BPE-haltigen und chemisch definierten Konditionen.	42
Abbildung 8: Hämatoxylin und Eosin Färbung von Modellen nach Vorkultur in BPE-haltigen und chemisch definierten Konditionen.	44
Abbildung 9: Bewertung der histologischen Färbung mittels BSGC Score.	45
Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der Zellen.	46
Abbildung 11: Verwendete Kühlraten für die Kryokonservierung von Zellen in Suspension und adhärenzte Zellen.	47
Abbildung 12: Kryokonservierung von Zellen in Suspension.	49
Abbildung 13: Kryokonservierung von adhärenzten Zellen.	51
Abbildung 14: Verwundung von Modellen mittels eines Lötstabs.	53
Abbildung 15: Verbrennung von Modellen mit verschiedenen Temperaturen und Anwendungsdauer.	54
Abbildung 16: Setzen von Verbrennungswunden in rekonstruierter humaner Epidermis und Analyse der Viabilität.....	55
Abbildung 17: Abnahme der Wundfläche mit zunehmender Regenerationszeit.....	56
Abbildung 18: Histologische Beurteilung der Wundheilung.....	57
Abbildung 19: Bewertung der Modelle mittels BSGC Score.	58
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung physiologischer Strukturen der Modelle nach Verbrennung und Regeneration.	59
Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung nekrotischer Zellen in Modellen.	61
Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung proliferierender Zellen in Modellen.....	62
Abbildung 23: Ki67 Färbung und Analyse Ki67 positiver Zellen in den Modellen.	63
Abbildung 24: Einfluss von Verbrennungswunden auf die Hautbarriere und LDH Sekretion und metabolische Unterschiede in Modellen.....	64
Abbildung 25: Metabolische Unterschiede in Modellen nach Verbrennung.	66
Abbildung 26: Messung von Entzündungsmarkern im Kulturüberstand verbrannter Modelle.	68
Abbildung 27: Testung eines lyophilisierten Produktes an verbrannten Hautäquivalenten.....	69
Abbildung 28: Abbildung aller Verbrennungsgrade in Vollhautmodellen.	70
Supplementäre Abbildung 1: Kryokonservierung von adhärenzten Zellen (Donor 2).	102
Supplementäre Abbildung 2: Kryokonservierung von adhärenzten Zellen (Donor 3).	103

Liste der Tabellen

Tabelle 1: Liste der Ausstattung.....	17
Tabelle 2: Liste der Einwegartikel.....	19
Tabelle 3: Liste der Labormaterialien.....	20
Tabelle 4: Liste der Chemikalien und Lösungen.	21
Tabelle 5: Liste der Medien und Lösungen für die Zellkultur.	23
Tabelle 6: Liste der Chemikalien und Lösungen für die Histologie, Immunhistochemie und Durchflusszytometrie.	24
Tabelle 7: Liste der Antikörper.	25
Tabelle 8: Liste der verwendeten Programme.	26
Tabelle 9: Protokoll 1: langsames Einfrieren.	29
Tabelle 10: Protokoll 2: medium Einfrieren.	29
Tabelle 11: Protokoll 3: schnelles Einfrieren.	29
Tabelle 12: Programm zur Paraffineinbettung.	31
Tabelle 13: Programm zur Deparaffinierung und Rehydrierung.	32
Tabelle 14: Protokoll HE Färbung.	32
Tabelle 15: Protokoll Immunofluoreszenzfärbung.	33

Liste der Abkürzungen

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
3R Prinzip	Reduction, Refinement, Replacement Prinzip
AcetylCoA	Acetyl-Coenzym A
ALI	Air Liquid Interface/ Luft Flüssigkeits Grenzfläche
ATMP	Advanced Therapy Medicinal Product(s)
ATP	Adenosintriphosphat
BPE	Bovines Hypophysenextrakt
BSA	Burn surface area/ Wundfläche
BSGC Score	Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum corneum Score
ca.	Circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CHE	Schweiz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPA	Kryoprotektive Substanz
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EMA	European Medicines Agency
Et al.	et aliae
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zell Sortierung
FCS	Fötale Kälberserum
FDA/PI	Fluorescein-Diacetat/Propidiumiodid
FDA	Food and Drug Administration
GER	Germany
GMP	Good Manufacturing Practice
GNL	Gelneutralisationslösung
hDF	Humane dermale Fibroblasten
HE	Hämatoxylin-Eosin
hEK(s)	Humane epitheliale Keratinozyten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES	Hydroxyethylstärke

IIF	Intracellular Ice Formation
IL	Interleukin
JPN	Japan
K1/10/14	Keratin 1/10/14
LDH	Laktatdehydrogenase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
OD	Optische Dichte
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
OS-REp	Rekonstruierte humane Epidermis (Modelle)
SD	Standardabweichung
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF	Transforming growth factor
USA	United States of America
US Dollar	Amerikanischer Dollar
VEGF	Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

1 Einleitung

Die Haut ist mit einer durchschnittlichen Fläche von etwa 2 m² eines der größten Organe des Menschen. Sie stellt die äußerste Barriere des Körpers zu unserer Umwelt dar und dient neben der Regulation des Wasserhaushalts und der Sensorik auch dem Schutz vor mannigfaltigen Einflüssen wie Strahlung, Chemikalien, Kosmetik, Mikroorganismen und Hitze ¹.

Um diese Aufgaben zu erfüllen, ist es essentiell, dass bei Verletzung dieser Barriere ein schneller Wundschluss und eine komplette Heilung erfolgt. In der überwiegenden Mehrheit aller Fälle gelingt dies dem menschlichen Körper ohne zusätzliche Hilfe. Jedoch gibt es auch besondere Wunden, bei denen ohne äußeres Eingreifen keine oder nur eine unzureichende Heilung erfolgt. Solche Fälle treten vor allem dann auf, wenn die Wunde eine bestimmte Tiefe und/oder Größe überschreitet, oder andere Komplikationen, wie Infektionen, auftreten ²⁻⁴.

1.1 Anatomie der humanen Haut und Mechanismus der Wundheilung

Die menschliche Haut kann in drei Schichten unterteilt werden: die Epidermis, Dermis und Subcutis (Abbildung 1) ⁴. Die unterste Schicht, die **Subcutis**, besteht hauptsächlich aus Fett- und Bindegewebe und dient u.a. dem Schutz vor Kälte ⁵.

Darüber liegt die **Dermis**, welche durch viele bewegliche Fasern (vor allem Kollagen Typ I und Typ III) die mechanische Belastbarkeit und Elastizität der Haut ausmacht ^{5,6}. In dieser Hautschicht findet man vor allem Fibroblasten, jedoch auch die sogenannten Hautanhangsgebilde, wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen und Nervenfasern ^{4,7}. In der Dermis sind auch die Blutgefäße eingebettet, welche die Epidermis mit Nährstoffen versorgen, da diese selbst keine Vaskularisierung besitzt ^{8,9}.

Die oberste Hautschicht ist die **Epidermis**, ein 0,4 bis 1,5 mm dickes, verhornendes Plattenepithel, das fast ausschließlich aus Keratinozyten (hEKs) besteht und selbst auch wieder in verschiedene Schichten, sogenannte Strata, eingeteilt werden kann (Abbildung 1) ⁵. Von innen nach außen kann man sie folgendermaßen unterteilen: Die Basalschicht (Stratum basale) stellt die Grenzschicht zur Dermis dar. Sie enthält Melanozyten, die für die Pigmentierung der Haut verantwortlich sind, und undifferenzierte Keratinozyten, die von hier aus durch einen Prozess der Teilung und terminalen Differenzierung die restlichen Strata ausbilden ⁴. Mit Beginn dieses Prozesses wandern die Zellen aus der Basalschicht nach oben aus in die Stachelzellschicht (Stratum spinosum) und die Körnerschicht (Stratum granulosum). Während der Differenzierung flachen die Zellen

immer mehr ab und verlieren ihren Zellkern, bis sie komplett verhornen und somit die abschließende Hornschicht, das Stratum corneum, bilden. Die Hornschicht ist die äußerste Schicht der Epidermis und besteht komplett aus abgestorbenen Keratinozyten, die eine effektive Schutzbarriere bilden ^{4,10}.

Die Bildung der Epidermis ist ein kontinuierlicher Prozess, der dazu führt, dass abgestorbene Zellen der Hornschicht regelmäßig abschuppen. So erneuert sich die humane Epidermis im Laufe von ca. vier Wochen komplett ¹¹.

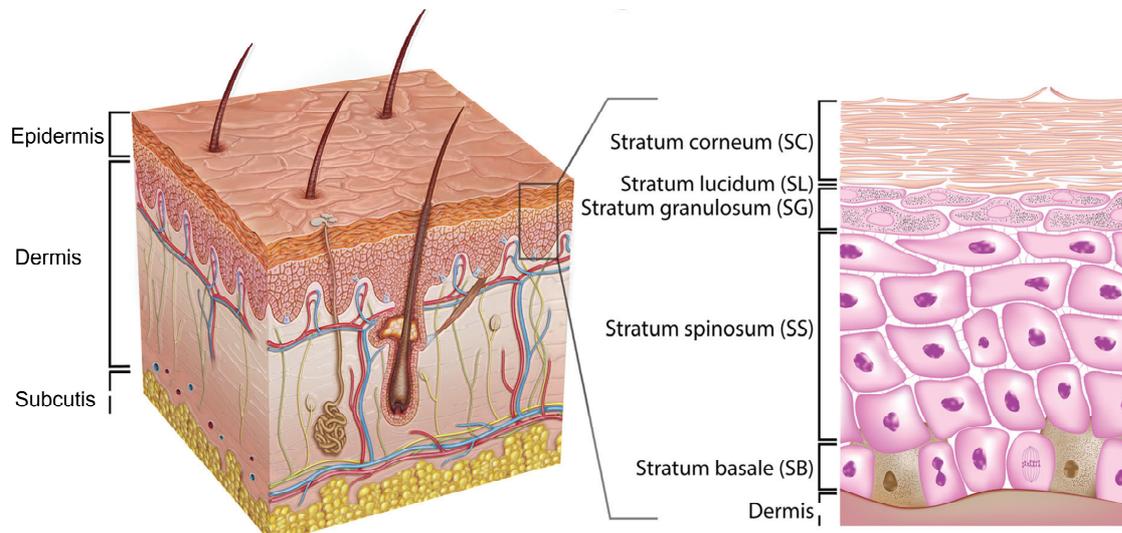


Abbildung 1: Aufbau der humanen Haut.

Die Haut besteht aus Epidermis, Dermis und Subcutis. Die Epidermis ist wiederum aus den strata basale (SB), spinosum (SS), granulosum (SG) und corneum (SC) aufgebaut. Abbildung adaptiert von ¹² mit Erlaubnis von ¹³.

Wird die Hautbarriere durch eine Verletzung beschädigt, setzt automatisch die Wundheilung ein. Sie ist ein hoch komplexer Prozess, der bis heute noch nicht vollständig verstanden wurde und noch immer Gegenstand der Forschung ist ¹⁴. Hierbei ist zu beachten, dass neben den Zellen der Haut auch das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt. Generell kann die Wundheilung in verschiedene Phasen gegliedert werden, die nacheinander, aber zum Teil auch überlappend stattfinden: Hämostase, Entzündungsphase, Proliferationsphase und Maturation/Remodellierung ³ (Abbildung 2).

Da bei einer Wunde meist auch Blutgefäße zerstört werden, ist der erste Schritt die **Hämostase**. Sie beinhaltet die Kontraktion vaskulärer Muskelzellen und die Bildung eines Fibringerinnsels, das die Wunde verschließt und später als Matrix für einwandernde Zellen dient ¹⁵.

Bereits innerhalb der ersten Stunden nach Verwundung beginnt die zweite Phase der Wundheilung, die **Entzündungsphase**. In diesem Stadium spielt das angeborene Immunsystem eine große Rolle, welches durch sekretierte Faktoren, wie Chemoattraktoren, aktiviert wird¹⁶. Zunächst migrieren Neutrophile in die Wunde, um dort Bakterien zu zerstören und Fremdkörper, sowie zerstörtes Gewebe abzubauen¹⁷. Danach wandern Monozyten in den Wundbereich ein, die zu Makrophagen differenzieren¹⁶. Sie übernehmen die gleichen Aufgaben wie Neutrophile, jedoch haben sie eine längere Lebensspanne und sind in der Lage, die nächste Phase der Wundheilung, die Proliferation, einzuleiten. Außerdem sekretieren Makrophagen eine Vielzahl an verschiedenen Wachstumsfaktoren und Chemokinen, die Zellen zur Migration und Proliferation stimulieren. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem VEGF^{18–20}, Interleukin 1 und 6^{21–23}, transforming growth factor α und β (TGF)^{21,24,25}, epidermal growth factor (EGF)^{21,24–27} und viele mehr. Die Ausschüttung dieser Faktoren führt dazu, dass die Zellen der umliegenden Gewebe, also Keratinozyten, Fibroblasten (hDFs) und Endothelzellen, stimuliert werden¹⁶.

Durch die Aktivierung der umliegenden Zellen wird die dritte Phase der Wundheilung, die **Proliferation**, initiiert. Zunächst migrieren Fibroblasten in das Wundbett, wo sie beginnen neue dermale Matrix zu synthetisieren und das Fibringerinnsel dadurch zu ersetzen^{16,21}. Gleichzeitig bilden die rekrutierten Endothelzellen Kapillaren, die vom Wundrand aus in den Defekt einwachsen und so die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff wiederherstellen^{15,21}. Um möglichst schnell einen Wundschluss zu erreichen und die Barriere der Haut wiederherzustellen, beginnen auch Keratinozyten bereits kurz nach Verwundung zu proliferieren und in den Defekt zu migrieren.

Wie genau dieser Wundschluss durch die Keratinozyten erfolgt, ist jedoch bis heute umstritten und es gibt mehrere Theorien, welche mögliche Mechanismen der epidermalen Migration in Wunden beschreiben. Die erste Theorie beschreibt die Dedifferenzierung suprabasaler hEKs, die dann über die Zellen der Basalschicht „rollen“ und so den Wundschluss anführen²⁸. In einer anderen Hypothese wird davon ausgegangen, dass die basalen Keratinozyten selbst die Spitze der Wundzunge bilden²⁹. Im Jahr 2005 wurde eine weitere Theorie veröffentlicht, die eine Kombination aus den beiden bereits bekannten Mechanismen beschreibt. Sie besagt, dass die Wundzunge zwar von dedifferenzierten, suprabasalen Keratinozyten angeführt wird, jedoch auch basale Zellen dort zu finden sind³⁰. Die neueste Hypothese zur Reepithelialisierung wurde 2013 von Safferling et al. publiziert. Sie beschreibt den Wundschluss durch den „extending shield“ Mechanismus, bei dem die Migration in die

Wunde zwar ausschließlich von den basalen Zellen ausgeht, sich jedoch auch zeitnah suprabasales Gewebe über der fortschreitenden Spitze der Wundzunge bildet ³¹.

Nach Beendigung der Proliferationsphase beginnt die finale Phase der Wundheilung, die **Maturation** oder **Remodellierung** der Wunde. Sie ist die längste Phase der Wundheilung und kann mehrere Jahre in Anspruch nehmen ¹⁵. In dieser Zeit werden letzte Überreste des Fibringerinnsels in der Wunde degeneriert und die extrazelluläre Matrix auf- und umgebaut, wodurch eine Narbe entsteht ²¹.

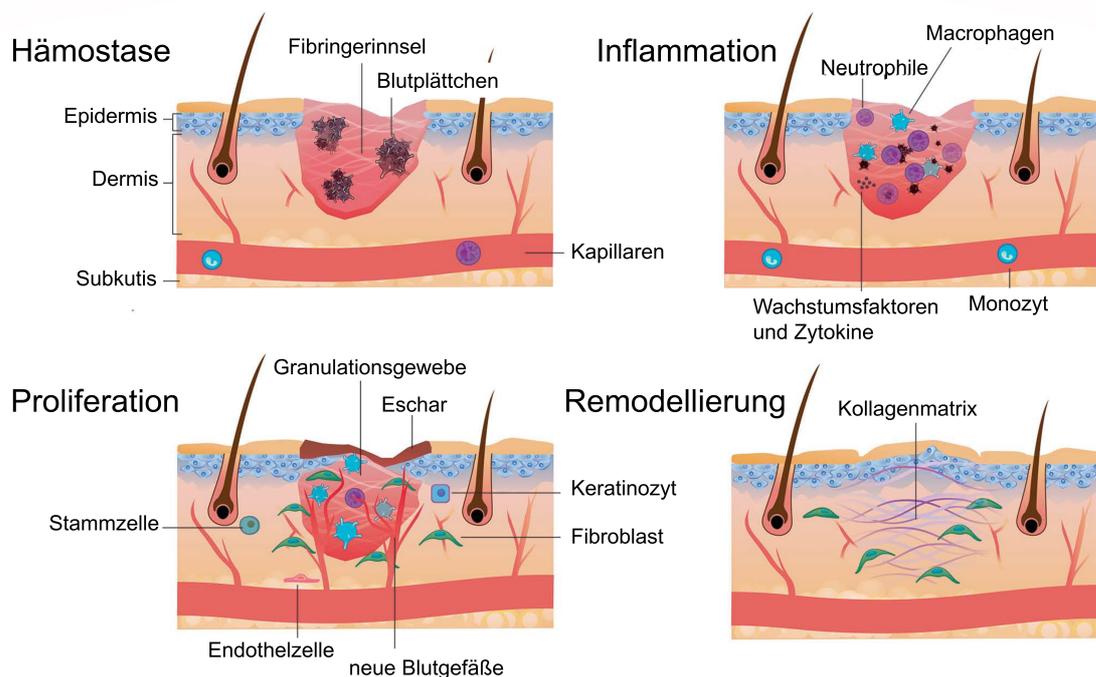


Abbildung 2: Übersicht der kutanen Wundheilung.

Die kutane Wundheilung gliedert sich in vier Phasen. Nach Verwundung beginnt die Hämostase, gefolgt von der Entzündungsphase. Mit der Proliferationsphase beginnt der Wundschluss. Während der Remodellierungsphase wird die gebildete Kollagenmatrix von Fibroblasten verändert und es kann zur Narbenbildung kommen. Adaptiert von ³² und nachgedruckt mit Erlaubnis der American Association for the Advancement of Science AAAS.

1.1.1 Klassifizierung von Brandwunden

Obwohl sich ihr Heilungsmechanismus nicht grundlegend unterscheidet, stellen Brandwunden eine besondere Art der Verletzung dar, die einige individuelle Aspekte mit sich bringen.

Grundsätzlich lassen sich Verbrennungen anhand ihrer Tiefe in vier Schweregrade einteilen (Abbildung 3). Leichte, oberflächliche Verbrennungen, die nur die Epidermis betreffen, werden als Verbrennungen **ersten Grades (Grad I)** bezeichnet und zeichnen

sich durch ein Ödem und Erythem aus. Es kommt zwar zu lokalen Schmerzen, jedoch ist die Barriere der Haut nicht beeinträchtigt. Es bildet sich außerdem keine Blase und die Wunde heilt innerhalb von zwei Wochen, meist ohne Narbenbildung, ab ^{4,33-35}.

Verbrennungen **zweiten Grades (Grad IIa/ IIb)** können unterteilt werden in Schweregrad **IIa** und **IIb**, je nachdem, wie tief die Wunde in das dermale Gewebe hineinreicht. Bei oberflächlich dermalen Verwundungen bis hin zur papillaren Dermis spricht man von Typ IIa, wobei hier beginnende Blasenbildung, ein Verlust der Hautbarriere und eine Entzündungsreaktion zu den zusätzlichen Symptomen zählen. Bei tiefen Verbrennungen bis in die retikuläre Dermis (Typ IIb) kommt die Verwundung der sensorischen Nervenenden hinzu, jedoch kein Verlust des Schmerzempfindens ³³⁻³⁵. Die Reepithelialisierung dieser Verbrennungen beginnt bereits wenige Stunden nach der Verwundung. Sind die Wunden jedoch zu tief, oder ihr Durchmesser überschreitet 1 cm, ist ein Debridement der Verbrennung angebracht ³⁶, welches in einem späteren Abschnitt genauer beschrieben wird. Anschließend ist eine Hauttransplantation möglich, um Kontrakturen und Narbenbildung während der Wundheilung entgegen zu wirken ^{4,34,37,38}.

Sobald Brandwunden sich über die komplette Dicke von Epidermis und Dermis bis hin zur Subcutis erstrecken, spricht man von Verbrennungen **dritten Grades (Typ III)**. Reichen sie in noch tiefer liegende Gewebe, wie Muskeln, handelt es sich um Verbrennungen vierten Grades (**Typ IV**). Diese Wunden bilden keine charakteristischen Blasen mehr, sondern äußern sich in einem sehr trockenen, dunklen Erscheinungsbild. Da hier auch irreversible Nervenschädigungen vorliegen, spüren Patienten keine Schmerzen mehr ^{39,40}.

Neben der Verbrennungstiefe spielen natürlich auch andere Faktoren, wie die Wundfläche, die körperliche Verfassung der Patienten und die Art der Behandlung eine wichtige Rolle bei der Heilung von Brandwunden. Im Vergleich zu anderen kutanen Verletzungen können schwere Verbrennungen aufgrund der starken Beteiligung des Immunsystems auch systemische Schäden, bis hin zum Tod, hervorrufen ^{41,42}. Wichtige Faktoren hierbei sind z.B. Interleukin 6, 8 und 1 β , die mit zunehmender Wundfläche stärker sekretiert werden ⁴. Durch die starke Regulation des Immunsystems werden auch Hitzeschockproteine und andere Botenstoffe und Wachstumsfaktoren überexprimiert. Dies kann wiederum zu einer Abnahme der Apoptose und einer verlängerten Entzündungsphase in der Wundheilung führen ⁴³⁻⁴⁵.

Darüber hinaus gehen Verbrennungsverletzungen selbst nach ihrer Heilung noch mit einer Zunahme der psychosozialen Probleme von Patienten aufgrund von Funktionsverlust und Narbenbildung einher ⁴⁶.

Da Verbrennungen neben vielen Parallelen auch diverse Aspekte aufweisen, die nicht mit „normalen“ Wunden der Haut verglichen werden können, ist es wichtig, auch in der Forschung und Entwicklung diese Art von Wunden separat zu betrachten und zu untersuchen.

Verbrennungsgrade

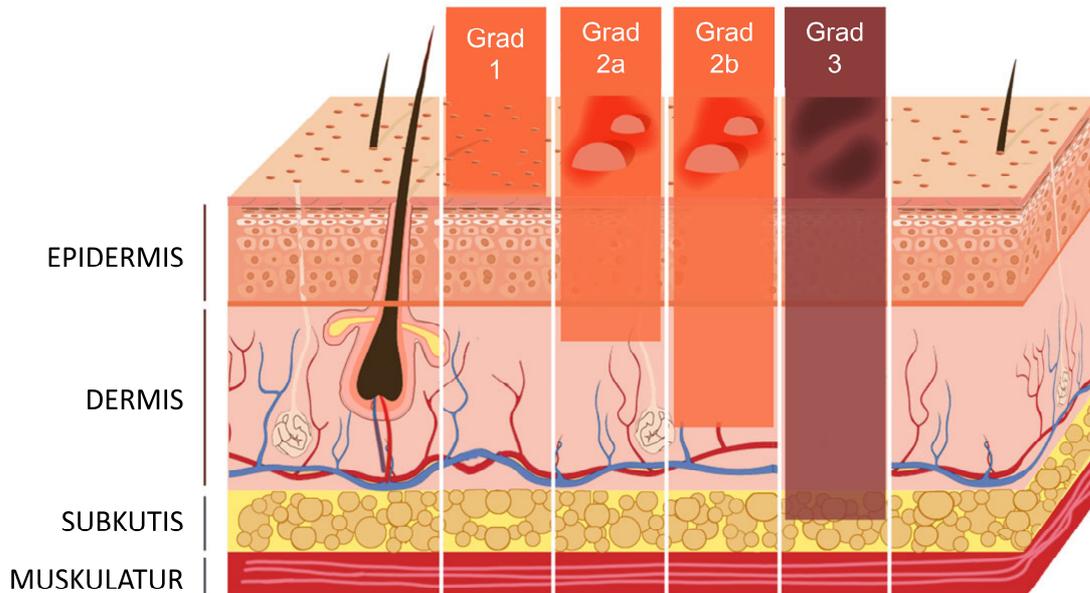


Abbildung 3: Verbrennungsgrade von Brandwunden.

Schematische Darstellung der verschiedenen Verbrennungstiefen von Brandwunden. Je nach Tiefe können diese Wunden zwischen Grad 1 und Grad 3 klassifiziert werden. Abbildung wurde adaptiert von ⁴⁷.

1.1.2 Behandlung von Brandwunden in der Klinik

Jährlich erleiden etwa 11 Millionen Menschen schwere Brandverletzungen ⁴⁸. Die Sterblichkeitsrate von Brandverletzten ist zwar kontinuierlich gesunken und die Behandlungsmöglichkeiten wurden verbessert ⁴⁹, trotzdem sind die Fallzahlen noch immer hoch ⁵⁰. Alleine in Deutschland werden jährlich zwischen 10.000 und 15.000 Patienten aufgrund von Verbrennungen stationär aufgenommen, wovon im Jahr 2005 fast 500 verstarben ⁵¹. Außerdem ist die Behandlung dieser Patienten mit über 71 Millionen Euro jährlich sehr kostspielig ⁵², unter anderem, da Patienten sehr lange im Krankenhaus behandelt werden müssen, bevor eine Entlassung möglich ist ⁵³. Die Behandlung erfolgt außerdem oft in Kliniken, die sich auf Brandwunden spezialisiert haben, da die Versorgung von großen und tiefen Verbrennungen sehr anspruchsvoll und mit vielen Schwierigkeiten verbunden ist.

Bei der initialen Versorgung von Patienten muss zunächst die Größe und Tiefe der Wunde möglichst genau abgeschätzt werden, um entsprechend intravenös Flüssigkeit zu verabreichen. Denn durch die Zerstörung der Hautbarriere und der Bildung von Ödemen kommt es zu einem hohen Wasserverlust, der zum Schock führen kann⁵⁴. Bei einer Verbrennung bilden sich, zusätzlich zur Tiefe der Wunde, drei Zonen über die Fläche der Verletzung (Abbildung 4). Im Zentrum der Wunde befindet sich die **Koagulationszone**, die aus totem Gewebe besteht⁵⁵. An den Wundrändern findet man hingegen die **Zone der Hyperämie**, die zwar eine Vasodilatation und entzündliche Vorgänge aufweist, aber keine strukturellen Schäden durch die Verbrennung erlitten hat⁵⁶. Die kritischste Region ist jedoch das Gewebe, das sich zwischen diesen zwei Bereichen befindet, die sogenannte **Zone der Stasis**. Meist finden sich dort Verletzungen zwischen mittlerer und tiefer dermaler Tiefe. Im schlimmsten Fall kann das Gewebe in diesem Bereich absterben, was zu einer zusätzlichen Vergrößerung der Wundfläche mit voller Tiefe führen würde⁵⁶. Um dies zu verhindern und eine optimale Wundheilung zu erreichen, ist es wichtig, möglichst schnell operativ einzugreifen und das Gewebe in der Zone der Stasis zu retten, indem totes Gewebe aus der Koagulationszone abgetragen wird⁵⁷. Das sogenannte Debridement kann mit verschiedenen Techniken durchgeführt werden, die entweder auf mechanischen⁵⁸ oder enzymatischen⁵⁹ Grundlagen beruhen. Durch die Abtragung des toten Gewebes gelangen weniger Produkte nekrotischer und apoptotischer Zellen in das Wundbett und die Entzündungsreaktion kann gemindert werden. So kann als nächster Schritt versucht werden, die Wunde zu schließen und das fehlende Gewebe zu ersetzen bzw. zu regenerieren⁶⁰.

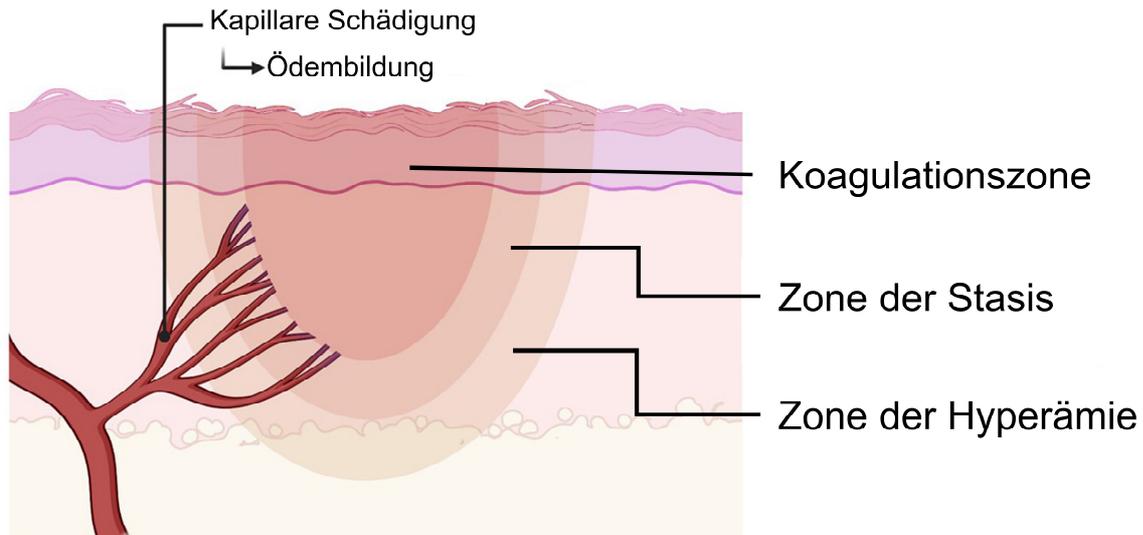


Abbildung 4: Zonen von Verbrennungswunden.

Verbrennungen können von innen nach außen in drei Zonen eingeteilt werden: Die Koagulationszone, die Zone der Stasis und die Zone der Hyperämie. Abbildung adaptiert von ⁵⁵.

Nach der akuten Wundversorgung gibt es viele Methoden und Produkte, die verwendet werden können, um eine möglichst narbenfreie und funktionale Wundheilung zu unterstützen.

Eine optimale Kompatibilität erreicht man mit autologem Material bei der Transplantation von Voll- oder Spalthaut. Diese kann entweder als ganzes Stück eingesetzt werden, oder zur Vergrößerung der Oberfläche als Netz ⁶⁰. Diese Option besteht jedoch nur, wenn der Patient stabil genug für den Eingriff ist und genug Fläche zur Entnahme der Donorhaut vorhanden ist ⁶¹.

Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung verschiedener **Matrizes**, die epidermal, dermal oder epidermal/dermal verfügbar sind. **Azelluläre** Varianten bestehen hier meist aus Kollagen oder anderen Materialien, die die Dermis nachahmen, und können sowohl synthetisch hergestellt werden, als auch biologischen Ursprung haben (z.B. dezellularisiertes Gewebe). Wichtig hierbei ist, dass die Matrix biologisch abbaubar und permeabel ist und die Wunde mechanisch unterstützt ⁶². Die meisten **zellbasierten Therapieansätze** werden heutzutage auch in Form einer Wundauflage angeboten, in die Zellen eingebettet sind ⁴. Hier finden vor allem Zelltypen Anwendung, die in der nativen Haut ihren Ursprung haben, wie Keratinozyten ^{63–66} und Fibroblasten ^{63,64,67–71}. Fibroblasten fungieren hier zum einen als Zellen, die Kollagen und andere Komponenten der extrazellulären Matrix synthetisieren. Zum anderen fördern sie die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten durch die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren ⁷². Keratinozyten hingegen stellen den am stärksten vertretenen

Zelltyp in der Epidermis dar und führen durch die Proliferation und Differenzierung (und die damit verbundene Ausbildung intrazellulärer tight junctions) vor allem zum Wundschluss und somit zum Schutz vor z.B. Infektionen⁴. Leider können Wundauflagen nur sehr limitiert bei großflächigen, inhomogenen Verbrennungen verwendet werden, weshalb andere zellbasierte Systeme, wie Bioprinting^{73,74} oder Zellsprays^{75,76}, zuversichtliche Alternativen darstellen. Obwohl letztere Systeme bisher gute Ergebnisse in der Anwendung zeigten, haben diese Technologien den Nachteil, dass sie sehr aufwändig und kommerziell (noch) nicht erwerblich sind⁴.

Als Alternative zu azellulären oder zellulären Wundauflagen können auch Wachstumsfaktoren genutzt werden, um die Wundheilung zu unterstützen⁴. Während der akuten Phase der Wundheilung werden diese bioaktiven Substanzen ausgeschüttet, was dazu führt, dass die Zellen der umliegenden Gewebe, also Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, stimuliert werden¹⁶. Durch eine zusätzliche Applikation von Wachstumsfaktoren werden mehr Zellen aktiviert, die zur Heilung beitragen, und somit kann die Regeneration beschleunigt werden. Hierfür werden, unter anderem, die Moleküle EGF und VEGF verwendet, die die epidermale Regeneration und die Angiogenese stimulieren^{77,78}.

Eine ausführliche Zusammenstellung von verfügbaren und verwendeten Therapien haben Shpichka et al. und Shevchenko et al. bereits in ihren Veröffentlichungen vorgenommen^{4,62}.

Die kontinuierliche Weiterentwicklung von Therapien für Verbrennungen hat bereits dazu geführt, dass die Mortalität von Brandverletzten konstant gesunken und der Lebensstandard von Überlebenden gestiegen ist^{4,60}. Jedoch sind vor allem zellbasierte Produkte und Therapien nur bei akutem Bedarf anforderbar und können nicht oder nur sehr kurz gelagert werden⁷⁹. Dies führt dazu, dass sie nicht universal erhältlich oder anwendbar sind.

Deshalb ist es wichtig Produkte zu entwickeln, die viele Vorteile vereinen. Zum Beispiel müsste ein auf Keratinozyten basiertes Produkt lange bei moderaten Temperaturen (4 °C, Raumtemperatur) lagerbar sein, damit es schnell verfügbar ist. Hierfür würde sich die Gefriertrocknung des Produktes anbieten, da so vor allem bioaktive Substanzen innerhalb der Zellen stabilisiert werden, die sich positiv auf die Wundheilung auswirken. Um dies zu erreichen müssen jedoch Technologien zur Konservierung von Keratinozyten weiterentwickelt werden, die es ermöglichen die Zellen auch über längere Zeit zu konservieren.

1.2 Grundlagen der Zell- und Gewebekonservierung

Die Konservierung ist ein Prozess der Biologie, der es ermöglicht, Dinge über einen langen Zeitraum haltbar zu machen. Da hierdurch eine hohe zeitliche Flexibilität entsteht, findet sie in der Lebensmittelindustrie, der Pharmazie, aber auch in der Forschung breite Anwendung.

1.2.1 Strategien der Konservierung

Bei der Konservierung von Zellen werden hauptsächlich vier verschiedene Methoden angewandt: Die hypotherme Lagerung, die Kryokonservierung, die Vitrifikation (eine Unterform der Kryokonservierung) und die Lyophilisierung, auch Gefriertrocknung genannt.

Werden Zellen oder Organe bei Temperaturen zwischen 2 und 8 °C gelagert, spricht man von einer **hypothermen Lagerung** ^{80,81}. Da bei diesen Temperaturen der Gefrierpunkt von Wasser nicht unterschritten wird und es dadurch nicht zur Eiskristallbildung kommt, stellt diese Methode eine sehr einfache und reproduzierbare Form der Konservierung dar ⁸². Wichtig ist hierbei, die Zellen in einer physiologischen Lösung zu lagern, da eine Hypothermie sonst zu osmotischem Stress führen kann, was wiederum in einer Apoptose der Zellen resultiert ^{80,82}. Ein großer Nachteil der hypothermen Lagerung ist jedoch, dass sie sich nur zur Konservierung über sehr kurze Zeiträume, die meist nur einige Stunden ⁸³ oder Tage ⁸² umspannen, eignet. Wenn Zellen für einen längeren Zeitraum gelagert werden sollen, bietet es sich an eine andere Methode zur Konservierung zu wählen, wie zum Beispiel die Kryokonservierung.

Bei der **Kryokonservierung** werden Zellen in einer wässrigen Lösung graduell so lange heruntergekühlt, bis das Wasser kristallisiert und sich Eis bildet ^{84,85}. Sie wurde bereits Mitte des 20. Jahrhunderts erforscht, wobei eine der ersten wichtigen Entdeckungen die mögliche Nutzung von Glycerol als kryoprotektive Substanz (CPA) durch Polge et al. ⁸⁶ war, welche 1950 von Smith et al. bestätigt wurde ⁸⁷. Zwar ermöglichte diese Entdeckung die erfolgreiche Kryokonservierung verschiedenster Zellen, doch die physikalischen Hintergründe dazu blieben lange ungeklärt. Erst die 1965 veröffentlichte 2-Phasen-Hypothese von Mazur et al. konnte hier zu einem breiten Verständnis der möglichen Zellschäden beim Einfrieren von Zellen beitragen ^{88,89}. Sie stellt somit einen wichtigen Meilenstein in der Kryobiologie dar. Seitdem gab es weitreichende Entwicklungen in diesem Forschungsbereich, die es ermöglichen biologische Systeme einzufrieren ⁸⁴. So gibt es heutzutage nicht nur eine große Zahl an Kryoprotektiva, die eingesetzt werden können, sondern auch viele Protokolle und Geräte, die die Verwendung verschiedener Kühlraten ermöglichen ^{84,85,90}.

Eine Unterform der klassischen Kryokonservierung ist die **Vitrifikation**. Da bekannt ist, dass die Bildung von Eiskristallen beim Herunterkühlen der Zellen einen großen Einfluss auf die Viabilität nach Auftauen hat, setzt die Vitrifikation an diesem Punkt an⁹¹. Vor allem in größeren Systemen, wie Geweben, führen Eiskristalle zu schweren Schäden der Zellen, weshalb die Vitrifikation anstrebt, komplett „eisfrei“ einzufrieren und zu konservieren⁹². Durch eine extrem schnelle Abkühlung des Systems wird erreicht, dass sich im Wasser keine Eiskristalle bilden können, sondern ein erstarrter, amorpher, Glas-ähnlicher Zustand entsteht^{93,94}. Vor allem im Bereich der Reproduktionsmedizin hat sich die Vitrifikation zur Konservierung von Oocyten und Spermien bewährt^{95,96}.

Sowohl die Kryokonservierung, als auch die Vitrifikation haben jedoch den Nachteil, dass die Zellen danach in tiefkalten Temperaturen gelagert werden müssen⁹⁷. Eine Methode, bei der dies nicht nötig ist, ist die **Lyophilisierung**, oder Gefriertrocknung. Auch hier wird das Ausgangsprodukt, wie zum Beispiel Blutplättchen⁹⁸, in einem ersten Schritt eingefroren. Jedoch wird daraufhin ein Vakuum an das System angelegt, was dazu führt, dass das enthaltene Wasser im System direkt von der Fest- in die Gasphase übergeht, die sogenannte Sublimation⁹⁹. Ähnlich wie bei der Vitrifikation entsteht hierdurch ein Glas-ähnlicher Zustand, wodurch biologische, chemische und physikalische Prozesse stark inhibiert werden¹⁰⁰. Nachdem ein Großteil des Wassers entzogen wurde, ist es möglich, das Produkt dann für lange Zeiträume bei moderaten Temperaturen bis hin zur Raumtemperatur zu lagern^{101,102}. Da Zellen aber zu einem Großteil aus Wasser bestehen, ist ihre Trocknung zugleich ein sehr schwieriger Schritt^{103,104}. Deshalb findet die Gefriertrocknung heutzutage vor allem in der Lebensmittelindustrie und der Pharmaindustrie bei der Konservierung von Proteinen, Antikörpern und Blutplasma Anwendung^{105,106}. Aber auch in der Wissenschaft wird sie immer öfter zur Konservierung von Zellen genutzt^{107,108}.

1.2.2 Herausforderungen bei der Kryokonservierung

Die Kryokonservierung von Zellen findet in fast jedem Labor statt. Jedoch ist ein perfektes Zusammenspiel von kryoprotektiven Substanzen und der passenden Kühlrate essentiell, um ein gutes Ergebnis zu erzielen¹⁰⁹. Wie Mazur et al. bereits 1972 beschrieb, gibt es für jeden Zelltyp eine optimale Einfrierrate. Friert man die Zellen schneller oder langsamer ein, führt das zu „slow-“ bzw. „rapid-cooling Injuries“^{88,89}. **Slow-cooling Injuries** beschreiben hier Zellschäden, die auftreten, wenn die Kühlrate des Systems zu niedrig ist. Bis heute konnte noch nicht genau geklärt werden, wodurch diese Schäden verursacht werden, jedoch gibt es zwei mögliche Mechanismen. Durch die Bildung von extrazellulären Eiskristallen wird die Konzentration gelöster Stoffe kontinuierlich erhöht, was wiederum in einem erhöhten Efflux von Wasser aus den Zellen resultiert^{110,111}. Dies

führt zu einem zu Schäden der Zellen, da sie durch den osmotischen Stress stark schrumpfen^{112,113}; zum anderen werden die Konzentrationen an intrazellulären, löslichen Stoffen stark erhöht, was toxisch auf die Zellen wirkt^{114,115}.

Aber auch eine zu hohe Kühlrate ist ungeeignet zur Kryokonservierung, da sie zu **rapid-cooling Injuries** führt. Werden Systeme zu schnell eingefroren, können Zellen nicht schnell genug auf die veränderten osmotischen Zustände reagieren. Das Cytoplasma wird zunehmend unterkühlt, was dazu führt, dass sich intrazelluläres Eis bildet¹¹⁶. Wie genau es zur Bildung intrazellulärer Eiskristalle kommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt jedoch drei Theorien, die alle die Interaktion von extrazellulärem Eis mit der Plasmamembran als Ursache dafür annehmen. Die erste ist die Protein-Poren-Theorie von Mazur¹¹⁷. Sie besagt, dass extrazelluläres Eis durch Poren in der Zellmembran in das Zellinnere gelangt und dort zur Eiskristallbildung führt. In Anlehnung daran besagt die zweite Theorie, dass Defekte der Plasmamembran ursächlich für intrazelluläres Eis sind. Über diese Defekte kann Eis in das Cytoplasma gelangen und dort die Keimbildung herbeiführen^{118,119}. Laut der dritten Theorie fungiert die Zellmembran selbst als Keimbildner, jedoch funktioniert das nur, wenn sie selbst durch extrazelluläres Eis beeinflusst wird. Der genaue Mechanismus hinter dieser Theorie ist aber bis heute noch nicht bekannt¹²⁰.

Um Zellen vor Schäden durch die Kryokonservierung zu schützen, können **kryoprotektive Substanzen** (CPAs) eingesetzt werden. Diese werden in zwei Klassen unterteilt: membrangängige CPAs (kleine, nichtionische Moleküle) und nicht membrangängige CPAs (langkettige Polymere)^{84,85}. Zur Klasse der membrangängigen CPAs gehören zum Beispiel DMSO und Glycerol⁸⁵. Moleküle dieser Art setzen den Gefrierpunkt einer Lösung herab und erniedrigen dadurch auch die Konzentration an löslichen Substanzen, die sich bei einer bestimmten Temperatur im Medium befinden⁸⁴. Somit wird auch ein zu starker Efflux von Wasser aus den Zellen verhindert, was diese vor Schäden beim Einfrieren schützt¹²¹. Membrangängige CPAs können so vor allem Schäden durch eine niedrige Kühlrate verhindern, bieten jedoch nur wenig Schutz vor fast-freezing Injuries¹²².

Bei nicht membrangängigen CPAs verhält es sich genau umgekehrt. Sie sind meist große, langkettige Polymere oder Zucker, die einen hohen osmotischen Koeffizienten besitzen, wie Hydroxyethylstärke und Trehalose⁸⁴. Dadurch werden Zellen schneller und bereits vor dem Einfrieren dehydriert. Dies ermöglicht den Zellen, ihren Wasserhaushalt an die Einfriergeschwindigkeit anzupassen und verhindert die Bildung von intrazellulärem Eis¹²². Durch die zusätzliche Dehydrierung der Zellen aufgrund des

CPAs eignen sich nicht-membrangänge Moleküle nur für den Schutz vor „fast-freezing Injuries“, können jedoch keine Schäden bei langsamen Kühlraten verhindern¹²².

Da die zwei Molekülklassen von CPAs komplett unterschiedlich auf den Einfrierprozess wirken, sollte bei der Konservierung von Zellen immer bedacht werden, welche Kühlrate verwendet wird und welche CPAs in diesem Zusammenhang den bestmöglichen Schutz bieten können¹²². Nur durch ein perfektes Zusammenspiel aus Kühlrate, CPA und verwendetem Zelltyp kann eine optimale Kryokonservierung mit einer hohen Überlebensrate der Zellen erreicht werden.

Bei der Entwicklung einer zellbasierten Wundaufgabe für schwere Verbrennungen, die auch bei moderaten Temperaturen gelagert werden kann, würde dies zum Beispiel bedeuten, dass Keratinozyten lyophilisiert werden. Hierfür müsste die Kryokonservierung der Zellen optimiert und CPAs ausgewählt werden, die nicht nur einen optimalen Schutz der Zellen gewährleisten, sondern auch unbedenklich für die Zulassung eines medizinischen Produkts sind. Um die möglichen Effekte von Zellen und verwendeten CPAs auf die Wundheilung von Verbrennungen zu untersuchen, müssen im Zuge der Produktentwicklung auch Studien zur Wirksamkeit durchgeführt werden.

1.2.3 Erforschung von Brandwunden und präklinische Testung von Wundaufgaben

Die häufigsten Brandwunden sind Verbrennungen ersten Grades, deren Prävalenz jedoch nur grob geschätzt werden kann, da die meisten Fälle zu Hause behandelt und nicht in Kliniken dokumentiert werden¹²³. Aufgrund der Tatsache, dass leichte Verbrennungen nicht als kritische Verletzung angesehen werden, konzentriert sich der Schwerpunkt der Forschung auf schwere, tiefgradige Verbrennungen¹²⁴. Bei der Erforschung der Wundheilung und der Testung neuer Produkte sind sowohl für Brandwunden, als auch für andere Verletzungen bis heute **in vivo Tiermodelle** der Goldstandard.

Oft werden hier **Nagetiere** verwendet, die sich durch ihre einfache Handhabung und Haltung, die Verfügbarkeit vieler Geno- und Phänotypen und die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter kontrollierten Bedingungen auszeichnen¹²⁵. Dies geschieht trotz signifikanter Unterschiede in der Histologie und Histopathologie der Haut von Menschen und Nagetieren¹²⁶. Zum Beispiel ist der Wundheilungsmechanismus bei Nagern grundlegend anders, da die Wundkontraktion der primäre Heilungsmechanismus ist, im Gegensatz zur Reepithelisierung und Granulation beim Menschen^{126–130}. Auch die Komposition und Größe der Hautschichten und –anhangsgewebe unterscheidet sich stark, da Menschen weniger Haarfollikel, eine

höhere Vaskularisierung und mehr ekkrine Schweißdrüsen besitzen, während ihre Epidermis und Dermis dicker ausfallen als bei Mäusen³⁴. Diese und viele weitere Unterschiede führen dazu, dass bei einem direkten Vergleich nur knapp 50 % der Ergebnisse aus diesen Tiermodellen auch in klinischen Studien bestätigt werden konnten¹³¹.

Da die Haut von **Schweinen** eine große physiologische Ähnlichkeit zu Menschen besitzt, werden auch sie als Testmodell eingesetzt¹³². Vor allem bei der Heilung epidermaler Wunden hat sich gezeigt, dass hier eine bessere Vergleichbarkeit zum Menschen vorliegt als bei Nagetieren¹³³. Trotz allem zeigt sich aber auch hier keine volle Übertragbarkeit von Ergebnissen (knapp 80 %) aus Tierstudien auf den Menschen in klinischen Studien, weshalb auch dieses Tiermodell nicht optimal zur Erforschung der Wundheilung geeignet ist^{126,134}.

Aufgrund der Limitationen in Bezug auf die Physiologie, den Wundheilungsmechanismus und die Übertragbarkeit, aber auch aufgrund ethischer Bedenken, etablierten Russel und Burch bereits Ende der 1950er Jahre das 3R Prinzip¹³⁵. Ziel ist es, das Leid von Tieren in der Forschung durch den Ersatz (Replacement), die Reduktion (Reduction) und die Verbesserung der Haltungs- und Versuchsbedingungen (Refinement) zu minimieren. Diese Prinzipien haben seitdem großen Anklang in Wissenschaft und Forschung gefunden und werden seit einigen Jahren auch vermehrt in die Gesetzgebung eingeführt^{136–138}. So wird bereits seit 2007 der Einsatz von Tiermodellen zur Testung neuer Inhaltsstoffe in der Kosmetikindustrie verboten, in der klinischen Forschung und Substanztestung spielen sie jedoch noch immer eine zentrale Rolle¹³⁹. Aber auch hier tritt immer mehr ein Umdenken ein, welches Alternativen zu Tierversuchen, wie *in silico*, *ex vivo* und *in vitro* Modelle fordert und fördert^{140–142}. Wichtig bei solchen Modellen ist, dass sie vor allem die Anatomie und Funktion humaner Gewebe, wie der Haut, gut abbilden können.

Eine Möglichkeit zur Erforschung von Brandwunden und deren Behandlung ohne Tierstudien sind **2D *in vitro*** Tests. Hier finden humane Zellen Anwendung, wodurch tierethische Bedenken vermieden werden¹⁴³. Auch bezüglich ihrer Kosten stellen sie eine gute Alternative zu Tiermodellen dar. Jedoch ist ein großer Nachteil dieser Testungen, dass die physiologischen Aspekte der Haut nicht wiedergespiegelt werden können und diese Modelle daher nur eine sehr geringe Prädiktion erlauben^{143,144}.

Ein weiterer Ansatz in der Forschung, der die Nachteile von Tiermodellen und 2D *in vitro* Modellen ausschließt, sind humane **ex-vivo Hautmodelle**. Sie werden meist aus anfallender Haut bei Hautreduktionsoperationen gewonnen^{145,146} und können die hochkomplexe Struktur der menschlichen Haut ideal repräsentieren. Jedoch mangelt es

diesen Modellen oft an Reproduzierbarkeit, meist aufgrund der Einschränkungen der gespendeten Hautoberfläche ¹⁴⁷.

In Anbetracht der Limitationen von aktuell verfügbaren *in vivo*- und *ex vivo* Modellen ist der Bedarf für ein zuverlässiges und standardisiertes *in vitro* Modell zur Untersuchung von Verbrennungswunden offensichtlich. Dies zeigt sich vor allem auch bei der Erforschung von leichten, erstgradigen Verbrennungen, da für diese Art von Verletzung bisher noch kein Testsystem etabliert wurde und sich die Forschung und Entwicklung ausschließlich auf Verbrennungen zweiten und dritten Grades fokussiert. Ein weiterer Faktor, der dies bestätigt, sind die ethischen Bedenken im Hinblick auf die Einbringung großer Verbrennungswunden an einer hohen Anzahl von Tieren ^{128,148–152}.

2 Zielsetzung

Verbrennungen stellen noch immer einen großen Anteil der Verletzungen weltweit dar, die medizinische Intervention benötigen. Während zellbasierte Behandlungen hier bereits große Erfolge erzielen, gibt es jedoch noch immer keine Möglichkeit diese Produkte für längere Zeit bei Raumtemperatur stabil zu lagern. Auch bei der Erforschung von Brandwunden und der Testung neuer Therapeutika besteht, in Anbetracht der Einschränkungen von *in vivo* und *ex vivo* Modellen, der Bedarf nach einem zuverlässigen und standardisierten *in vitro* Modell.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es deshalb, Methoden zu entwickeln, die eine spätere Lyophilisierung von Keratinozyten erlaubt, um ein zellbasiertes Produkt zur Behandlung von Verbrennungswunden herzustellen. Gleichzeitig soll ein *in vitro* Modell etabliert werden, an dem sowohl die Wundheilung, als auch die Behandlung von Verbrennungswunden untersucht werden kann.

Dafür sollen als erster Teil dieser Arbeit Methoden etabliert werden, um Keratinozyten zu isolieren, kultivieren und konservieren, die kompatibel mit regulatorischen Richtlinien für die Herstellung medizinischer Produkte sind. Die Hypothese ist, dass trotz der Vermeidung tierischer Komponenten, charakteristische Merkmale und Funktionalitäten der Keratinozyten erhalten bleiben und diese weiterhin Wachstumsfaktoren sezernieren, die zu einer Verbesserung des Wundschlusses beitragen. Eine weitere Hypothese ist, dass die Kryokonservierung der Zellen durch unterschiedliche Kryoprotektiva und Einfrierraten weiter optimiert werden kann, um eine anschließende Lyophilisierung zu ermöglichen. Außerdem ist es möglich, Chemikalien als Kryoprotektiva zu nutzen, die in medizinischen Produkten verwendet werden können.

Als zweiter Teil dieser Arbeit soll ein *in vitro* Modell für Verbrennungswunden auf Basis von Hautmodellen verschiedener Komplexität etabliert werden. Als erster Schritt sollen hierfür Verbrennungen ersten Grades an epidermalen Modellen simuliert werden. Die Analyse der Wundheilung dieser Modelle soll dann mit Hilfe verschiedener Methoden erfolgen. Außerdem soll abschließend untersucht werden, ob das Modell zur Analyse aktiver Substanzen verwendet werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Ausstattung

Tabella 1: Liste der Ausstattung.

Ausstattung/ Gerät	Hersteller
Absaugvorrichtung: VacuBoy	Integra Biosciences, Fernwald (GER)
Abzug	Prutscher Laboratory Systems, Neudörfli (AUT)
Analysewaage	Kern, Balingen-Frommern (GER)
Autoclav: „Tecnoclav“ Table-top Autoclav: „Varioklav“	Biomedis, Giessen (GER) Systec, Wetzlar (GER)
Biorevo BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg (GER)
Block-Station	Leica, Wetzlar (GER)
Brutschrank: 37 °C, 5% CO ₂	Heraeus, Hanau (GER)
Cedex Bio®Analyzer	Roche, Basel (CHE)
Dampfgarer: „MultiGourmet“	Braun, Kronberg/Taunus (GER)
Digitalkamera	Canon, Krefeld (GER)
Durchflusszytometer: FACS Accuri C6 Plus	BD, Heidelberg (GER)
Durchflusszytometer: FACS Calibur	BD, Heidelberg (GER)
Einbettmaschine	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (GER)
Einhängethermostat für Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen (GER)
Eismaschine: „AF-80“	Scotsman, Mailand (ITA)
Evos (M5000, XL Core)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (GER)
Flüssigstickstofftank: MVE 815 P-190 (-180 °C)	German-Cryo, Jüchen (GER)
Gefrierbehälter: Mr. Frosty	VWR, Darmstadt (GER)
Hand-Stückzähler	NeoLab, Heidelberg (GER)
Heißluft-Sterilisator	Memmert, Schwabach (GER)
Heizblock, Analog Heatblock	VWR, Darmstadt (GER)

IceCube 14S	SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkersdorf (AUT)
Impedanzmessgerät: LCR HiTESTER 3522-50	HIOKI E.E. Corporation, Nagano (JPN)
Inkubator	Medite, Burgdorf (GER)
Kühlplatte	Leica, Wetzlar (GER)
Kühlraum, 4°C	Genheimer, Höchberg (GER)
Kühlschränke: -80°C -20°C	Thermo Scientific, Waltham (USA) Liebherr, Biberach a.d. Riss (GER)
Lötkolben, BASETech, ZB-8936	Conrad, Hirschau (GER)
Magnetrührer mit integrierter Heizung: Type 720-HPS	VWR, Darmstadt (GER)
Multi-Channel-Pipette Plus	Eppendorf, Hamburg (GER)
Multistep-Pipette	Brand, Wertheim (GER)
Multipette (M4, E3)	Eppendorf Hamburg (GER)
Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Würzburg (GER)
NucleoCounter NC-200	ChemoMetec, Allerød (DEN)
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen (GER)
Photometer Tecan Infinite 200	Tecan Group AG, Männedorf (CH)
Pipetten: 0.5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf, Hamburg (GER)
Pipettierhilfe: Pipet Boy	Brand, Wertheim (GER)
Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach (GER)
Schaukelplattformschüttler	NeoLab, Heidelberg (GER)
Schlittenmikrotom RM 2255	Leica, Wetzlar (GER)
Sicherheitswerkbank 2020	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (GER)
Spülmaschine	Miele, Gütersloh (GER)
Timer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (GER)
Trockenschrank	Memmert, Schwabach (GER)
Vortexer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (GER)
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach (GER)

Zentrifugen: Multifuge X3R Centrifuge 5417R Centrifuge 5424	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (GER) Eppendorf, Hamburg (GER) Eppendorf, Hamburg (GER)
--	--

3.1.2 Einwegartikel

Tabelle 2: Liste der Einwegartikel.

Einwegartikel	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (GER)
Biopsiestanzen (5 mm)	Kai Europe GmbH, Solingen (GER)
Combitips Plus: 0.5 ml, 1 ml, 2.5 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg (GER)
Corning® Costar® Snapwell Inserts 0,4 µm für 6-Well-Platten	Corning, Corning (USA)
Corning® Snapwell Platten, 6-Well	Corning, Corning (USA)
Deckgläschen: 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig (GER)
Einbettkassetten	Klinipath, Duiven (NED)
Einweg-Pipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
Entsorgungsbeutel	Hartenstein, Würzburg (GER)
Fettstift	Dako, Hamburg (GER)
Filterpapier	Labonord, Mönchengladbach (GER)
Handschuhe: Nitrile	Kimberly-Clark, Koblenz (GER)
Kryoröhrchen: 1.8 ml	Nunc, Wiesbaden (GER)
Lanzettstäbchen Pro-optha 100% polyvinyl alcohol	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf (GER)
Mikrotomklingen: Type A35	pfm Medical, Köln (GER)
Multititerplatte-Platten: 6-Well, 12-Well, 24-Well, 48-Well, 96- Well	TPP, Trasadingen (GER)
Objektträger: unbeschichtet (26 x76 x1 mm) PolysineTM (25 x75 x1 mm)	Menzel, Braunschweig (GER) Langenbrinck, Emmendingen (GER)
Parafilm®	Carl Roth, Karlsruhe (GER)

Pasteurpipetten	Brand, Wertheim (GER)
Pipettenspitzen: 0.5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf, Hamburg (GER)
Reaktionsgefäße: 1.5 ml, 2.0 ml	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Skalpellklingen, rund	Bayha, Tuttlingen (GER)
Spritzen: 5 ml, 10 ml, 20 ml	BD Biosciences, Heidelberg (GER)
Sterilfilter für Spritzen: Durchmesser 50 mm, Porengröße 0.2 µm	Sartorius Stedium Biotech, Göttingen (GER)
Thincert Zellkultureinsätze, 0,4 µm für 12-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
Thincert Zellkulturplatten, 12-Deep-Well- Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
Waagschale	Hartenstein, Würzburg (GER)
Zellkulturflaschen: 25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²	TPP, Trasadingen (CH)
Zellkulturflaschen 175 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
Zellkulturschalen: 145 x20 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
Zentrifugenröhrchen: 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)

3.1.3 Labormaterial

Tabelle 3: Liste der Labormaterialien.

Labormaterial	Hersteller
Becher: 1 L, 250 ml	Schott, Mainz (GER)
Edelstahlgussformen zum Einbetten von Gewebe: 24 x 37 x 9 mm	Labonord, Mönchenglattbach (GER)
Glaspipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml	Brand, Wertheim (GER)
Kälteschutzhandschuhe	VWR, Darmstadt (GER)
Laborflasche: 1 L, 250 ml, 100 ml, 50 ml	Schott, Mainz (GER)
Löffelspatel	Hartenstein, Würzburg (GER)
Magnetührstab	Hartenstein, Würzburg (GER)
Magnetührstäbchen-Angel	Hartenstein, Würzburg (GER)

Objektträgerregale: Glass, Stainless Steel	Mercateo, Munich (GER)
Pinzette	Fine Scientific Tools FST, Heidelberg (GER)
Reaktionsgefäßeständer	NeoLab, Heidelberg (GER)
Schutzbrille	NeoLab, Heidelberg (GER)
Skalpell	Bayha, Tuttlingen (GER)
Spatel	VWR, Darmstadt (GER)
Sprühflasche	Hartenstein, Würzburg (GER)
Trichter	Hartenstein, Würzburg (GER)
Zentrifugenröhrchenständer	NeoLab, Heidelberg (GER)

3.1.4 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 4: Liste der Chemikalien und Lösungen.

Chemikalie/ Lösung	Hersteller
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Serva, Heidelberg (GER)
Accutase	ThermoFisher, Waltham (USA)
Aceton (≥ 99,5%)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Activator Bio, System Reagenz Cedex Bio Analyzer	Roche, Basel (GER)
Albumin-Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Antiörpervedünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg (GER)
Ascorbinphosphat	Sigma-Aldrich, München (GER)
BD Cytifix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit	BD Biosciences, Heidelberg (GER)
Bepanthen® Wund- und Heilsalbe, 5 % Dexpanthenol	Bayer Vital GmbH, Leverkusen (GER)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	VWR, Darmstadt (GER)
Chondroitinsulfat	Sigma-Aldrich, München (GER)
Citronensäure	VWR, Darmstadt (GER)
DAPI Fluoromout-GTM	Southern Biotech, Birmingham (USA)

Descosept	Dr. Schumacher, Malsfeld (GER)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München (GER)
Dispase-Pulver	ThermoFisher, Waltham (USA)
DMEM (1x) + GlutaMAX (4,5 g/L D-Glucose)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS ⁻ : ohne MgCl ₂ und NaCl ₂ , PBS ⁺ : mit MgCl ₂ und NaCl ₂)	Sigma-Aldrich, München (GER)
Eindeckmedium: Entellan	Merck, Darmstadt (GER)
Eindeckmedium: Mowiol	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Eosin, 1 % aqueous	Sigma-Aldrich, München (GER)
Epilife Medium	ThermoFisher, Waltham (USA)
Esel-Serum	Sigma-Aldrich, München (GER)
Ethanol, absolut	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Ethanol, vergällt (99,8%)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München (GER)
Fibrolife	Lifeline Cell Technology, Frederick (USA)
Fluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich, München (GER)
Fluoromount-G DAPI	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Fötale Kälberserum	Lonza, Cologne (GER)
Glucose Bio Test Kit	Roche, Basel (CHE)
Hämatoxylin nach Meyer	Morphisto, Frankfurt (GER)
HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	Sigma-Aldrich, München (GER)
Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS)	ThermoFisher, Waltham (USA)
Hydroxyethylstärke	BOC Sciences, Shirley (USA)
ISE Deproteinizer Bio, System reagenz für Cedex Bio Analyzer	Roche, Basel (CHE)
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Keratinocyte growth factor (KGF)	ThermoFisher, Waltham (USA)
Kollagenase	Sigma-Aldrich, München (GER)

Lactate Bio Test Kit	Roche, Basel (CHE)
LDH Bio Test Kit	Roche, Basel (CHE)
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Penicillin / Streptomycin (100x concentrated)	Sigma-Aldrich, München (GER)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, München (GER)
Roti-Histofix 4 % (Formaldehyd)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Trehalose	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München (GER)
Trypsin 0,5 % (10x)	Invitrogen GmbH, Taufkirchen (GER)
Tween-20	Sigma-Aldrich, München (GER)
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe (GER)

3.1.5 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Tabelle 5: Liste der Medien und Lösungen für die Zellkultur.

Medium/ Lösung	Zusammensetzung	
0,05 % Trypsin/EDTA	10 %	0,5 % Trypsin-EDTA-Lösung in PBS-/EDTA Solution
Ascorbinphosphat-Lösung	73 mg/ ml	Ascorbinphosphat in E1-Medium, sterilfiltriert
Calciumchlorid-Lösung	44 mg/ ml	Calciumchlorid in PBS-, sterilfiltriert
Kollagenase-Lösung	500 U/ ml	Kollagenase in DMEM
Dispase-Lösung	2 U/ ml	Dispase Pulver in PBS-
DMEM-Medium	10 % 1 %	FCS Penicillin / Streptomycin in DMEM (1x) + GlutaMAX (4,5 g/L D-Glucose)
E1-Medium	1 % 1 %	Penicillin / Streptomycin HKGS in EpiLife
E2-Medium	0,48 %	Calciumchlorid-Lösung in E1-Medium

E3-Medium	0,1 % 0,1 %	Ascorbinphosphat-Lösung KGF-Lösung in E2-Medium
E10-Medium	10 %	Fibrolife in E3-Medium
Fibrolife	3,75 % 2 % 0,1 % 0,1 % 0,1 %	L-Glutamin FCS Rekombinantes humanes bFGF Rekombinantes humanes Insulin Ascorbinsäure Hydrocortison hemisuccinate In Fibrolife Basalmedium
Gelneutralisationslösung	0,03 % 0,05 % 0,03 %	HEPES 3 M Chondroitinsulfat FCS pH 8,5 in DMEM (2x)
KGF-Lösung	10 µg/ ml	KGF in EpiLife
Mowiol-DAPI Eindeckmedium	0,1 %	DAPI in Mowiol
MTT-Lösung	1 mg/ ml	MTT in PBS-
PBS-/EDTA Lösung	0,0002 %	EDTA in PBS- pH: 7.2 autoklaviert

3.1.6 Chemikalien und Lösungen für die Histologie, Immunhistochemie und Durchflusszytometrie

Tabelle 6: Liste der Chemikalien und Lösungen für die Histologie, Immunhistochemie und Durchflusszytometrie.

Chemikalie/Lösung	Zusammensetzung	
FACS-Puffer	2 mM 5 %	EDTA BSA in PBS-
TBST, 0.05 M	10 % 0,5 %	TBS Stock 0.5 M Tween-20 in demineralisiertem Wasser
Tris gepufferte Lösung (TBS) Stock, 0.5 M (10x konzentriert)	78,8 g/ l 87,66 g/ l	Tris NaCl in Reinstwasser pH 7.6 Autoklaviert

3.1.7 Antikörper

Tabelle 7: Liste der Antikörper.

Antikörper	Wirt	Konz.	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor® 647 Anti- Maus	Esel		1:400	ThermoFisher, Waltham (USA)
Alexa Fluor® 488 Anti- Kaninchen	Esel		1:400	ThermoFisher, Waltham (USA)
Alexa Fluor® 555 Anti- Kaninchen	Esel	5 µg/ ml	1:400	ThermoFisher, Waltham (USA)
Alexa Fluor® 555 Anti- Maus	Esel	5 µg/ ml	1:400	ThermoFisher, Waltham (USA)
Anti- HMGB1	Kaninchen		1:100	Cell Signalling Technology (USA)
Anti- Ki67	Kaninchen		1:100	Abcam, Cambridge (UK)
Anti- Zytokeratin 1	Kaninchen	0,5 µg/ ml		Abcam, Cambridge (UK)
Anti Zytokeratin 10	Maus		1:100	Abcam, Cambridge (UK)
Anti- Zytokeratin 14	Kaninchen	1 µg/ ml	1:1000	Sigma-Aldrich, München (GER)
Durchflusszytometrie				
Anti- Zytokeratin 1 [PE]	Maus		1:100	Antibodies- online GmbH, Aachen (GER)
Mouse IgG1 isotype Control [PE]	Maus		1:100	Antibodies- online GmbH, Aachen (GER)
Anti- Zytokeratin 10 [FITC]	Maus		1:100	Novus Biologicals, Centennial (USA)
Mouse IgG1 Kappa Isotype Control [FITC]	Maus		1:100	Novus Biologicals, Centennial (USA)
Anti- Zytokeratin 14 [FITC]	Maus		1:100	LSBio, Seattle (USA)
Mouse IgG3 Isotype Control [FITC]	Maus		1:100	LSBio, Seattle (USA)

Anti- Ki67 [FITC]	Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge (UK)
Rabbit IgG Isotype Control [FITC]	Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge (UK)
Anti- Vimentin [FITC]	Kaninchen	1:100	Bioss Antibodies Inc., Woburn (USA)
Rabbit IgG isotype Control [FITC]	Kaninchen	1:100	Antibodies- online GmbH, Aachen (GER)

3.1.8 Biologisches Material und humanes Spendermaterial

3.1.9 Programme

Tabelle 8: Liste der verwendeten Programme.

Programm Name	Version	Hersteller
ImageJ	v1.53e	National Institutes of Health, Bethesda (USA)
BioVoxel Image Processing and Analysis Toolbox		BioVoxel, Ludwigshafen (GER)
Microsoft Image Compositor	v2.0.3.0	Microsoft Corporation, Redmond, WA (USA)
GraphpadPrism	v6	GraphPadSoftware, San Diego (USA)
IceCube Software		SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkersdorf (AUT)
BZ-9000/-II Analyzer		Keyence Deutschland GmbH, Neu- Isenburg (GER)
NucleoView		ChemoMetec, Allerød (DEN)
FlowJo	v10	BD Biosciences, Heidelberg (GER)
LabVIEW		National Instruments, Austin TX (USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturmethoden

Alle Zellkulturmethoden wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die hierbei verwendeten Materialien wurden vorher autoklaviert, sterilfiltriert, gebacken oder steril erworben. Alle Zellen und Modelle wurden in einem Inkubator bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.1.1 Isolation und Kultur von epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten

Humane epidermale Keratinozyten (hEK) und Fibroblasten (hDF) wurden aus Vorhautbiopsien isoliert, die von jugendlichen Spendern unter informierter Einverständniserklärung, entsprechend der ethischen Genehmigung durch die lokale Ethikkommission (Abstimmung 182/10 und 280/18sc) und der schriftlich bestätigten Zustimmung ihrer Erziehungsberechtigten gewonnen wurden. Die Isolierung der Zellen wurde nach einem zuvor beschriebenen Protokoll durchgeführt¹⁵³. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

3.2.1.2 Zellpassage

Alle Zellen wurden bei einer Konfluenz zwischen 70 und 90% passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium abgenommen und die Flaschen einmal mit PBS⁻ gespült. Danach wurden die Zellen mit Accutase (bei heKs), bzw. Trypsin (hdF) für 5-15 min bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich von der Kulturfläche ablösten. Die Zellen wurden danach in einem 50 ml Röhrchen in frischem Kulturmedium aufgenommen und die Flaschen ein weiteres Mal mit PBS⁻ gespült. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 300 g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in seinem entsprechenden Medium aufgenommen. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit einer Dichte von 3000-5000 Zellen/cm². Alle primären Zellen kamen für maximal 4 Passagen zur Verwendung.

3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mittels Zählkammer

Die Zellzahl und Viabilität wurden mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Hierfür wurde die Zellsuspension mit Trypanblau gemischt und anschließend auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop konnten die Zellen innerhalb der vier Quadranten gezählt werden, während lebende Zellen transparent und tote Zellen blau gefärbt waren. Die lebend-Zellzahl wurde dann wie folgt berechnet:

$$(Z / 4) * 10^4 * X * V = \text{Lebende Zellen/ml}$$

Wobei:

Z = gezählte Zellzahl, X = Verdünnungsfaktor und V = Volumen der Zellsuspension

Die Vitalität der Suspension konnte als Quotient der lebenden und der Gesamtzellzahl errechnet werden.

3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität mittels Nucleocounter NC-200

Zur Bestimmung der Zellzahl mittels NucleoCounter wurde 200 µl der Zellsuspension entnommen und in eine Via2-Cassette™ aufgenommen. Innerhalb dieser Kassetten befinden sich die Fluorophore Acridinorange zum Färben aller Zellen und DAPI zum Färben toter Zellen. Die Kassetten wurden dann in den NucleoCounter gesteckt, wo die Zellzählung und Bestimmung der Viabilität der Suspension berechnet und ausgegeben wird.

3.2.1.5 Klassische Kryokonservierung der Zellen

Zellen wurden für kurze Zeit bei -80 °C und langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Kryokonservierung wurden Zellsuspensionen mit einer Konzentration zwischen $1 \cdot 10^6$ und $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml hergestellt. Das Standardmedium zur Kryokonservierung bestand aus Kulturmedium mit 10 % DMSO, jedoch wurden auch alternative Medien mit Trehalose (2 M) oder Hydroxyethylstärke (10 %) als Kryoprotektiva verwendet. Zellsuspensionen wurden in Kryoröhrchen in MrFrosty Einfrierbehälter transferiert, in denen bei -80 °C Außentemperatur eine Kühlrate von 1 K/min erreicht wird. Um die Keratinozyten wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Suspensionen zügig mit vorgewärmtem Medium aufgetaut und anschließend für 24 h in eine Zellkulturflasche gegeben, bevor das Kulturmedium ausgetauscht wurde. Bei Fibroblasten wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei 300 g für 5 min direkt nach dem Auftauen eingefügt.

3.2.1.6 Kryokonservierung mittels IceCube

Die Kryokonservierung mittels IceCube verlief ähnlich, wie die bereits beschriebene klassische Kryokonservierung (3.2.1.5). Jedoch wurden hier die vorbereiteten Proben in der Probenkammer des Geräts platziert, statt in einem MrFrosty. Diese ermöglichte auch das Einfrieren von adhärennten Zellen und 3D Geweben. Für adhärennte Zellen in 12-Well-Platten wurden 750 µl Einfriermedium pro Well zugegeben.

Nachdem eine Starttemperatur von 4 °C erreicht wurde, kühlte der IceCube die Proben entsprechend einem vorher definierten Einfrierprogramm bis zu einer gewünschten

Temperatur ab. Danach konnten die Proben zur Lagerung bei -80 °C oder in flüssigen Stickstoff transferiert werden.

Die genutzten Einfrierprogramme sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 9: Protokoll 1: langsames Einfrieren.

Endtemperatur [°C]	Einfrierrate [K/min]
4	0 (für 10 min)
-80	10

Tabelle 10: Protokoll 2: medium Einfrieren.

Endtemperatur [°C]	Einfrierrate [K/min]
4	0 (für 10 min)
-80	20

Tabelle 11: Protokoll 3: schnelles Einfrieren.

Endtemperatur [°C]	Einfrierrate [K/min]
4	0 (für 10 min)
-80	40

Während Zellen in Suspension, wie bereits in 3.2.1.5 erläutert, aufgetaut wurden, wurde in jedes Well der adhärenz eingefrorenen Zellen 750 µl vorgewärmtes Kulturmedium gegeben und die Platten anschließend bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem das Einfriermedium komplett geschmolzen war, wurde es durch frisches Kulturmedium ersetzt.

3.2.1.7 Herstellung von rekonstruierten humanen Epidermismodellen

Rekonstruierte epidermale Modelle (OS-REp) wurden nach einem zuvor veröffentlichten Protokoll hergestellt ¹⁵³. Zunächst erfolgte eine 10-minütige Inkubation der hEKs mit Accutase bei 37°C, um sie von der Kulturfläche abzulösen. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in E2-Medium resuspendiert und je 5×10^5 Zellen pro Insert in 500 µl E2-Medium ausgesät. Nach 2 h wurde jedes Insert in 1 ml E2-Medium in einer 12-Well-Platte gesetzt. Nach weiteren 24 h erfolgte der Wechsel zur Luft-Flüssigkeits-Grenzflächenkultur (Air Liquid Interface/ ALI) durch Entfernung des Mediums innerhalb der Inserts. Das E2-Medium wurde gegen 4,2 ml E3-Medium ausgetauscht und der Medienwechsel erfolgte dreimal pro Woche.

3.2.1.8 Herstellung von humanen Vollhautmodellen

Humane Vollhautäquivalente bestehen aus einem epidermalen Teil (heKs) und einem dermalen Teil (hdFs in selbst isoliertem Rattenkollagen Typ I).

Für die Erzeugung der dermalen Komponente wurden hdFs in Passage 3 - 5 kultiviert, mit Trypsin/EDTA abgelöst, zentrifugiert, in DMEM resuspendiert und gezählt. Snapwell-Inserts wurden mit einem Dermapen perforiert, aus ihrer Halterung entfernt und zur späteren Kompression in einen speziell angefertigten Reaktor gelegt. Für je 12 Modelle wurden in eine Zweikomponentenspritze 8 ml Kollagen und $8,7 \times 10^5$ hdFs in 4,6 ml GNL gefüllt. Mithilfe einer elektrischen Mischpumpe wurden jeweils 700 μ l der neutralisierten Lösung in jedes Snapwell-Insert abgegeben. Der Kompressionsreaktor wurde dann zur Gelierung des Kollagens für 60 Minuten in den Inkubator gestellt. Anschließend erfolgte die Komprimierung des Kollagens mit zwei speziell angefertigten Gewichten (je 465 g) für 40 Minuten bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Inserts wieder in ihre Halterung gesteckt, in eine 6-Well-Platte überführt und 7 Tage lang unter submersen Bedingungen (4,5 ml DMEM im Well; 250 μ l auf den Modellen) kultiviert. An Tag 7 wurde das Medium auf den Modellen entfernt, um die epidermale Komponente hinzuzufügen. Dafür wurden 5×10^5 heK (Passage 3) in 250 μ l E10-Medium auf das Kollagengel ausgesät. Die Modelle wurden 2 Stunden lang inkubiert, bevor 5 ml E10-Medium in die Wells gegeben wurde. Nach weiteren 24 h erfolgte der Wechsel zur Luft-Flüssigkeits-Grenzflächenkultur (Air Liquid Interface/ ALI) durch Entfernung des Mediums innerhalb der Inserts. Das Volumen des E10-Mediums wurde auf 2,5 ml reduziert und die Modelle für weitere 21 bis 22 Tage kultiviert.

3.2.1.9 Erzeugung von Brandwunden in Hautmodellen mit anschließender Substanzapplikation

Hautmodelle wurden vor der Verbrennung 12 Tage lang kultiviert. An Tag 12 erfolgte eine thermische Verbrennungsverletzung im Zentrum der Modelle. Bei Verwundung epidermaler Modelle mittels Lötstab wurde die Spitze des Geräts auf 85 °C erhitzt und für 10 Sekunden auf die Modelle gedrückt. Bei Verwundung durch Metallgewichte wurden die Gewichte mit einem Durchmesser von 6 mm auf 83 °C in einem Heizblock mit Wasser vorgewärmt und dann sieben Sekunden lang ohne weiteren Druck auf die Modelle gestellt, was zu einer Verwundung von 25 % der Modellfläche führte. Kontrollmodelle wurden mit einem Metallstab bei Raumtemperatur behandelt. Die Modelle wurden danach bis zu 14 Tage lang in Kultur gehalten, wobei der Medienwechsel dreimal wöchentlich erfolgte. Bei der Verwundung von Vollhautmodellen wurden Gewichte mit 4 mm Durchmesser verwendet, die auf 85 °C (Grad I und Grad IIa) oder 120 °C (Grad IIb) erhitzt waren. Die Gewichte wurden anschließend für 3 Sekunden (Grad I), 7 Sekunden (Grad IIa) oder 13 Sekunden (Grad IIb) auf die Modelle gestellt.

Die Behandlung von Modellen mit Bepanthen Wund- und Heilsalbe mit 5 % Dexpanthenol erfolgte durch topische Applikation 3 Stunden, 2 Tage und 6 Tage nach der Verbrennung. Die Dauer der Behandlung betrug jeweils 24 Stunden. Um oxidativen Stress zu vermeiden und um die Impedanzmessung der Modelle zu ermöglichen, wurden verbleibende Salbenreste nach 24 Stunden mit einem Lanzettstäbchen entfernt.

Zur Behandlung mit einem lyophilisierten Placebo wurde das Produkt auf die Wundfläche der Modelle gelegt und verblieb dort für 24 Stunden.

3.2.2 Histologie

3.2.2.1 Fixierung von Gewebeproben

Zellen und Modelle wurden zur histologischen Auswertung fixiert. Hierfür wurden die Proben mit PBS⁻ gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Roti-Histofix 4 % inkubiert.

3.2.2.2 Paraffineinbettung und Schnittpräparation

Zur Einbettung in Paraffin wurden die fixierten Proben mit Filterpapier und/oder einem Biopsieschwämmchen in Einbettkassetten platziert. Bis zur Einbettung wurden die Kassetten in VE-Wasser aufbewahrt und dann mit folgendem Programm in der Einbettmaschine entwässert und paraffiniert:

Tabelle 12: Programm zur Paraffineinbettung.

Schritt	Lösung	Zeit
Auswaschen des Fixans	VE-Wasser	1 Stunde
	Ethanol 50 %	1 Stunde
Dehydration	Ethanol 70 %	1 Stunde
	Ethanol 80 %	1 Stunde
	Ethanol 96 %	1 Stunde
	Isopropanol I	1 Stunde
	Isopropanol II	1 Stunde
	Entfernen der Alkoholreste	Xylol I
Xylol II		1 Stunde
Infiltration mit Paraffin	Paraffin I	1,5 Stunden
	Paraffin II	1,5 Stunden

Nach dem Einbetten wurden die Proben aus den Kassetten genommen, halbiert und mit Paraffin in Metallschalen aufgeblickt. Zur weiteren Verarbeitung in der Histologie wurden Schnitte mit 3-5 µm Dicke auf polylysin-beschichteten Objektträgern angefertigt und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

3.2.2.3 Deparaffinierung und Rehydratation der Gewebeproben

Die Gewebeschnitte wurden vor einer Färbung entparaffiniert und rehydriert. Hierfür erfolgte erst eine Inkubation bei 60 °C für 1 Stunde, um das Paraffin zu schmelzen. Danach wurden die Proben entparaffiniert und rehydriert nach folgendem Protokoll:

Tabelle 13: Programm zur Deparaffinierung und Rehydrierung.

Schritt	Lösung	Zeit
Deparaffinierung	Xylol I	10 Minuten
	Xylol II	10 Minuten
Rehydrierung	Ethanol 96 % I	3-maliges Eintauchen
	Ethanol 96 % II	3-maliges Eintauchen
	Ethanol 70 %	3-maliges Eintauchen
	Ethanol 50 %	3-maliges Eintauchen
	VE-Wasser	Eintauchen bis Turbulenzen verschwinden

3.2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Um die Morphologie der Zellen und physiologische Nähe von Modellen zu nativem Gewebe begutachten zu können, wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eingesetzt. Sie wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 14: Protokoll HE Färbung.

Schritt	Lösung	Zeit
Färbung basophiler Strukturen	Hämatoxylin	6-8 Minuten
Abwaschen des Hämatoxylin	VE-Wasser	Bis die Lösung klar ist
Bläuen	Leitungswasser	5 Minuten
Färbung acidophiler Strukturen	Eosin	5 Minuten
Dehydration	Ethanol 70 %	3-maliges Eintauchen
	Ethanol 96 %	2 Minuten

	Isopropanol I	5 Minuten
	Isopropanol II	5 Minuten
	Xylol I	5 Minuten
	Xylol II	5 Minuten

Die Schnitte wurden anschließend mit Entellan® eingedeckt.

3.2.2.5 Immunofluoreszenzfärbung

Immunofluoreszenzfärbungen wurden für unterschiedliche Marker durchgeführt. Die Primärantikörper wurden, wie in Tabelle 7 angegeben, verdünnt; die Sekundärantikörper wurden alle 1:400 verdünnt. Die Auswahl der Sekundärantikörper erfolgte entsprechend der Herkunft des Primärantikörpers. Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 15: Protokoll Immunofluoreszenzfärbung.

Schritt	Lösung	Zeit
Blocken	Blockpuffer	30 Minuten
Primärantikörperbehandlung	Primärantikörper verdünnt in Antikörperverdünnungslösung	Über Nacht bei 4 °C
Waschen	TBST	3 x 5 Minuten
Sekundärantikörperbehandlung	Primärantikörper verdünnt in Antikörperverdünnungslösung	60 Minuten
Waschen	TBST	3 x 5 Minuten

Während und nach der Färbung wurden die Objektträger im Dunklen gehalten. Die Gewebeschnitte wurden in Fluoromount G eingedeckt und bei 4 °C gelagert.

3.2.3 Analysemethoden

3.2.3.1 Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Assay und FDA/PI Färbung

Die Zellviabilität von Modellen und Zellen wurde mit dem MTT-Test (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) gemessen. Proben wurden für 3 h mit MTT-Lösung (1 mg/ml MTT) bei 37 °C inkubiert. Es wurden Bilder aufgenommen und

bei Modellen der Wundbereich mit einer 6 mm Biopsiestanze entfernt. Danach wurde das Formazansalz mit 2-Propanol aus den Modellen gelöst und die Absorption der Proben (je 200 μ l) bei 570 nm mit dem Tecan Infinite 200 spektrophotometrisch gemessen.

Ein weiterer Assay zur Beurteilung der Vitalität von Zellen ist die Färbung mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI), wobei FDA lebende Zellen anfärbt, während PI die Zellkerne toter Zellen anfärbt. Für diesen Assay wurden Proben vor Zugabe der Farbstoffe drei Mal mit PBS⁺ gewaschen. Nach 1-minütiger Inkubation wurde die Lösung abgenommen und erneut einmalig mit PBS⁺ gewaschen, bevor die Proben mikroskopisch analysiert wurden.

3.2.3.2 Bestimmung der verbrannten Modellfläche (BSA)

Die aus dem MTT-Assay gewonnenen Bilder (wie in 3.2.3.1 beschrieben) wurden zur Bestimmung der verbrannten Fläche von Modellen (BSA) verwendet. Lebensfähige Bereiche erschienen aufgrund des gebildeten Farbstoffsalzes in viablen Zellen dunkelblau, während totes Gewebe weiß blieb. Die Fläche beider Farben wurde mit ImageJ gemessen, um den Prozentsatz des geschädigten (weißen) Gewebes zu bestimmen.

3.2.3.3 Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie wurde, wie zuvor beschrieben, analysiert ¹⁵⁴. Dazu wurden Hautäquivalente, je nach Größe, entweder zwischen zwei Titannitrid-Elektroden eines speziell angefertigten Messsystems ¹⁵⁵, oder in einer 24-Well-Platte mit einem selbst entwickelten Messaufsatz, platziert. Das System wurde dann an das Impedanzspektrometer angeschlossen. Um eine Leitfähigkeit zwischen den Äquivalenten und den Elektroden zu erreichen, wurden die Abstände mit EpiLife®-Medium gefüllt, das mit 50 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin und 1,44 mM CaCl₂ ergänzt wurde. 40 logarithmisch verteilte Messpunkte wurden zwischen 1 Hz und 100 kHz aufgenommen, um Einblicke in das gesamte Spektrum der Barrierefunktion zu erhalten. Die gewonnenen Impedanzdaten wurden dann anhand des TEER_{1000Hz} in Ω cm² analysiert.

3.2.3.4 Überstandsmessungen mittels Cedex Analyse

Der Zellstoffwechsel wurde photometrisch mit dem Cedex Bio Analyzer analysiert. Die Konzentration von Glukose, Laktat und Laktatdehydrogenase im Medium wurden mit den entsprechenden Kits gemessen. Die Überstände wurden an den Tagen 0 (vor Verwundung und 3 h nach Verwundung), 1, 3, 7, 10 und 14 gesammelt. Um Stoffwechselprodukte nachweisen zu können, wurden die Modelle 24 Stunden lang vor

den Messungen in 1 ml Medium kultiviert. Frisches Medium wurde als Kontrolle und zur Berechnung des Glukoseverbrauchs gemessen.

Der Glukoseverbrauch (in mM pro 24 h) wurde durch Subtraktion der gemessenen Glukosekonzentration von dem basalen Glukoselevel in frischem Medium berechnet. Die Laktatproduktion (in mM pro 24 h) wurde dann wiederum vom Glukoseverbrauch subtrahiert, um deren Verhältnis darzustellen.

3.2.3.5 Überstandsmessungen mittels CBA Assay

Die Analyse der sezernierten Faktoren im Überstand wurde mit dem CBA Flex Kit entsprechend den Herstelleranweisungen durchgeführt.

3.2.3.6 Quantitative Analyse von histologischen Schnitten mit Hilfe eines Scoring-Systems

Um die Qualität von Epidermismodellen zu bestimmen, wurden entsprechend der physiologischen Struktur der Epidermis 40 histologische Kriterien festgelegt, um die Qualität der Epidermisschichten zu beurteilen. Diese Kriterien wurden in Abhängigkeit vom physiologischen Erscheinungsbild der einzelnen Strata mit aufsteigenden Werten versehen, wobei ein hoher Punktwert einer hohen Ähnlichkeit mit der *in vivo* Haut entspricht. Zusätzlich wurden den einzelnen Schichten Gewichtungsfaktoren zugeordnet, um die Relevanz der Schicht für das gesamte Modell widerzuspiegeln. Der erzielte Score-Wert wurde mit dem Gewichtungsfaktor multipliziert, um den Gesamtpunktwert des Stratums zu berechnen. Die abschließende Addition der Gesamtpunktzahl aller Strata ergab den Punktwert des Gesamtpräparates. Auf diese Weise konnten Werte zwischen 0 und 100 erreicht werden, mit denen ein Modell als "sehr gut oder gut" (+, Werte zwischen 70 und 100), "befriedigend oder ausreichend" (o, Werte zwischen 28 und 69) oder "schlecht oder mangelhaft" (-, Werte zwischen 0 und 27) klassifiziert werden kann. Eine detaillierte Erläuterung des BSGC-Scores mit allen 40 histologischen Kriterien ist in der folgenden Publikation zu finden ¹⁵⁶. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Bilder von drei Abschnitten pro Versuchsgruppe analysiert.

3.2.3.7 Analyse mittels Durchflusszytometrie

Oberflächenmarker von Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Färbung wurde vor Licht geschützt und alle Zentrifugationsschritte bei 350 g für 3 Minuten durchgeführt. Pro Antikörper wurden 1×10^5 Zellen verwendet.

Für intrazelluläre Marker wurden die Zellen zunächst für 20 min in 250 µl Fixation/Permeabilization Buffer (pro Antikörper) inkubiert, welcher anschließend in zwei Waschschritten mit 250 µl BD Perm/Wash Buffer (pro Antikörper) entfernt wurde. Das Zellpellet wurde in 50 µl BD Perm/Wash Buffer (pro Antikörper) resuspendiert, 100 µl

Antikörpermischung in FACS Puffer (Tabelle 6) zugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in 1 ml FACS Puffer pro Antikörper wurden die Zellen in 300-500 µl FACS Puffer resuspendiert und bis zur Messung im Dunklen auf Eis gelagert. Die Messung wurde mit dem FACS Accuri durchgeführt und anschließend mit der Software FlowJo analysiert.

3.2.3.8 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit dem D'Agostino & Pearson Omnibus-Normalitätstest auf Normalität getestet. Für Datensätze, die den Normalitätstest bestanden, wurde ein one-way oder two-way ANOVA unter Verwendung des Tukey-Tests mit mehreren Vergleichen durchgeführt. Für Datensätze, die den Normalitätstest nicht bestanden, wurde ein Kruskal-Wallis-Test unter Verwendung des Dunn-Mehrfachvergleichstests durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen. Die Standardabweichung stellt die Wiederholbarkeit zwischen technischen Replikaten und unabhängigen Testläufen dar.

4 Ergebnisse

Um ein langzeitstabiles, zellbasiertes Therapeutikum für Brandwunden zu entwickeln, wurden zwei Ziele verfolgt. Als erstes wurde die Produktion des benötigten Zellmaterials und mögliche Optionen zu dessen Konservierung untersucht. Hierfür konnten zunächst Substanzen tierischen Ursprungs durch chemisch definierte Alternativen ersetzt werden. Außerdem erfolgte eine Optimierung der Kryokonservierung von Keratinozyten, so dass die gewählten Kühlraten und protektiven Substanzen in einen Prozess zur Lyophilisierung eines medizinischen Produktes implementiert werden können.

Als zweites wurde das bereits bestehende Epidermismodell weiterentwickelt und um eine Verbrennungswunde ersten Grades erweitert. Anhand dieser Modelle wurde die Regeneration einer Verbrennungswunde untersucht und die Möglichkeit einer Behandlung mit Dexpanthenol getestet. Abschließend wurde im Proof of Principle ein mehrschichtiges Vollhautmodell verwendet, um Verbrennungen verschiedener Schweregrade abzubilden und in Zukunft weitere Behandlungsmöglichkeiten zu testen.

4.1 Entwicklung eines zellbasierten Therapeutikums

Zellbasierte Therapeutika werden schon seit vielen Jahren erfolgreich bei der Behandlung verschiedener Verletzungen und Erkrankungen der Haut eingesetzt⁶². Oft können sie jedoch erst bei Bedarf von den Produzenten geordert werden, was eine erhebliche zeitliche Verzögerung bei der Behandlung akuter Wunden mit sich bringt⁷⁹. Um ein zellbasiertes Produkt zu entwickeln, wurden humane Keratinozyten standardisiert isoliert, kultiviert, analysiert und anschließend verschiedene Möglichkeiten der Konservierung getestet. Um in Zukunft die Gefriertrocknung und eine GMP konforme Produktion des Produktes gewährleisten zu können, wurden außerdem chemisch definierte Medienzusätze und CPAs verwendet und Substanzen tierischen Ursprungs ersetzt.

4.1.1 Etablierung von Methoden zur serumfreien Isolation und Kultivierung von Keratinozyten

Als Quelle für zukünftiges Zellmaterial sollen Keratinozyten aus adulter Haut isoliert werden. Hierfür wurde als Proof of Concept ein bereits bestehendes Protokoll zur Isolation von Zellen aus juvenilem Gewebe verwendet (Standardprotokoll mit FCS) und gemäß GMP-Regularien angepasst, d.h. Serum und tierische Komponenten wurden ersetzt oder vermieden (Protokoll ohne FCS). Hautbiopsate, die in der plastischen Chirurgie als Abfallmaterial anfallen, wurden vom Universitätsklinikum Graz zur Verfügung gestellt und nach Würzburg geliefert, wo 24 h nach Entnahme der Biopsate

die Zellisolation startete (Abbildung 5A). Ein Teil des Biopsats wurde für zwei weitere Tage bei 4 °C gelagert, um die Verwendbarkeit des Materials auch nach längerer Lagerung (z.B. durch verzögerten Transport) zu testen.

4.1.1.1 Isolation und Kultivierung primärer Zellen unter chemisch definierten Konditionen

Ein erster Vergleich der Viabilität der Zellen zeigte, dass diese nach der (direkten) Isolation für beide Konditionen vergleichbar war und über 80 % lag. Durch die verlängerte Lagerung bei 4 °C sank sie auf ca. 60 % (Abbildung 5B). Bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen war jedoch erkennbar, dass bei der Isolation ohne FCS die Ausbeute an Keratinozyten mit ca. 2×10^5 Zellen pro cm^2 deutlich geringer ausfiel, als bei dem Standardprotokoll mit ca. 1×10^6 Zellen pro cm^2 . Dies lag an einem erhöhten Arbeitsvolumen durch Zugabe einer FCS-Ersatzlösung, welches das mechanische Auslösen der Zellen aus dem Gewebe erschwerte. Bei der erneuten Isolation von Keratinozyten nach 2 Tagen wurde das Volumen durch Einfügen eines Zentrifugationsschrittes verringert, was zu einer erhöhten Ausbeute an Zellen führte (ca. $7,5 \times 10^5$ Zellen pro cm^2).

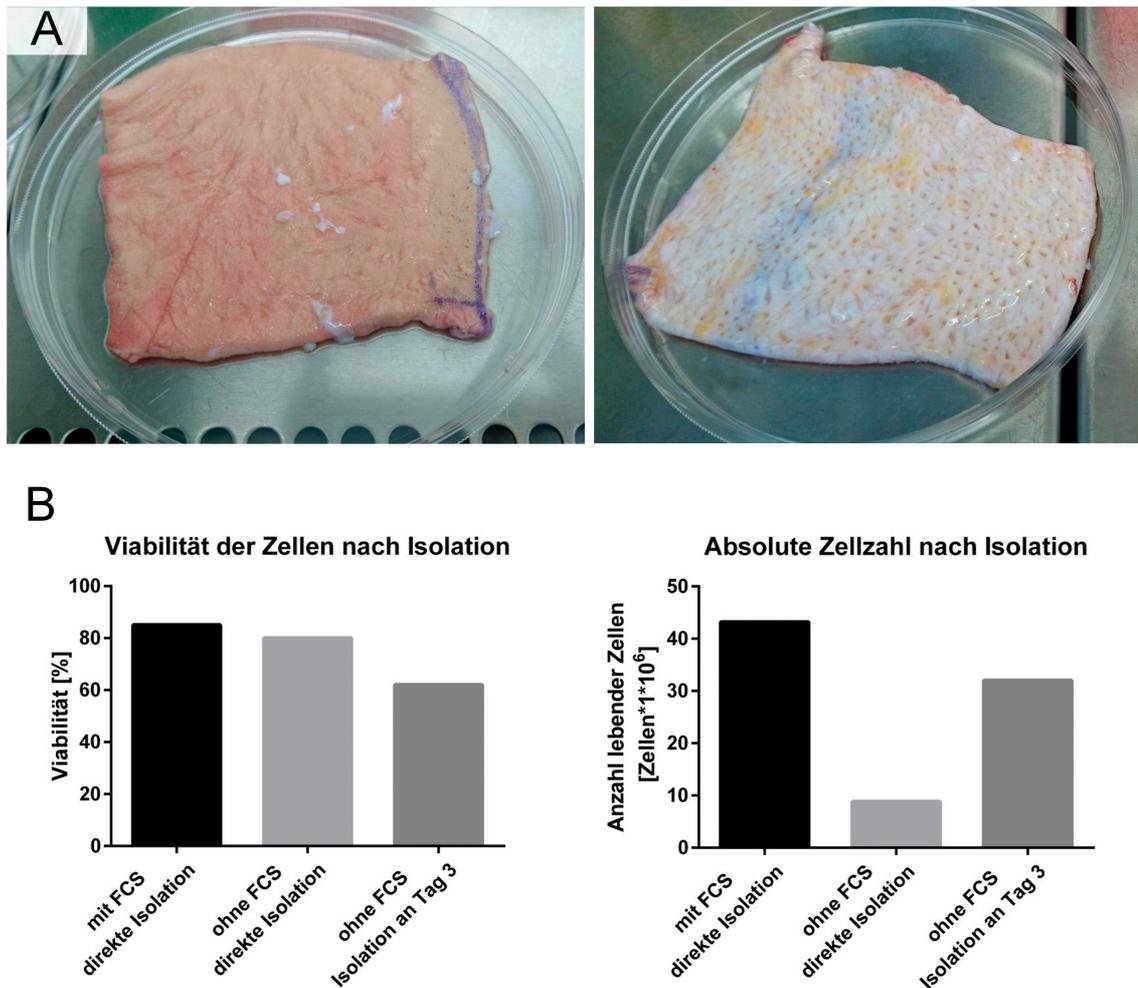


Abbildung 5: Isolation von Keratinozyten aus adulter Haut.

(A) Hautbiopsat von einem adulten Spender. Links ist das Biopsat von oben zu sehen, rechts ein Bild der dermalen Seite des Biopsats mit Resten von adipogenem Gewebe (gelb). (B) Viabilität und absolute Zellzahlen nach Isolation (n=1). Die Viabilität der Zellen nahm bei Isolation nach zwei Tagen Lagerung ab (von 80 % auf 60 %). Bei Isolation ohne FCS war eine deutlich geringere Ausbeute an isolierten Zellen erkennbar, die nach Anpassung des Isolationsprotokolls anstieg.

Um die Auswirkung von Konditionen ohne tierische Komponenten während der Kultur der Zellen zu untersuchen, wurden anschließend juvenile Keratinozyten ab Passage 2 in Standardmedium (SM; enthält BPE) und chemisch definiertem Medium (ACFM/animal component free medium; GMP konform) expandiert. Während sich keine Unterschiede bei der Viabilität der Zellen zeigten, konnte ein leichter Anstieg der Verdopplungszeit bei Kultur mit ACFM Medium beobachtet werden. Dieser Anstieg war vor allem nach Passage 3 zu erkennen (Abbildung 6A).

Mikroskopisch zeigten die Zellen in beiden Medien über die gesamte Kulturdauer die typische „Kopfsteinpflaster“-Morphologie von Keratinozyten (Abbildung 6B). Am Ende der Passage 3 konnte in beiden Konditionen die beginnende Differenzierung der Zellen in Kultur beobachtet werden, die mit der Ausbildung großer, runder Zellen und der

begrenzten Passagenzahl primärer Zellen einhergeht. Hier bestätigt sich die erhöhte Verdopplungszeit bei Verwendung von BPE - freiem Medium, da am Ende der Passagen 2 und 3 die Keratinozyten in E1 Medium einen dichteren Monolayer ausgebildet hatten, als die Zellen in ACFM Medium.

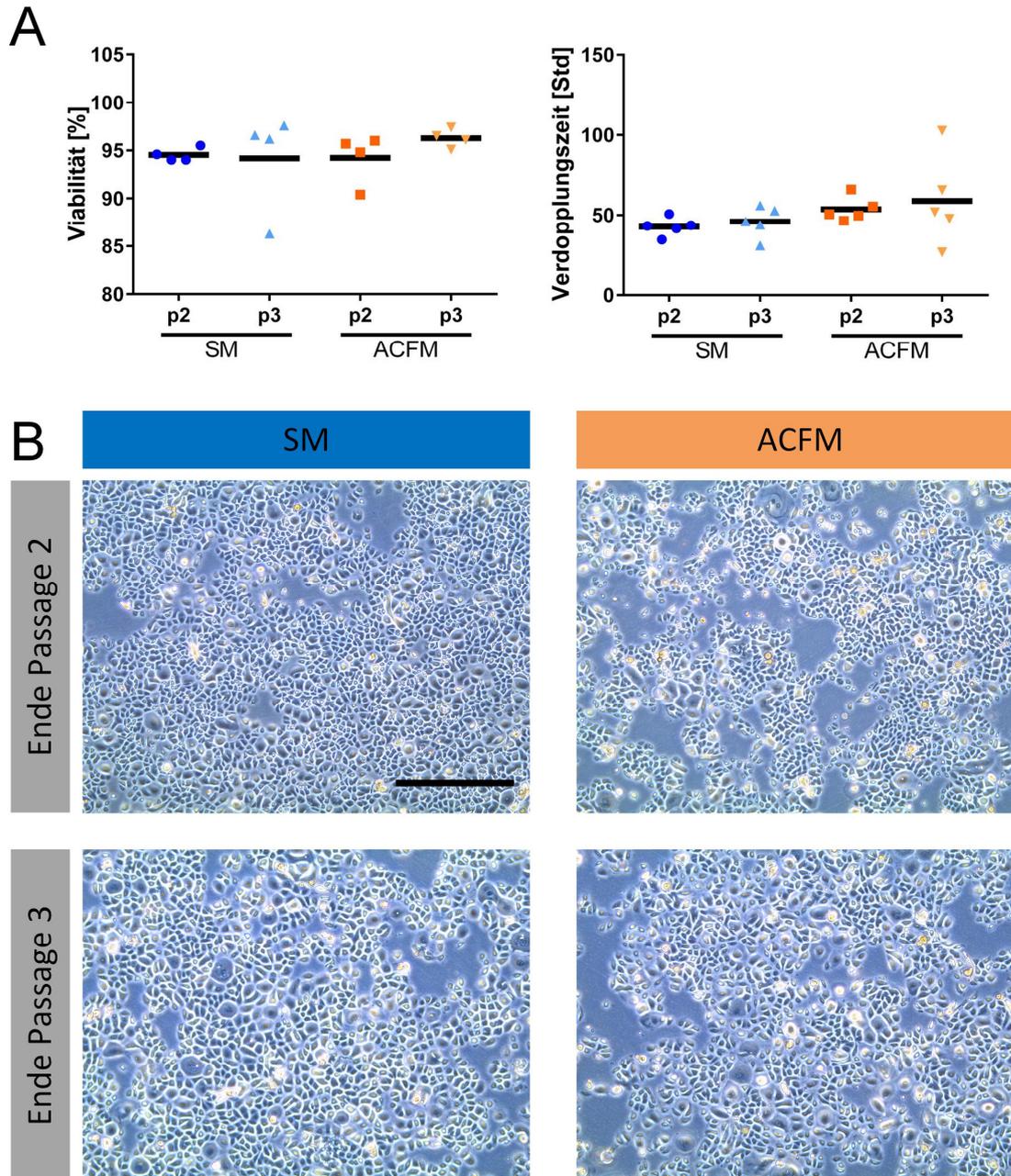


Abbildung 6: Kultur von Zellen in serumhaltigen und -freien Konditionen.

(A) Viabilität und Verdopplungszeit von Keratinozyten in Standardmedium (SM) und serumfreiem Medium (ACFM) (N=5; Mittelwert) nach Passage 2 und Passage 3. (B) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen bei Kulturende. Maßstabsbalken entspricht 450 μ m.

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Keratinozyten ist die Fähigkeit unter geeigneten Kulturbedingungen zu differenzieren und epidermales Gewebe zu bilden. Unter **Standardbedingungen** bedeutet dies eine Expansion in **Standardmedium** (SM; enthält BPE) und einen Aufbau von Modellen in **Passage 3** der Keratinozytenkultur. Deshalb war der nächste Schritt die Untersuchung, ob Zellen durch Kultur unter chemisch definierten Konditionen über ein oder zwei Passagen diese Fähigkeit beibehalten können. Hierfür wurden Zellen, wie oben beschrieben, kultiviert und in Passage 3 und Passage 4 jeweils epidermale Modelle (unter BPE-haltigen Konditionen) hergestellt und kultiviert. Die Analyse erfolgte nach 7, 14 und 21 Tagen mittels Messung der Viabilität, der Barrierefunktion und Begutachtung der morphologischen Beschaffenheit der Modelle.

Die optische Dichte des **MTT-Assays** lag zu allen Zeitpunkten und für alle Gruppen bei Werten zwischen 0,8 und 1,1 (Abbildung 7A). Trotz vergleichbarer Mittelwerte zeigte sich jedoch, dass bei Modellen, deren Zellen in ACFM Medium expandiert wurden, vor allem bei frühen Messpunkten, die Schwankungen innerhalb der Gruppen geringer ausfielen, als bei Modellen aus BPE-haltig vorkultivierten Zellen. Dies spiegelt sich auch in den Standardabweichungen der Gruppen wieder. Für die Gruppe SM lag die Standardabweichung in Passage 4 an Tag 7 und Tag 14 bei jeweils 0,4, während sie bei der ACFM Gruppe jeweils nur 0,2 betrug.

Die **Impedanz-Messung** bei einer Frequenz von 1000 Hz zeigte einen Anstieg der Werte aller Gruppen zwischen Tag 7 und Tag 14, die mit der Reifung der Modelle und Ausbildung des Stratum Corneum einherging (Abbildung 7B). Zwischen Tag 14 und Tag 21 konnte kein weiterer Anstieg, sondern ein leichter Abfall der Werte beobachtet werden. Die höchsten Werte erreichten zu allen Zeitpunkten Modelle der Gruppe p3 SM mit 1,0 k Ω cm² an Tag 7, 2,2 k Ω cm² an Tag 14 und 1,7 k Ω cm² an Tag 21. Die Modelle in Passage 4 erzielten, unabhängig von ihrer Vorkultur, zu allen Zeitpunkten signifikant geringere Ergebnisse mit 0,8 k Ω cm² an Tag 7, 1,8 k Ω cm² an Tag 14 und 1,2 k Ω cm² an Tag 21 bei Vorkultur in Standardmedium und 0,6 k Ω cm², 1,3 k Ω cm², bzw. 1,2 k Ω cm² bei Vorkultur in chemisch definiertem Medium. Die Gruppe p4 ACFM zeigte somit auch im Vergleich zur Gruppe p3 ACFM signifikant geringere Werte an Tag 7 und 14.

Auch bei der Messung der elektrischen Barriere war der Trend erkennbar, dass BPE-haltig vorkultivierte Modelle eine deutlich höhere Varianz innerhalb ihrer Versuchsgruppen aufwiesen. So betrug die Standardabweichung für Modelle mit Zellen in Passage 3 aus Standardmedium, 685 Ω cm² an Tag 7, 1311 Ω cm² an Tag 14 und 583 Ω cm² an Tag 21. Bei Zellen aus chemisch definiertem Medium lag sie lediglich bei 409 Ω cm² an Tag 7, 865 Ω cm² an Tag 14 und 471 Ω cm² an Tag 21, was eine Differenz

von bis zu 40 % (Tag 7) darstellte. Noch stärker waren diese Unterschiede in Passage 4 erkennbar. Hier konnte mit Werten von $843 \Omega\text{cm}^2$ (Tag 7), $1956 \Omega\text{cm}^2$ (Tag 14) und $1081 \Omega\text{cm}^2$ (Tag 21) für die SM Gruppe eine noch höhere Standardabweichung festgestellt werden. Zwar stiegen diese Werte auch in der ACFM Gruppe an, jedoch in einem geringeren Ausmaß mit $691 \Omega\text{cm}^2$ (Tag 7), $1130 \Omega\text{cm}^2$ (Tag 14) und $471 \Omega\text{cm}^2$ (Tag 21). Vor allem an Tag 21 resultierte dies in einer Differenz der Standardabweichung von 56 % zwischen Modellen aus Zellen die mit BPE vorkultiviert wurden und Zellen aus chemisch definiertem Medium.

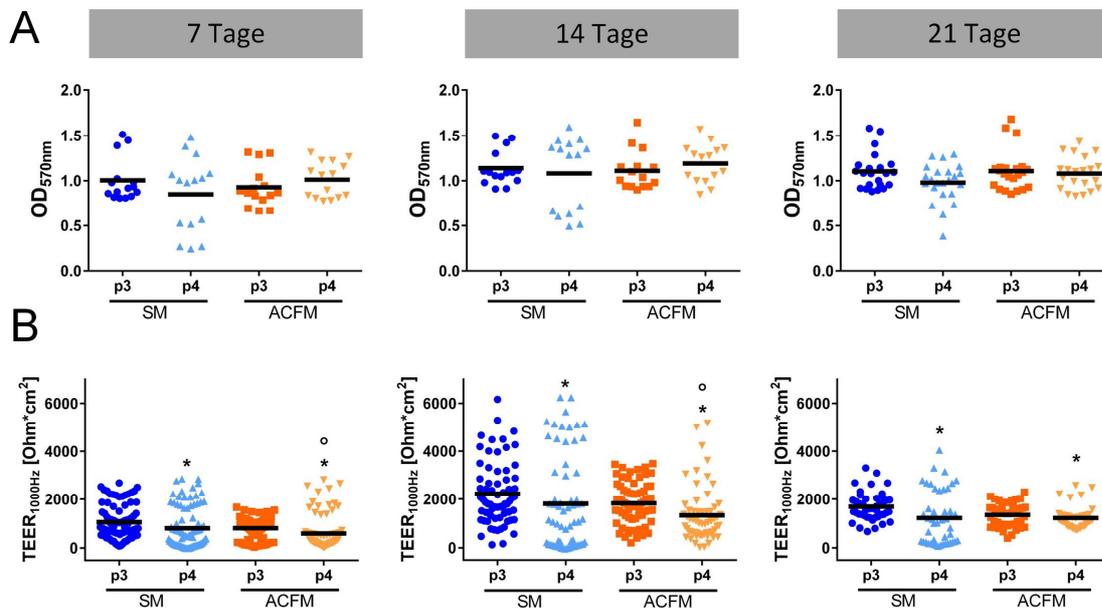


Abbildung 7: Viabilität und Barriereeigenschaft von Modellen nach Vorkultur in BPE-haltigen und chemisch definierten Konditionen.

(A) Viabilität von Modellen nach 7, 14 und 21 Tagen Kulturdauer. Die Viabilität war über die gesamte Kulturdauer konstant. In der Gruppe p4 SM zeigte sich eine weite Streuung der Werte, die mit zunehmender Kulturdauer geringer wurde. (n=5; Mittelwert) (B) Impedanzmessung von Modellen nach 7, 14 und 21 Tagen Kulturzeit. An allen Messpunkten war ein signifikanter Unterschied von Modellen in Passage 4 zu erkennen im Vergleich zu Kontrollmodellen (p3 SM). An Tag 7 und 14 zeigte sich außerdem ein signifikanter Unterschied zwischen Modellen in Passage 3 und Passage 4, deren Zellen unter chemisch definierten Konditionen vorkultiviert wurden. (N=5; Mittelwert) * $p < 0,05$ im Vergleich zu p3 SM. ° $p < 0,05$ im Vergleich zu p3 ACFM.

Neben der Barriereeigenschaft ist die **histologische Betrachtung** der Modelle die wichtigste Analyse, um deren Qualität festzustellen. Hierfür wurden Modelle mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Abbildung 8) und anschließend mittels eines Scores zur Bewertung der Epidermisqualität analysiert (Abbildung 9) ¹⁵⁶.

Um einen Eindruck über die histologischen Färbungen zu geben, wurden **exemplarische Bilder** aller Gruppen ausgewählt und in Abbildung 8 dargestellt.

An **Tag 7** waren die Präparate noch sehr dünn und das Stratum corneum noch kaum ausgebildet. Das Stratum granulosum war nicht zu erkennen und im Stratum spinosum fanden sich, neben einer geringen Zahl von Zelllagen, vereinzelt leichte Spalträume an den Zellen. Das Stratum basale zeichnete sich durch kubische Anordnung der Zellen mit hypochromatischen Zellkernen aus. In Anbetracht dieser Charakteristika ergab sich ein Punktwert von ca. 45 Punkten für diese Modelle der Gruppen p3 SM, p3 ACFM und p4 ACFM. Lediglich Modelle aus der Gruppe p4 SM zeigten eine schlechtere Qualität, die sich unter anderem durch eine verringerte Zahl an Zellschichten und eine ungleichmäßige Anordnung der Zellen im Stratum basale auszeichnete. Dies spiegelte sich auch in einem verringerten BSGC Score von 38 Punkten wieder.

Die gezeigten Präparate von **Tag 14** erreichten durchschnittlich Werte zwischen 64 und 68 Punkten für die Gruppen p3 SM, p3 ACFM und p4 ACFM. Die Modelle zeichneten sich durch ein mehrlagiges Stratum corneum mit multiplen, nicht kontinuierlichen, längsförmigen Defekten aus, unter dem ein schwach ausgeprägtes Stratum granulosum erkennbar war. Auch hier fanden sich vereinzelt Spalträume im Stratum spinosum, während die Zellen des Stratum basale ein leicht abgeflachtes Epithel ausbildeten, was jedoch keine Defekte aufwies. Auch an Tag 14 erzielten Modelle der Gruppe p4 SM mit 55 Punkten durchschnittlich ein schlechteres Ergebnis im BSGC Score. Dies war bedingt durch ein deutlich dünneres Modell, aufgrund fehlender Zellschichten und einem Stratum corneum, das viele aufgefiederte Defekte aufwies.

Die abschließenden Präparate der Gruppen p3 SM, p3 ACFM und p4 ACFM von **Tag 21** ähnelten den Modellen von Tag 14. Das Stratum corneum war durch die längere Kulturdauer noch stärker ausgeprägt und zeigte ähnliche Defekte wie an Tag 14, während auch hier das Stratum granulosum nur schwach ausgeprägt war. Das Stratum spinosum zeigte neben einigen Spalträumen vereinzelt Konglomerate, die auch im Stratum basale auftraten, welches ebenfalls leicht abgeflacht erschien. Hierdurch ergab sich ein abschließender Score Wert zwischen 61 und 66 Punkten. Wie an beiden vorangegangenen Zeitpunkten, zeichnete sich auch hier eine schlechtere Qualität der Gruppe p4 SM ab, die nur 52 Punkte im BSGC Score erreichte. Ähnlich wie an Tag 14 waren die Modelle dünner, mit weniger Zellschichten im Stratum spinosum. Außerdem konnten im Stratum corneum Keratosen entdeckt werden, die durch eine mangelhafte Differenzierung der Zellen hervorgerufen werden.

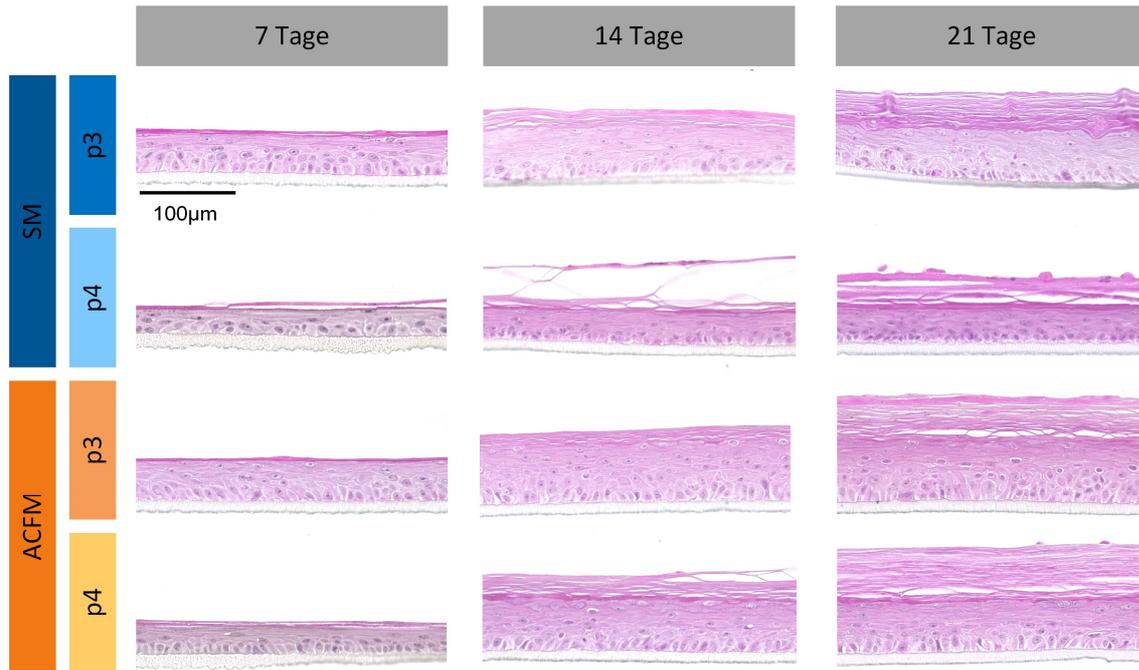


Abbildung 8: Hämatoxylin und Eosin Färbung von Modellen nach Vorkultur in BPE-haltigen und chemisch definierten Konditionen.

Exemplarische Bilder der HE Färbung von Modellen aller Gruppen nach 7, 14 und 21 Tagen Kulturzeit. Nach 14 Tagen Kultur zeigte sich die Ausbildung der charakteristischen Strata der Epidermis. Im Zeitraum zwischen 14 und 21 Tagen nahm die Dicke des Stratum corneum deutlich zu.

Die histologische Begutachtung der Modelle stimmte in vielen Punkten mit den Ergebnissen der Impedanzmessungen überein (Abbildung 8 & 9). Auch hier konnte eine initiale Zunahme der Werte von 40-46 Punkten an Tag 7 auf 54-67 Punkte an Tag 14 beobachtet werden, die dann jedoch stabil blieben und an Tag 21 zwischen 51 und 65 lagen.

Hier zeigte sich vor allem an Tag 21, dass Modelle der Gruppe SM p4 mit einem Score von 51 Punkten eine signifikant schlechtere Qualität aufwiesen als Modelle, deren Zellen in chemisch definierten Konditionen expandiert wurden (mit 65 Punkten in Passage 3 und 62 Punkten in Passage 4). Während vor allem an Tag 7 die Werte der analysierten Modelle aller Gruppen mit Standardabweichungen zwischen 14 und 25 Punkten sehr weit streuten, nahm dieser Effekt mit zunehmender Kulturdauer (Standardabweichung an Tag 14 zwischen 4 und 18 Punkten; an Tag 21 zwischen 5 und 10 Punkten) wieder ab. Obwohl im Mittel alle Werte im Bereich befriedigender bis ausreichender Qualität lagen, konnte auch hier der Trend beobachtet werden, dass nach Zellexpansion in chemisch definiertem Medium eine höhere Präzision mit stabileren Ergebnissen erreicht wurde. So betrug die durchschnittliche Standardabweichung bei BPE-haltig vorkultivierten Modellen 14 Punkte, während sie bei Zellen aus chemisch definierter Vorkultur lediglich bei 9 Punkten lag.

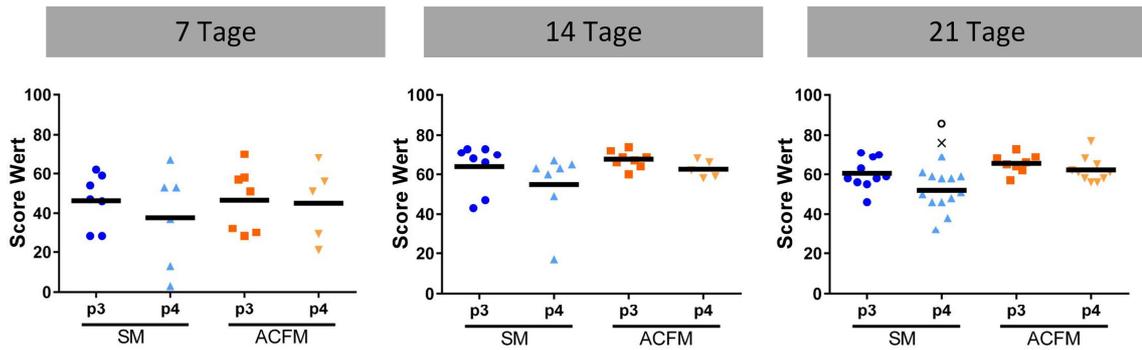


Abbildung 9: Bewertung der histologischen Färbung mittels BSGC Score.

BSGC Score von Modellen nach 7, 14 und 21 Tagen Kultur. Der Score nahm über die Kulturdauer zu. An Tag 7 und in der Gruppe p4 SM zeigte sich eine weite Streuung der Werte, die mit zunehmender Kulturdauer geringer wurde. (N=5; Mittelwert).

4.1.1.2 Charakterisierung von Keratinozyten mittels Durchflusszytometrie

Die isolierten und kultivierten Zellpopulationen sollten durch Färbung mit spezifischen Antikörpern und anschließender Messung im Durchflusszytometer analysiert und charakterisiert werden. Mit dieser Methode sollte außerdem auch die Reinheit der Zellpopulation bestimmt werden. Hierfür wurden spezifische Antikörper als Marker für Keratinozyten (**Zytokeratin 14**; K14), proliferative Zellen (**Ki-67**), Fibroblasten (**Vimentin**) und differenzierte, bzw. differenzierende Keratinozyten (**Zytokeratin 1/10**; K1/K10) ausgewählt und mit drei verschiedenen Zellchargen von juvenilen Keratinozyten getestet. Da Keratinozyten bis zu 95 % der Zellen der Epidermis ausmachen¹⁵⁷, sollten als Freigabekriterium für eine Zellpopulation hier über 90 % der Zellen positiv für K14 sein.

Nahezu 100 % der kultivierten Zellen wiesen eine positive Färbung des Markers **K14** auf, die konstant von Passage 0 bis Passage 2 nachweisbar war (Abbildung 10A). Die Färbungen mit **Zytokeratin 1 und 10** zeigten außerdem, dass bis Passage 2 nur ein geringer Teil der Keratinozyten in Kultur differenziert sind. Gleichzeitig konnte eine Färbung mit **Ki67** beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Zellen nach der Isolation proliferativ sind. Bezüglich der Tests auf Reinheit der Zellpopulationen zeigte sich bei Keratinozyten jedoch, dass diese **Vimentin** exprimieren und deshalb keine spezifische Diskriminierung der verschiedenen Zelltypen durch diesen Marker möglich ist. Wurden jedoch 50 % dermale Fibroblasten zu der Zellsuspension gemischt, um eine Verunreinigung der Population mit anderen Zelltypen zu simulieren, konnte dies mit Hilfe des Markers Keratin 14 detektiert werden (Abbildung 10B)

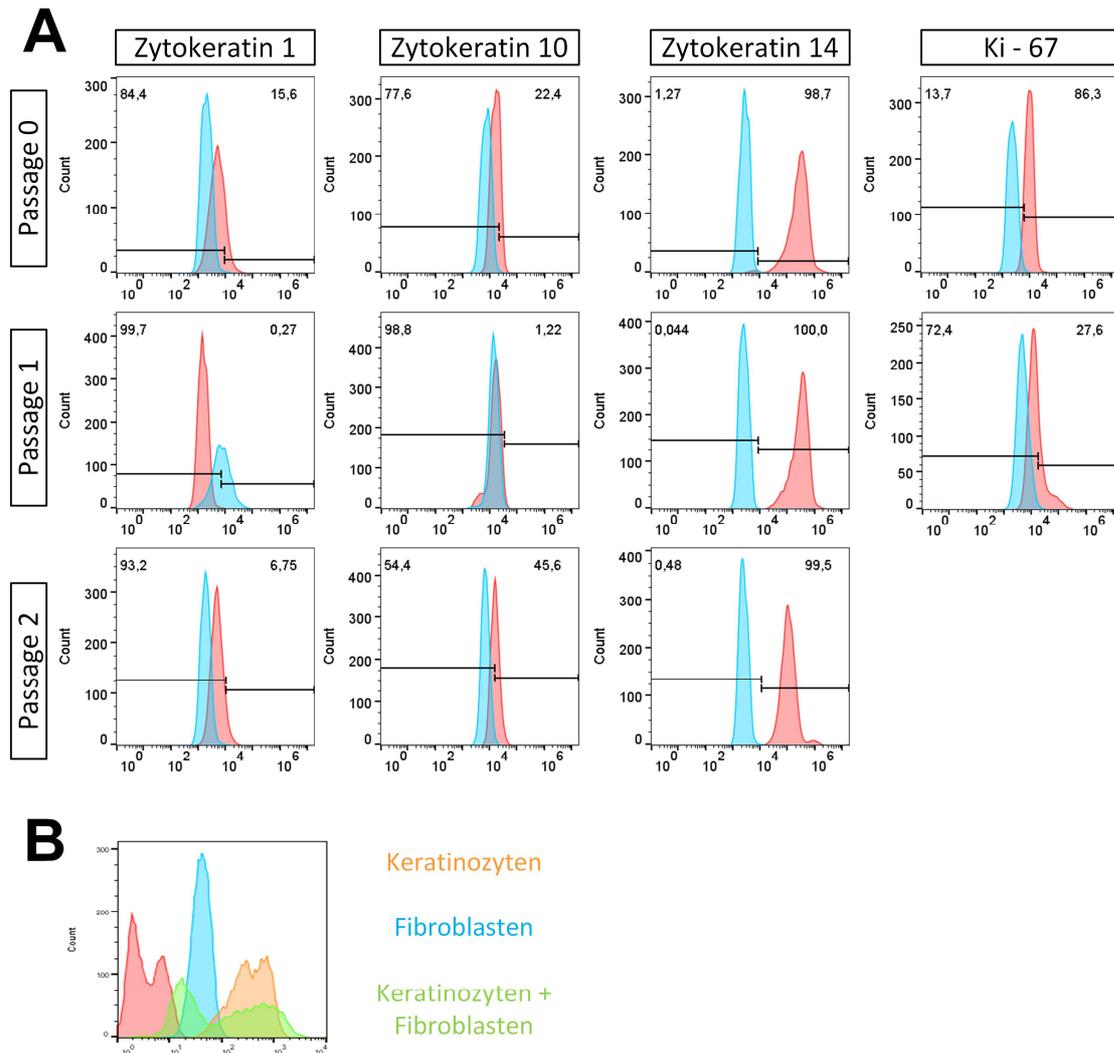


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der Zellen.

(A) Färbung der Zellen mit den Markern Zytokeratin 1, 10, 14 und Ki67. Die Ig-Kontrollen der Antikörper sind in blau dargestellt, die gemessenen Proben in rot. Die Analyse wurde in 3 aufeinanderfolgenden Passagen (0, 1, 2) durchgeführt (N=3). Gezeigt werden Daten von einem Spender. (B) Zytokeratin 14 Färbung verschiedener Zellpopulationen. Verwendet wurden reine Keratinozyten (orange), reine Fibroblasten (blau) und eine Mischkultur (grün) (N=1).

4.1.2 Kryokonservierung des Zellmaterials

Um ein zellbasiertes Produkt über lange Zeit zu konservieren, sollte zunächst die Kryokonservierung der Keratinozyten in verschiedenen Formen optimiert werden. Als Ansätze hierfür wurden gewählt, die Zellen passend für eine spätere Wundaufgabe in Suspension und adhärent als Monolayer einzufrieren. Nach Optimierung der Kryokonservierung können die hier ermittelten Parameter (Geschwindigkeit und CPA) anschließend in den Lyophilisierungsprozess der Zellen für ein medizinisches Produkt implementiert werden.

4.1.3 Kontrolliertes Einfrieren von Zellen in Suspension und als adhärenter Zellrasen

Um einen kontrollierten Einfriervorgang zu ermöglichen, wurde der IceCube 14S von SyLab verwendet. Da dieser flüssigen Stickstoff vernebelt in eine Kühlkammer einspritzt, sind Kühlraten von bis zu 60 K/min möglich. Außerdem erlauben separate Temperatursonden für die Einfrierkammer und Proben eine genaue Überwachung und Dokumentation des Einfrierprozesses. Während bei der klassischen Kryokonservierung im Labor Zellen mit einer Kühlrate von 1 K/min auf - 80 °C abgekühlt und dann zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden, sollten hier schnellere Einfrierraten, wie sie bei der Lyophilisierung angewendet werden, getestet werden ¹⁵⁸. Außerdem wurden neben DMSO auch andere Kryoprotektiva (CPAs) getestet, die bei der Gefriertrocknung eines medizinischen Produkts verwendet werden können.

Zunächst wurde überprüft, ob die programmierten Kühlraten mit denen in der Probe übereinstimmen. Hierfür wurden Kryoröhrchen mit Medium und 10 % DMSO bei 10 K/min und 40 K/min und 12-Well Zellkulturplatten bei 20 K/min eingefroren. Es zeigte sich eine Diskrepanz von bis zu 65 % zwischen programmierter und erreichter Geschwindigkeit (Abbildung 11). Während die Suspension bei programmierten 10 K/min im Kryoröhrchen und 20 K/min in der Wellplatte jeweils ca. 80 % der gewünschten Kühlrate erreichen konnte (8 K/min bzw. 16 K/min) zeigte sich bei der schnellsten Einfriergeschwindigkeit ein Unterschied von 65 %, was bedeutet, dass die Flüssigkeit nur mit 14 K/min eingefroren wurde.

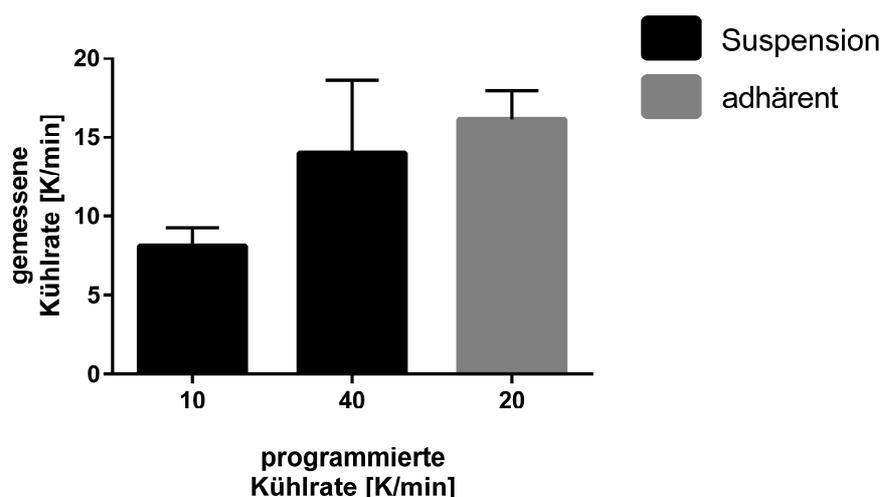


Abbildung 11: Verwendete Kühlraten für die Kryokonservierung von Zellen in Suspension und adhärenente Zellen. Keratinozyten wurden in Suspension mit 10 K/min (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung) und 40 K/min (n=2; Mittelwert ± Standardabweichung) oder adhärenent mit 20 K/min (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung) eingefroren.

Als nächstes wurden Zellen mit verschiedenen Kryoprotektiva in Suspension eingefroren, da die in der Zellkultur standardmäßige Zugabe von 10 % DMSO zum Kulturmedium bei der Lyophilisierung nicht möglich ist. Die genutzten CPAs waren, neben 10 % DMSO als Kontrolle, Hydroxyethylstärke (HES) und Trehalose in alleiniger Anwendung oder mit Supplementierung einer geringen Konzentration von DMSO (2 %). Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen, wie im Labor üblich, bei 1 K/min eingefroren.

Zunächst wurde betrachtet, wie viele Keratinozyten den Einfrier- und Auftauvorgang überlebten. Die Konservierung von Zellen mit **10 % DMSO** als CPA war am effektivsten, wenn eine Kühlrate von 1 K/min gewählt wurde (Abbildung 12B). Bei schnellerem Einfrieren mit 10 K/min oder 40 K/min, überlebten nach dem Auftauen ca. $8,5 \times 10^5$, bzw. $8,1 \times 10^5$ von ursprünglich 1×10^6 eingesetzten Zellen.

Bei dem Einsatz von **HES** überlebten für 1 K/min und 10 K/min jeweils ca. 90 % der Keratinozyten, was durch Zugabe von 2 % DMSO geringfügig gesteigert werden konnte (4 % bei 10 K/min). Lediglich bei der schnellsten Kühlrate fiel die Anzahl an lebenden Zellen auf $8,4 \times 10^5$ ab. Wurde zusätzlich DMSO eingesetzt, erhöhte sich hier die Zellzahl jedoch um 7 % auf über 9×10^5 Zellen. Im direkten Vergleich zu 10 % DMSO zeigte sich also, dass durch Nutzung von HES als CPA, vor allem bei schnelleren Einfriergeschwindigkeiten, bis zu 9 % mehr Keratinozyten überlebten.

Mit **Trehalose** als CPA lag die Ausbeute für die Kühlrate 1 K/min 10 % unter der von HES. Die Zahl der lebenden Zellen nach Einfrieren mit den weiteren Kühlraten war hier jedoch vergleichbar. Auch in dieser Versuchsgruppe erhöhte die Supplementierung von 2 % DMSO die Ausbeute an lebenden Zellen um 6 % bei 1 K/min und 40 K/min. Verglichen mit Zellen, die mit 10 % DMSO eingefroren wurden, zeigte reine Trehalose vergleichbare Ergebnisse für schnelle Kühlraten, während sie bei 1 K/min bis zu 14 % weniger lebende Zellen erreichte.

Bei der Untersuchung, wie viele Keratinozyten durch den Einfrier- und Auftauprozess verloren gingen und nicht mehr detektiert werden konnten (Abbildung 12A), zeigte sich, dass vor allem durch Zugabe von 10 % DMSO oder HES zum Medium ein hoher Schutz der Zellen vor Schäden erreicht wurde. Lediglich bei Konservierung mit Trehalose zeigte sich ein Trend, dass mehr Zellen zerstört wurden und unabhängig ihrer Viabilität nach dem Auftauen nicht mehr gezählt werden konnten.

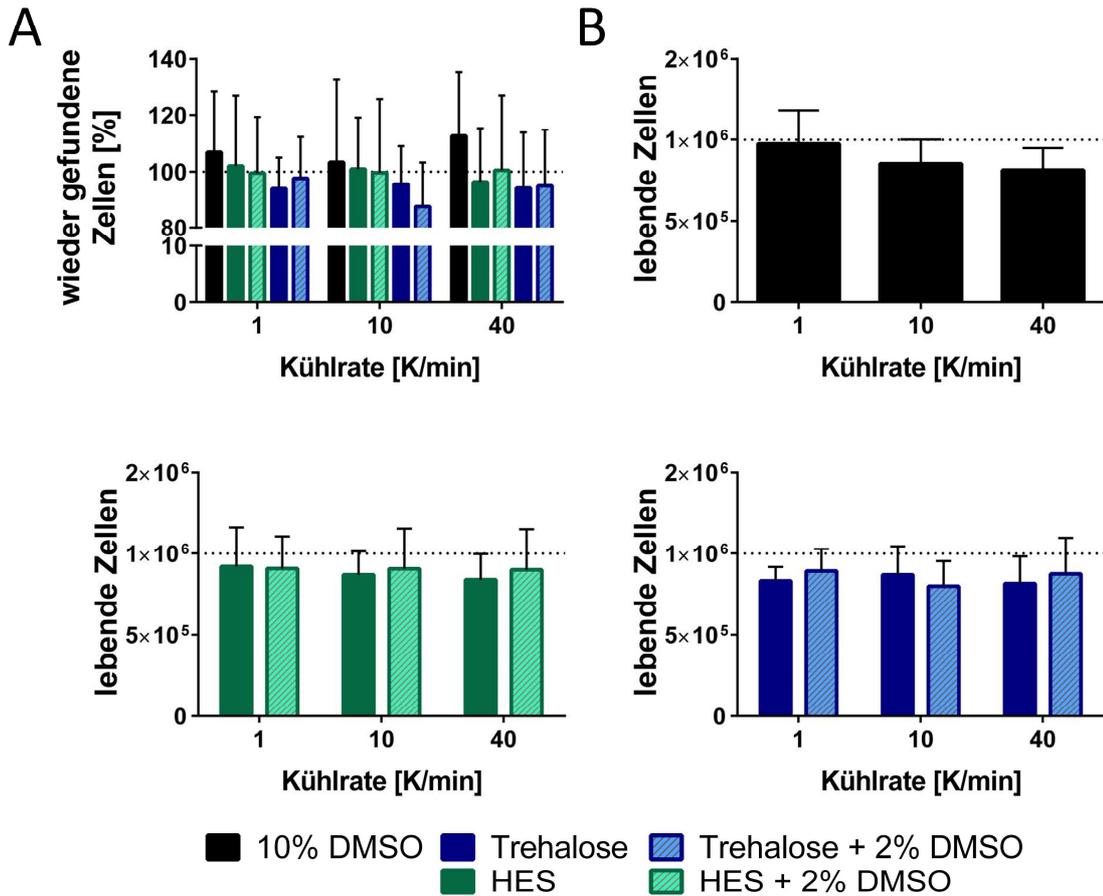


Abbildung 12: Kryokonservierung von Zellen in Suspension.

(A) Anzahl an Zellen, die, unabhängig ihrer Viabilität, nach dem Auftauen wiedergefunden werden konnten. (B) Anzahl an viablen Zellen nach Einfrieren und Auftauen mit 10 % DMSO, Hydroxyethylstärke (HES), HES + 2% DMSO, Trehalose, und Trehalose + 2% DMSO bei unterschiedlichen Kühlraten (1 K/min, 10 K/min, 40 K/min). (N=3; Mittelwert \pm Standardabweichung).

Als nächstes wurde überprüft, ob Keratinozyten auch adhärent eingefroren werden können. Hierfür wurden Zellen in 12-Well-Platten, mit denselben Kryomedien wie oben beschrieben, bei 20 K/min eingefroren. Nach Lagerung bei -80°C wurden die Kulturen aufgetaut und direkt, bzw. sechs Tage später, mittels Lebend-Tot-Färbung analysiert. Hierbei wurden **lebende Zellen in Cyan** dargestellt, während **tote Zellen Magenta** gefärbt wurden.

Im Folgenden sind exemplarisch die Aufnahmen der Ergebnisse eines Spenders dargestellt (Abbildung 13), während die Bilder von zwei weiteren Spendern in den Supplementen zu finden sind (Supplementäre Abbildung 1; Supplementäre Abbildung 2). Vor der Kryokonservierung war in allen Wells ein Zellrasen zu erkennen, der sich durch ein starkes Lebend-Signal auszeichnete. Vereinzelt hatten sich Zellen abgekugelt, die jedoch nicht tot waren. Direkt nach dem Auftauen war in Proben mit **10 % DMSO** die Anzahl an lebenden Keratinozyten stark reduziert und es konnten stattdessen viele, zum Teil bereits abgerundete, Zellen in Magenta beobachtet werden. Knapp eine Woche

später hatte sich ein dichter Zellrasen aus viablen Zellen gebildet, welche zum Teil eine große, runde Morphologie angenommen hatten. Vereinzelt konnten auch hier tote Zellen detektiert werden, die meist bereits abgelöst über dem Zellrasen schwammen. Bei der Konservierung mit **HES** zeichnete sich ein sehr ähnliches Bild ab. Direkt nach dem Auftauen konnten viele tote, abgerundete Zellen beobachtet werden, während nach sechs Tagen in Kultur ein konfluenter Zellschicht vorlag. Die Zugabe von **2 % DMSO zu HES** erzielte keinen zusätzlichen Effekt, außer, dass direkt nach dem Auftauen, trotz der deutlich reduzierten Anzahl an lebenden Keratinozyten, keine toten Zellen gefunden wurden. Im Gegensatz dazu war beim Einfrieren mit **Trehalose**, direkt nach dem Auftauen, das Cyan Signal verschwunden und es konnte fast ausschließlich eine magentafarbene Färbung detektiert werden. Auch eine Woche nach Kultur hatte sich in diesen Wells kein Zellrasen abgezeichnet und es wurden lediglich tote Keratinozyten mit starkem Magenta-Signal im Zellkern gefunden. Wurden Keratinozyten adhären mit **Trehalose und DMSO** eingefroren, zeigten sich direkt nach dem Auftauen einige Magenta gefärbte Zellen und ein starker Rückgang an Cyan-Signal. Keratinozyten, die Cyan gefärbt waren, zeigten außerdem eine Veränderung ihrer Morphologie und begannen sich abzukugeln. Nach sechs Tagen konnte, bis auf einige Ausnahmen, ausschließlich ein Signal in Magenta detektiert werden. Verbleibende Keratinozyten zeigten zudem eine Doppelfärbung für Cyan und Magenta (weiß), die auf ein Absterben der Zellen hinweist. Es ist jedoch erwähnenswert, dass bei einem der 3 Spender bei der Kombination aus Trehalose und DMSO nach sechs Tagen eine Regeneration der Zellen und die Ausbildung eines dichten Zellrasens beobachtet werden konnte, die mit den anderen CPAs vergleichbar waren (Supplementäre Abbildung 2).

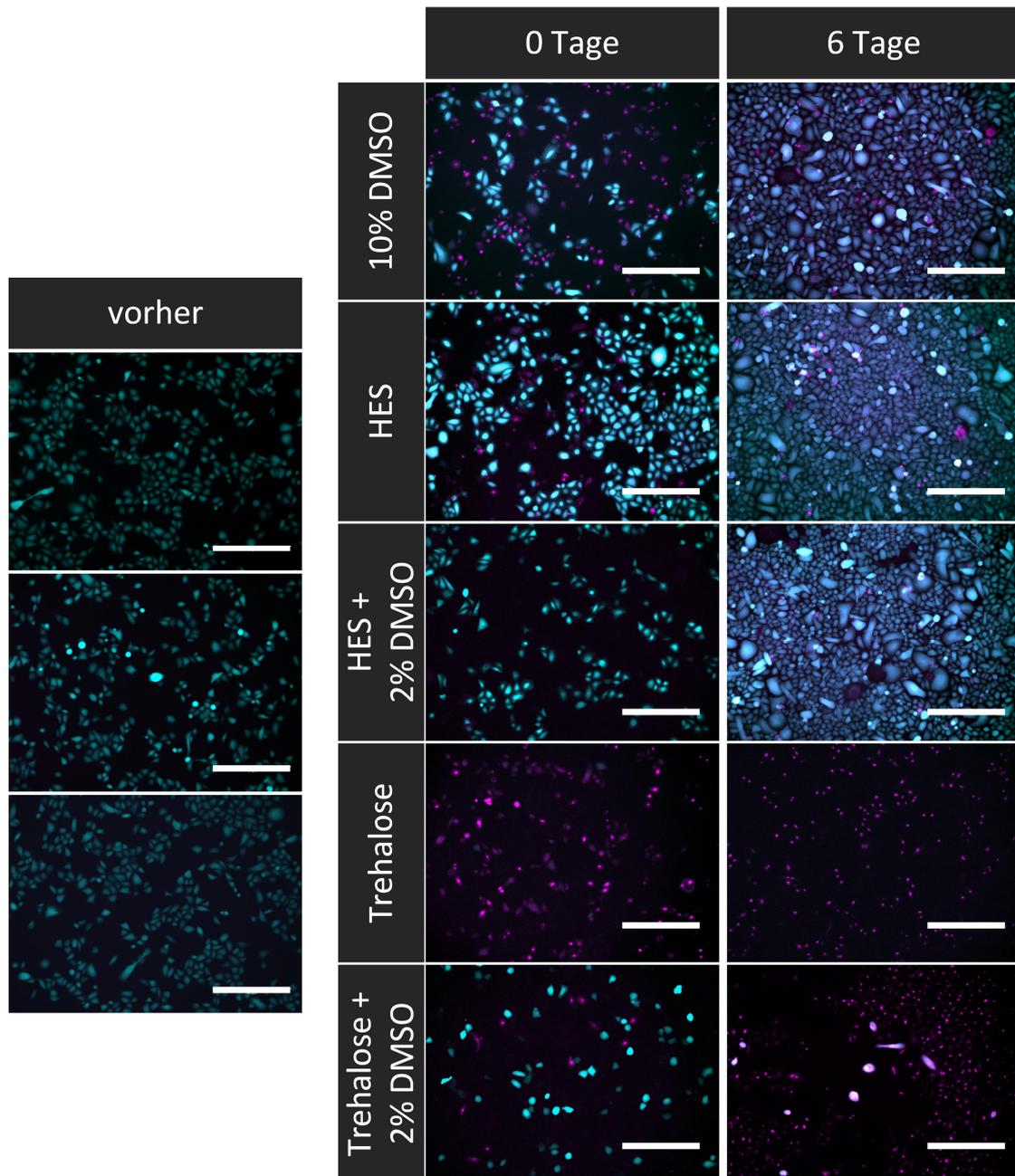


Abbildung 13: Kryokonservierung von adhärenenten Zellen.

FDA/PI Färbung von adhärenent eingefrorenen Keratinozyten mit 10 % DMSO, Hydroxyethylstärke (HES), HES + 2 % DMSO, Trehalose, und Trehalose + 2% DMSO bei 20 K/min. Die Viabilität der Zellen wurde vor dem Einfrieren, direkt nach dem Auftauen und 6 Tage nach dem Auftauen bestimmt. Lebende Zellen wurden in Cyan und tote Zellen in Magenta dargestellt (N=3); Die Maßstabsbalken entsprechen 450 μm .

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Zellen unter verschiedensten Bedingungen zu konservieren. Vor allem der Zusatz von HES und DMSO als CPA zeigte vielversprechende Ergebnisse für eine Lyophilisierung von Keratinozyten als Therapeutikum. Aufgrund dieser Ergebnisse gelang es dem Kooperationspartner der LMU München eine erfolgreiche Gefriertrocknung einer Keratinozytenzelllinie durchzuführen¹⁵⁹.

In einem nächsten Schritt sollte nun ein Modell etabliert werden, das die Testung solcher lyophilisierter Zellen an einer Brandwunde *in vitro* ermöglicht.

4.2 Etablierung eines *in vitro* Verbrennungsmodells

Die Untersuchung der Wundheilung von Brandwunden und die Testung neuer Therapeutika und Wundaufgaben wird bis heute zu einem großen Teil in Tiermodellen vorgenommen¹²⁸. Diese Modelle können die Situation in Menschen jedoch nur unzureichend abbilden und werfen zusätzlich ethische Bedenken auf. Zwar gibt es auch *in vitro* und *ex vivo* Testsysteme für Verbrennungen, jedoch bringen auch diese zahlreiche Limitierungen, wie eine geringe Reproduzierbarkeit oder fehlende physiologische Nähe zu Haut, mit sich¹³¹. Deshalb sollte im Zuge dieser Arbeit ein standardisiertes *in vitro* Modell zur Untersuchung von Brandwunden und deren Behandlung entwickelt werden. Zunächst sollte auf Basis des bereits publizierten OS-Rep Modells¹⁵³ ein Modell für Verbrennungen ersten Grades etabliert werden, um die Wundheilung auf Ebene der Keratinozyten zu untersuchen. Im Anschluss daran sollen die gewonnenen Daten genutzt und die Methodik auf ein komplexeres, mehrschichtiges Hautmodell übertragen werden, um auch tiefere Verbrennungsgrade abbilden zu können.

4.2.1 Etablierung eines standardisierten Verfahrens zur thermalen Verwundung von epidermalen Modellen

In einem ersten Ansatz wurde ein Lötstab mit verschiedenen Aufsätzen mit Durchmessern von 2 mm oder 4 mm auf 85 °C vorgeheizt und für 10 Sekunden auf Hautmodelle platziert, um eine Verbrennungswunde zu erzeugen (Abbildung 14A). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Viabilität der Modelle mittels MTT-Assay. Optisch konnte man erkennen, dass bei einem Durchmesser von 2 mm nur eine sehr geringe Abnahme der Viabilität in der Wundfläche erreicht wurde (Abbildung 14B). Bei einem Durchmesser von 4 mm zeigte sich zwar eine deutlichere Abnahme der Viabilität, jedoch beschränkte sich diese ausschließlich auf Randbereich der Wunde, während der innere Bereich nicht beeinflusst wurde. Eine Erhöhung der Temperatur oder des Drucks auf die Modelle war jedoch nicht möglich, da sich bereits bei diesem Versuchsaufbau eine Schädigung der Kulturmembran zeigte (weißer Pfeil), die eine weitere Kultur der Modelle verhindert. Aufgrund dieser Ergebnisse erwies sich die Nutzung eines Lötstabs zur Verbrennung von Hautmodellen als nicht praktikabel, weshalb eine alternative Methode getestet wurde.

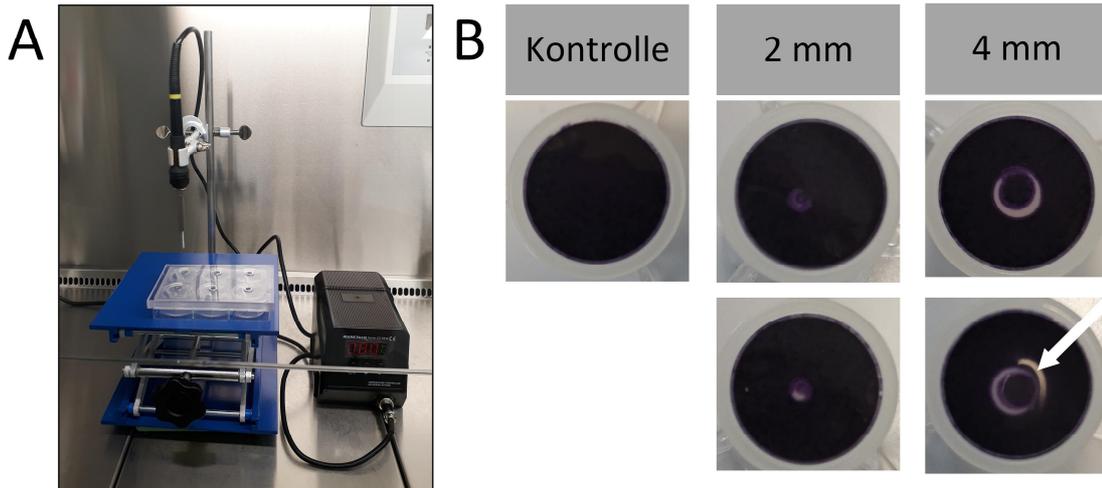


Abbildung 14: Verbrennung von Modellen mittels eines Lötstabs.

(A) Versuchsaufbau zur Verbrennung von epidermalen Modellen mittels eines Lötstabs. (B) MTT-Assay von einem Kontrollmodell und Modellen nach Verbrennung mit 2 mm und 4 mm Wunddurchmesser. Nach Verbrennung zeigte sich nur eine sehr geringe, lokale Abnahme der Viabilität. Bei einem Durchmesser von 4 mm zeigte sich vor allem im Randbereich eine verringerte Viabilität und eine Schädigung der Kulturmembran (weißer Pfeil).

In dem nächsten Ansatz wurde ein Metallstab mit einem Durchmesser von 6 mm auf zwei verschiedene Temperaturen - 65 °C und 83 °C - vorgeheizt und für 5, 10 und 15 Sekunden auf Hautmodellen platziert, um eine Verbrennungswunde zu erzeugen. Anschließend erfolgte auch hier die Bestimmung der Viabilität der Modelle mittels MTT-Assay. Bereits optisch konnte man erkennen, dass bei einer Temperatur von 83 °C bei allen Modellen die Viabilität im behandelten Bereich deutlich abnahm, während bei 65 °C kein Effekt zu sehen war (Abbildung 15A). Die quantitative Auswertung bestätigte diesen Eindruck größtenteils, jedoch war hier auch bei der niedrigeren Temperatur eine leichte Abnahme der Viabilität mit zunehmender Verbrennungsdauer zu erkennen (Abbildung 15B). Auffällig bei der quantitativen Auswertung des MTT-Assays war die Diskrepanz zwischen Wundfläche und Abnahme der gemessenen Viabilität. Während die verbrannte Fläche knapp die Hälfte des Modells zerstörte (47 %), was vor allem nach 15 s bei 83 °C deutlich erkennbar war, sank die Viabilität in der quantitativen Messung nur um ca. ein Drittel ab. Aus diesem Grund wurde in nachfolgenden Experimenten die Viabilität der Wundfläche getrennt von der Fläche des umliegenden Modells bestimmt.

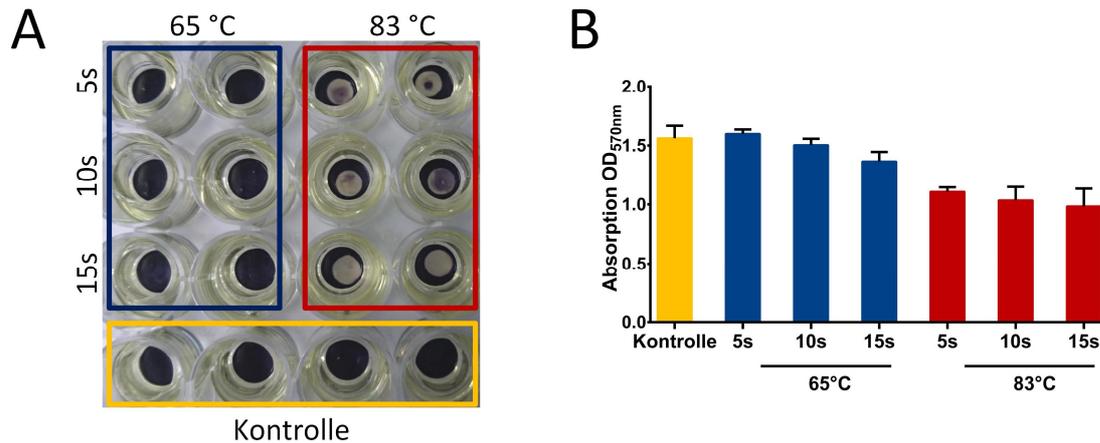


Abbildung 15: Verbrennung von Modellen mit verschiedenen Temperaturen und Anwendungsdauer.

(A) MTT-Assay von Kontrollmodellen (gelb) und Modellen nach Verbrennung mit 65 °C (blau) und 83 °C (rot). Nach Verwundung mit 83 °C zeigte sich eine deutliche Abnahme der Viabilität. (B) Quantitative Auswertung des MTT-Assays. Mit zunehmender Applikationsdauer zeigte sich eine Abnahme der Viabilität bei Verbrennung mit 65 °C. Den stärksten Effekt konnte man nach Verwundung mit 83 °C erkennen. (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung).

4.2.2 Untersuchung der Reepithelialisierung von Brandverletzungen an Hautäquivalenten

Aufgrund der Ergebnisse in Kapitel 4.2.1, wurde zur Verbrennung von Epidermismodellen ein Metallstab mit einem Durchmesser von 6 mm auf 83 °C vorgeheizt und für sieben Sekunden auf die rekonstruierte Epidermis platziert (Abbildung 16A). So sollte garantiert werden, dass eine vollständige Zerstörung des verbrannten Gewebes vorliegt. Als Kontrolle wurde der Metallstab nicht erhitzt auf den Modellen platziert. Die anschließende Analyse wurde für alle Modelle bis zu 14 Tage nach der Verwundung durchgeführt. Für die Behandlung der Verbrennungsmodelle wurde die topische Applikation einer handelsüblichen 5 prozentigen Dexpanthenol Creme der Firma Bayer gewählt. Dieser Wirkstoff bot sich an, da er bereits vielfach in Wunden verschiedensten Ursprungs Anwendung findet und sich positiv auf die Wundheilung auswirkt¹⁶⁰.

Die quantitative Analyse des MTT-Assays zeigte eine signifikante Abnahme der Viabilität der verbrannten Modelle im Vergleich zu den unverwundeten Kontrollen (Abbildung 16B). Während bei der **Viabilität** des umgebenden Gewebes kein Unterschied zwischen verbrannten und Kontrollmodellen vorlag, konnte im Wundbereich nach der Verbrennung eine signifikante Abnahme festgestellt werden. Obwohl hier die Viabilität während des Heilungsprozesses von 2 % an Tag 1 auf bis zu 80 % an Tag 14 anstieg, war sie nach 14 Tagen Kulturzeit noch immer signifikant niedriger als bei den unverwundeten Modellen (Abbildung 16B).

Nach Behandlung mit Dexpanthenol zeigte sich bei Betrachtung der Viabilität des umgebenden Gewebes an Tag 7 kein Unterschied zu den anderen Versuchsgruppen (Abbildung 16B). Nach 14 Tagen konnte jedoch ein geringer und, vor allem im Vergleich zur Kontrolle, hoch signifikanter Anstieg der Viabilität gemessen werden. Innerhalb der Wundfläche stieg die Viabilität, wie bei unbehandelten Modellen, von 2 % auf bis zu 70 % an (Abbildung 16B).

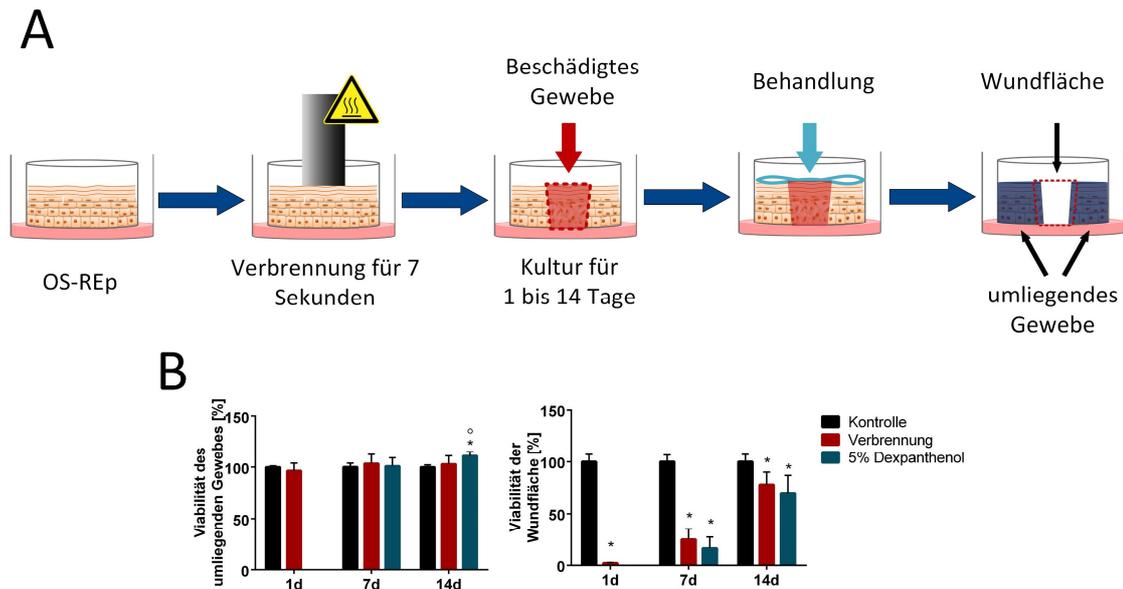


Abbildung 16: Setzen von Verbrennungswunden in rekonstruierter humaner Epidermis und Analyse der Viabilität. (A) Schematische Übersicht über den Verbrennungsprozess. Die Modelle wurden am Tag 12 der Kultur durch Kontakt mit einem erhitzten Metallstab für sieben Sekunden verbrannt. Wundheilung und Viabilität wurden 14 Tage lang überwacht, wobei eine Versuchsgruppe durch topische Anwendung von 5 % Dexpanthenol behandelt wurde. (B) Viabilität in Prozent, normalisiert auf die unverletzte Kontrollgruppe. Die Viabilität wurde für den verbrannten und den umgebenden Bereich separat bestimmt. Die Viabilität des umgebenden Gewebes zeigte signifikante Unterschiede für die mit 5 % Dexpanthenol behandelte Gruppe am Tag 14 nach der Verbrennung. Der verletzte Bereich zeigte an allen Tagen signifikant verringerte Werte der Viabilität für verbrannte und mit Dexpanthenol behandelte Modelle. (N=3; Mittelwert \pm Standardabweichung). * $p < 0,05$ im Vergleich zur initialen verbrannten Fläche an Tag 1. ° $p < 0,05$ im Vergleich zu verbrannten Modellen.

Die Auswertung der verbrannten **Wundfläche (Burn surface area/BSA)** bestätigte die Messwerte aus dem MTT-Assay (Abbildung 17). Die verbleibende Wundfläche verringerte sich bei verbrannten Modellen, unabhängig von ihrer Behandlung, kontinuierlich von 25 % einen Tag nach der Verbrennung, über 14 % nach einer Woche Kultur auf etwa 5 % nach 14 Tagen Regeneration (Abbildung 17B). Anhand dieser Daten konnten auch Rückschlüsse auf die Heilungsgeschwindigkeit der Modelle gezogen werden, die zwischen 100 μm und 120 μm pro Tag lag.

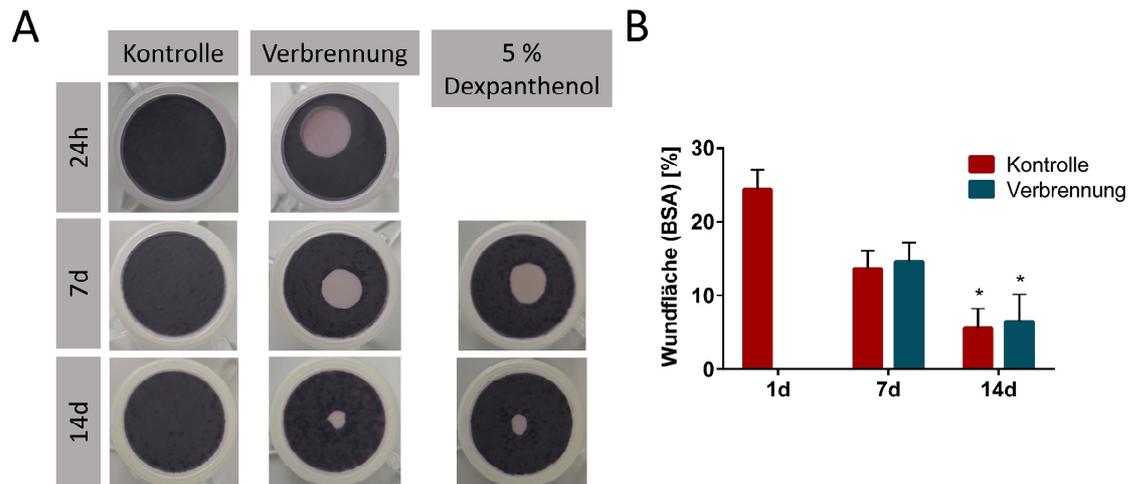


Abbildung 17: Abnahme der Wundfläche mit zunehmender Regenerationszeit.

(A) Nach 24 h zeigte sich im MTT-Assay eine nicht viable Wundfläche in der Mitte der verwundeten Modelle. Mit zunehmender Regenerationszeit nahm die Wundfläche der Modelle für alle Gruppen ab. (B) Die quantitative Bestimmung der verbrannten Fläche zeigte eine abnehmende Wundfläche mit signifikant niedrigeren Werten an Tag 14. (N=3; Mittelwert \pm Standardabweichung). * $p < 0,05$ im Vergleich zur initialen verbrannten Fläche an Tag 1.

Eine weitere Möglichkeit die verwundeten Modelle zu charakterisieren stellte auch hier die **histologische Begutachtung** dar. Zur Beurteilung der Wundheilung wurden die Modelle zunächst mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Abbildung 18). Einen Tag nach der Verwundung war bei allen verbrannten Modellen ein deutlicher Wundrand sichtbar (angedeutet durch die gestrichelte Linie), während in Kontrollmodellen keine Defekte gefunden werden konnten. Die Zellen innerhalb des verbrannten Bereichs zeigten histologische Indikatoren für eine Degeneration, wie pyknotische Kerne, zelluläre Schwellung, undeutliche Zellgrenzen und die Trennung der Zellschichten (Abbildung 18). Während der folgenden zwei Wochen regenerierten die Modelle, unabhängig davon, ob sie mit Dexpanthenol behandelt wurden oder nicht, und einwachsende Keratinozyten begannen den Wundbereich zu schließen und eine neue Epidermis zu bilden. Während die einwachsenden Zellen sich unter das abgestorbene Gewebe schoben, wurde dieses weg von der Zellkulturmembran nach oben hin verdrängt. Nach 14 Tagen wurde zwar kein vollständiger Wundverschluss erreicht, allerdings waren die Wundränder bis zu 2,1 mm (2,1 mm links, bzw. 1,8 mm rechts) in den Wundbereich eingewachsen.

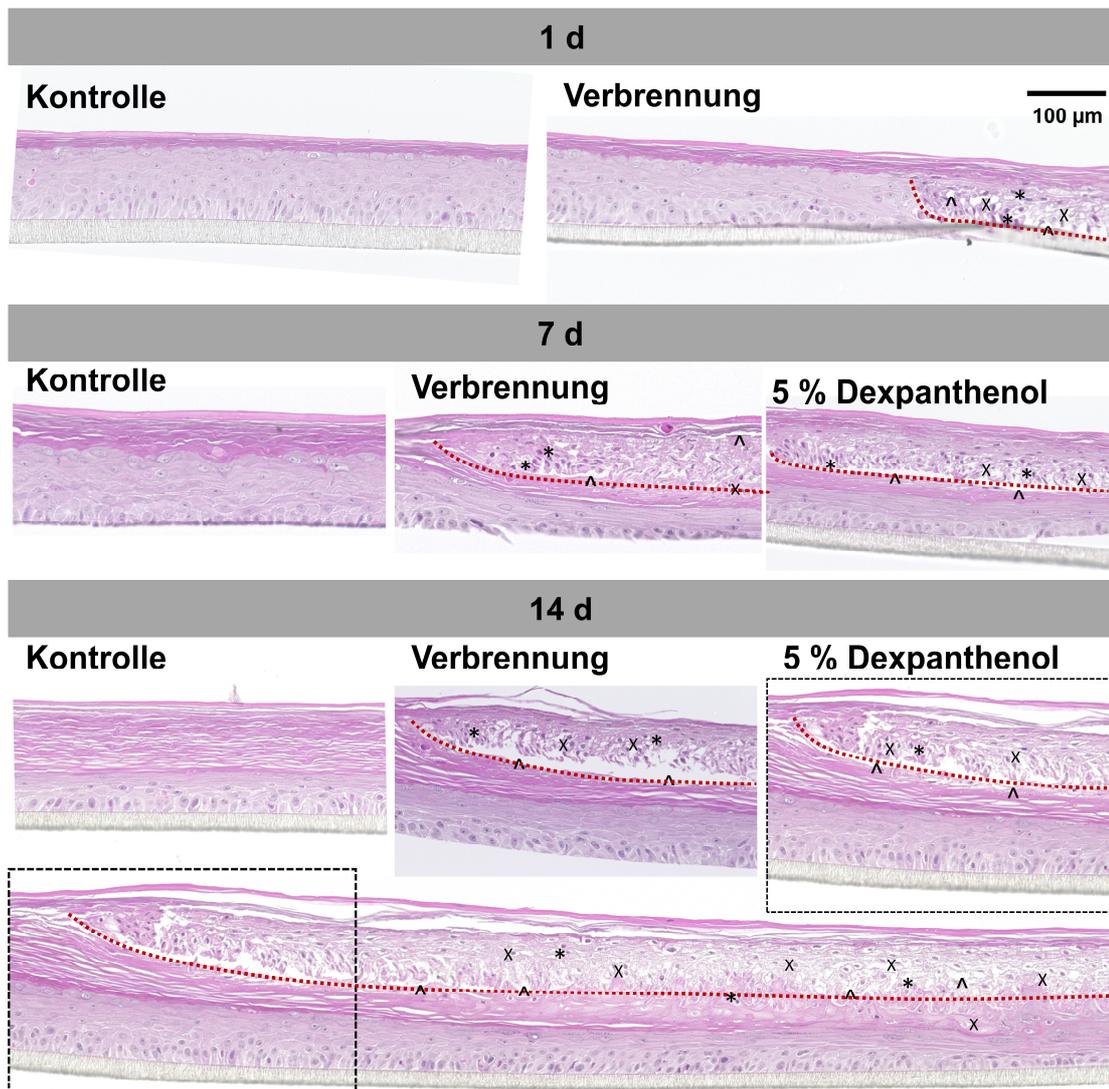


Abbildung 18: Histologische Beurteilung der Wundheilung.

Hämatoxylin- und Eosinfärbung von Modellen. Die Histologie zeigte 1 Tag nach der Verbrennung einen deutlichen Wundrand (angedeutet durch die gestrichelte Linie), eine Trennung der Schichten (^), eine Schwellung der Zellen (X) und pyknotische Kerne (*). An Tag 7 und Tag 14 konnte ein beginnender Wundschluss beobachtet werden. Der Wundrand wuchs unter das verbliebene, abgestorbene Gewebe. Während des Heilungsprozesses wird eine neue Epidermis gebildet, die alle Schichten enthält. (N=3).

Eine zusätzliche Bewertung der **Epidermisqualität** im Bereich der Wundränder wurde mit dem BSGC-Score durchgeführt (Abbildung 19). Während Kontrollmodelle mit 83, 76 und 75 Punkten zu allen Zeitpunkten eine sehr gute Qualität zeigten, konnte man im Bereich des Wundrandes eine Abnahme der Qualität beobachten. Es zeigte sich, dass in verwundeten Modellen nach 7 Tagen die neu gebildete Epidermis im verbrannten Bereich mit 41 Punkten eine signifikant schlechtere Qualität aufwies (45 % verminderter Wert) als Kontrollmodelle. Die Bewertung mittels BSGC Score konnte hier auch Unterschiede durch die Behandlung mit Dexpanthenol darstellen. Während das neu gebildete Gewebe in verbrannten, unbehandelten Modellen 45 % schlechter als Kontrollmodelle abschnitt, zeigte sich nach Dexpanthenolbehandlung ein deutlich

besserer Wert von 59 Punkten. Die bessere Bewertung der neu gebildeten Epidermis war hier hauptsächlich auf eine gesteigerte Qualität der Strata basale und spinosum zurückzuführen.

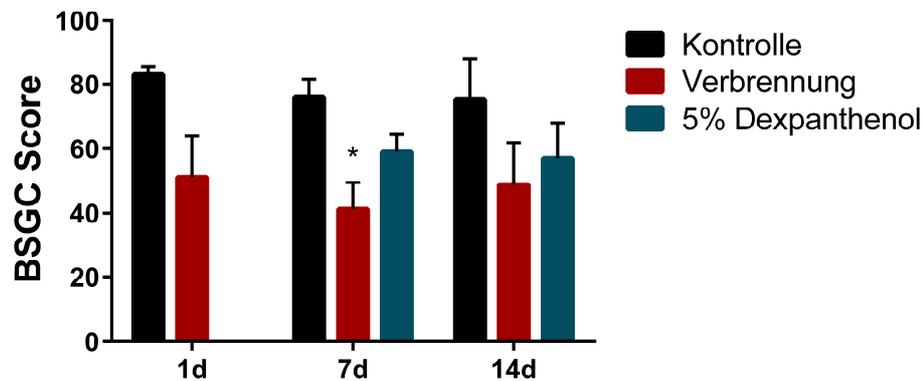


Abbildung 19: Bewertung der Modelle mittels BSGC Score.

Histologische Bewertung des Wundrandes von Kontroll-OS-REp, Modellen nach Verbrennung und Modellen, die verbrannt und mit 5 % Dexpanthenol behandelt wurden. Die Proben wurden einen, sieben und vierzehn Tage nach der Verbrennung analysiert. (N=3; Mittelwert \pm Standardabweichung).

Neben der histologischen Begutachtung der Modelle wurden **immunhistologische Färbungen** mit Antikörpern gegen Zytokeratin 10 (K 10) und 14 (K 14) (Abbildung 20) durchgeführt, um **physiologische epidermale Strukturen** zu bestätigen.

Die immunhistologische Färbung von Kontrollmodellen mit K 10 (rot) zeigt ein positives Signal in den apikalen Schichten der Modelle, während K 14 (grün) in der basalen Schicht zu finden war (Abbildung 20), was dem physiologischen Aufbau der Epidermis entspricht. In verbrannten Modellen konnte, unabhängig von ihrer Behandlung und übereinstimmend mit den Beobachtungen aus den H&E Färbungen, gezeigt werden, dass sich Keratinozyten unter das verletzte Gewebe schoben und dieses dabei von der Membran nach oben hin ablösten (gepunktete Linie). Das dabei neu gebildete epidermale Gewebe wies in Bereichen nahe dem Ursprung des Wundrandes eine klare Trennung von K 10 und K 14 auf, was die Differenzierung der Zellen bestätigte. Keratinozyten an der Spitze des Wundrandes wurden jedoch nur positiv für K 14 angefärbt, während ein Signal für Keratin 10 erst ca. 150 μm von der Spitze der Neopidermis entfernt nachgewiesen werden konnte (weiße Pfeile). Diese Beobachtungen konnten sowohl an Tag 7, als auch an Tag 14 nach Verwundung gemacht werden, wobei der Wundrand zu späteren Zeitpunkten tiefer in das verletzte Gewebe eingewachsen war.

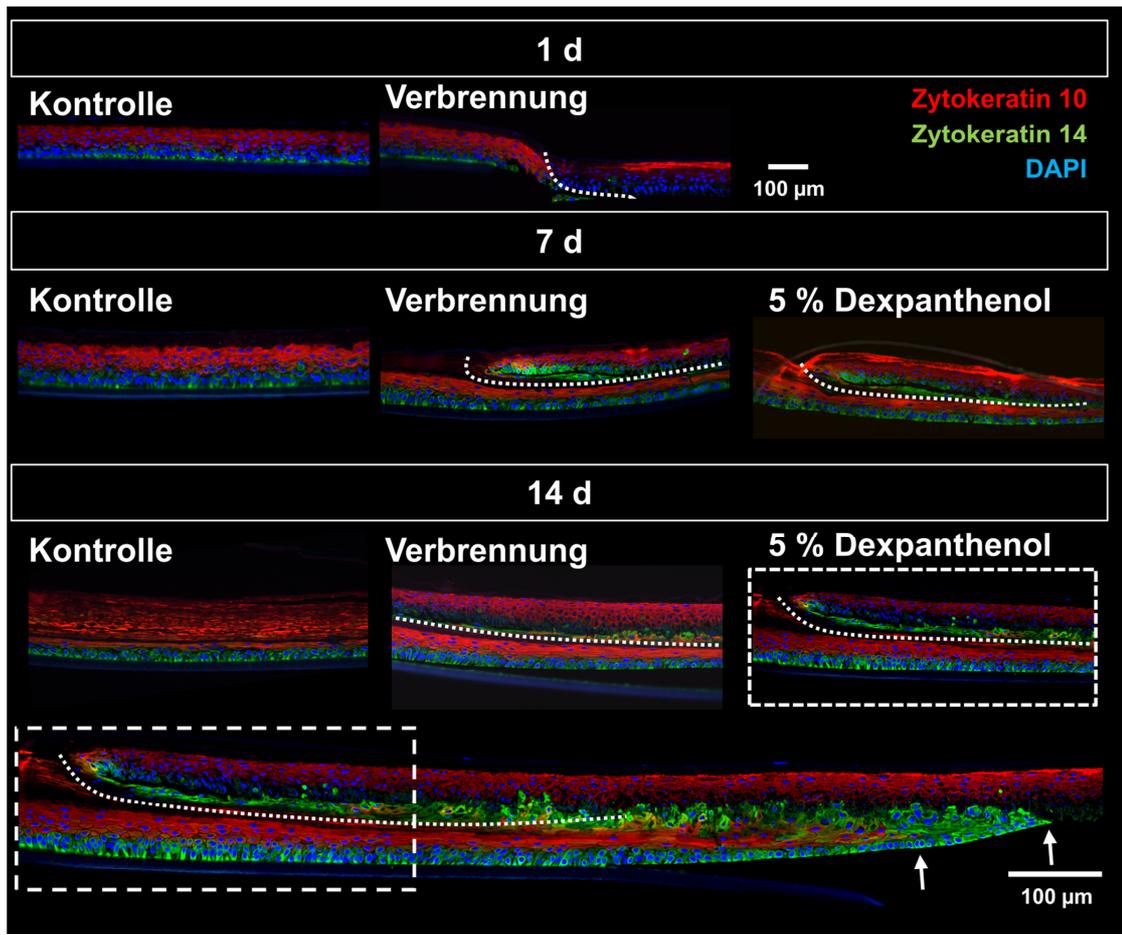


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung physiologischer Strukturen der Modelle nach Verbrennung und Regeneration.

Immunfluoreszenzfärbung von Cytokeratin 10 (K 10), Cytokeratin 14 (K 14) und DAPI von Kontrollen, verbrannten und behandelten OS-REp-Modellen. Die gepunktete Linie zeigt den Wundrand. Mit DAPI gefärbte Zellkerne sind in blau dargestellt. K 10 in rot zeigt die differenzierte Schicht der Epidermis, während K 14 in grün das undifferenzierte Stratum basale definiert. An Tag 14 ist zusätzlich ein Übersichtsbild eines behandelten OS-REp-Modells gezeigt, um den gesamten Wundrand und die Wundzunge zu demonstrieren. (N=3).

Als nächstes wurden Modelle gegen das High mobility group protein B1 (HMGB1) gefärbt, um **nekrotische Prozesse und zellulären Stress** zu untersuchen (Abbildung 21).

Da HMGB1 in lebenden Zellen nuklear lokalisiert ist, deutet eine zytosolische Freisetzung darauf hin, dass die Zellen in einen nekrotischen Prozess eintreten¹⁶¹. Die Färbung von Kontrollmodellen zeigte HMGB1-positive Kerne im gesamten viablen Teil der Epidermis (Abbildung 21A), während in verbrannten Modellen ein deutlicher Unterschied zwischen verwundetem und umliegendem Gewebe vorlag. Nach Verbrennung des Gewebes wurde HMGB1 freigesetzt und die Zellkerne zeigten keine Färbung mehr, wodurch die Wunde leicht von dem unverletzten Gewebe unterschieden werden konnte (Abbildung 21B). Auch hier konnte beobachtet werden, dass sich im Zuge der Wundheilung (HMGB1-positives) Gewebe aus der Basalschicht des Wundrandes

herausbildete und das verbrannte Gewebe nach oben wegschob. Mit zunehmender Regenerationsdauer wuchs das neu gebildete epidermale Gewebe weiter in den verbrannten Bereich hinein (Abbildung 21C), wobei die HMGB1-positiven Zellen vor allem an Tag 14 auf die Basalschicht beschränkt waren. Im Gegensatz zu unbehandelten verbrannten Modellen konnte bei Modellen, die mit Dexpanthenol behandelt wurden jedoch beobachtet werden, dass die vitalen Zellen über alle epidermalen Schichten verteilt waren (weiße Pfeile).

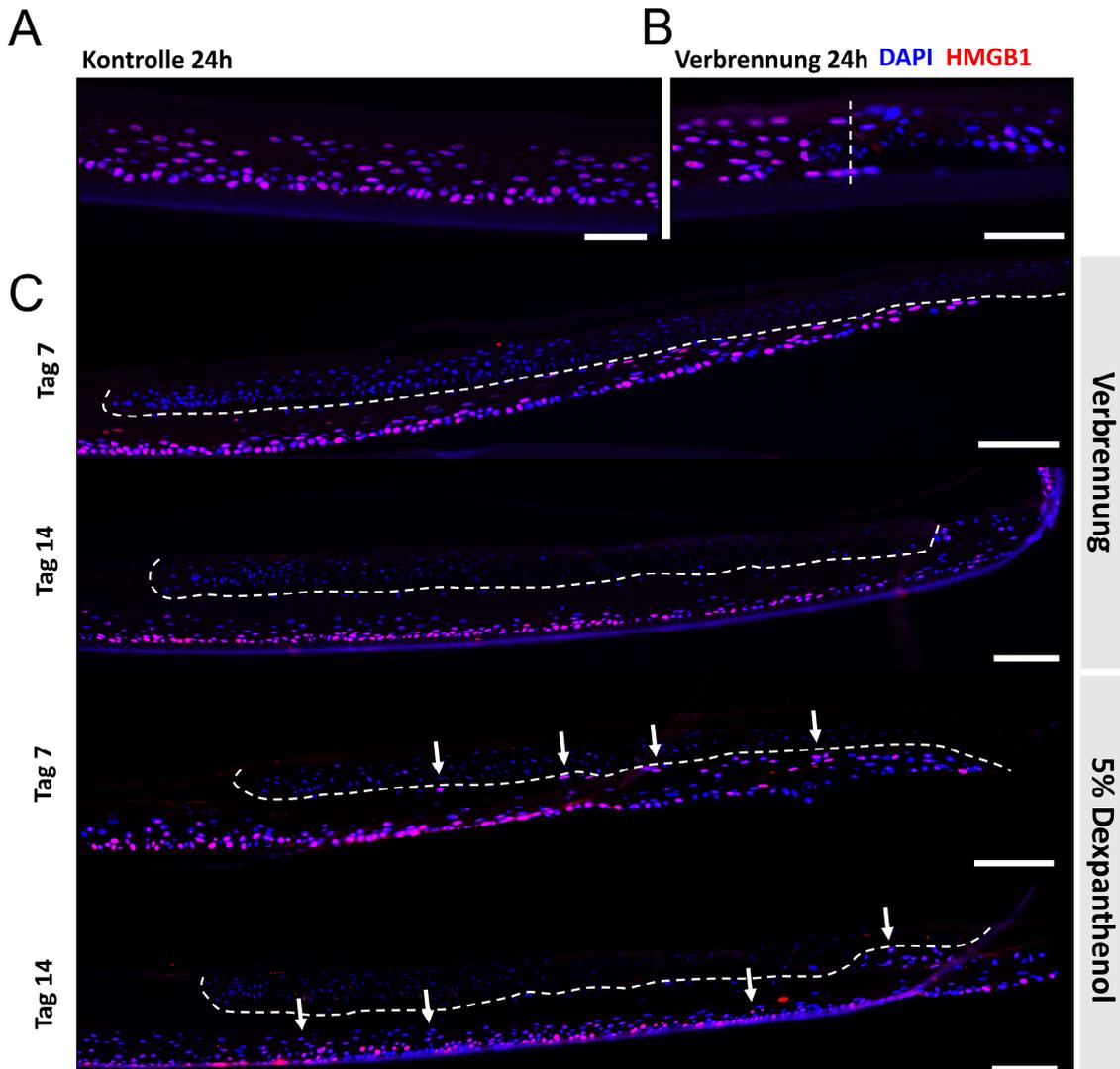


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung nekrotischer Zellen in Modellen.

Immunfluoreszenzfärbung von High Mobility Group Protein B1 (HMGB1). Mit DAPI gefärbte Zellkerne sind in blau dargestellt, HMGB1 in rot (A) Färbung eines Kontroll-Modells; Maßstabsbalken: 50 μm . (B) DAPI- und HMGB1-Färbung am Wundrand nach 24 h (gestrichelte Linie); Maßstab: 50 μm . (C) Färbung an Tag 7 und 14 der verwundeten Modelle \pm 5 % Dexpanthenol. Die Bilder zeigen die Entwicklung eines neuen epidermalen Gewebes unter dem alten geschädigten Gewebe. Die gepunkteten Linien zeigen die Trennung beider Gewebe. Weiße Pfeile zeigen HMGB1 positive Zellen in apikalen Zellschichten; Maßstabsbalken: 100 μm . (N=3).

Außerdem wurde die Präsenz von **proliferativen Zellen** mit einem Antikörper gegen Ki67 (Abbildung 22) analysiert, der den Kern proliferierender Zellen färbt. In der unverwundeten Kontrollgruppe waren ausschließlich basale Keratinozyten Ki67 positiv. Einen Tag nach Verwundung konnte in verbrannten Modellen noch immer ein positives Signal im Wundbereich beobachtet werden. Jedoch fehlte ein DAPI Signal und für Ki67 zeigte sich eine Veränderung der Morphologie, da Ki67-positive Kerne länglicher erschienen (weiße Pfeile). An Tag 7 und Tag 14 wuchs neues, Ki67 positives Gewebe aus dem Wundrand heraus unter das beschädigte Gewebe, wo es mit zunehmender Kulturdauer weiter in den verbrannten Bereich einwuchs. Nach 14 Tagen

Regenerationszeit war noch immer ein großer Teil der Zellen in den verwundeten Modellen Ki67 positiv, weshalb eine quantitative Auswertung der Ki67 positiven Zellen durchgeführt wurde.

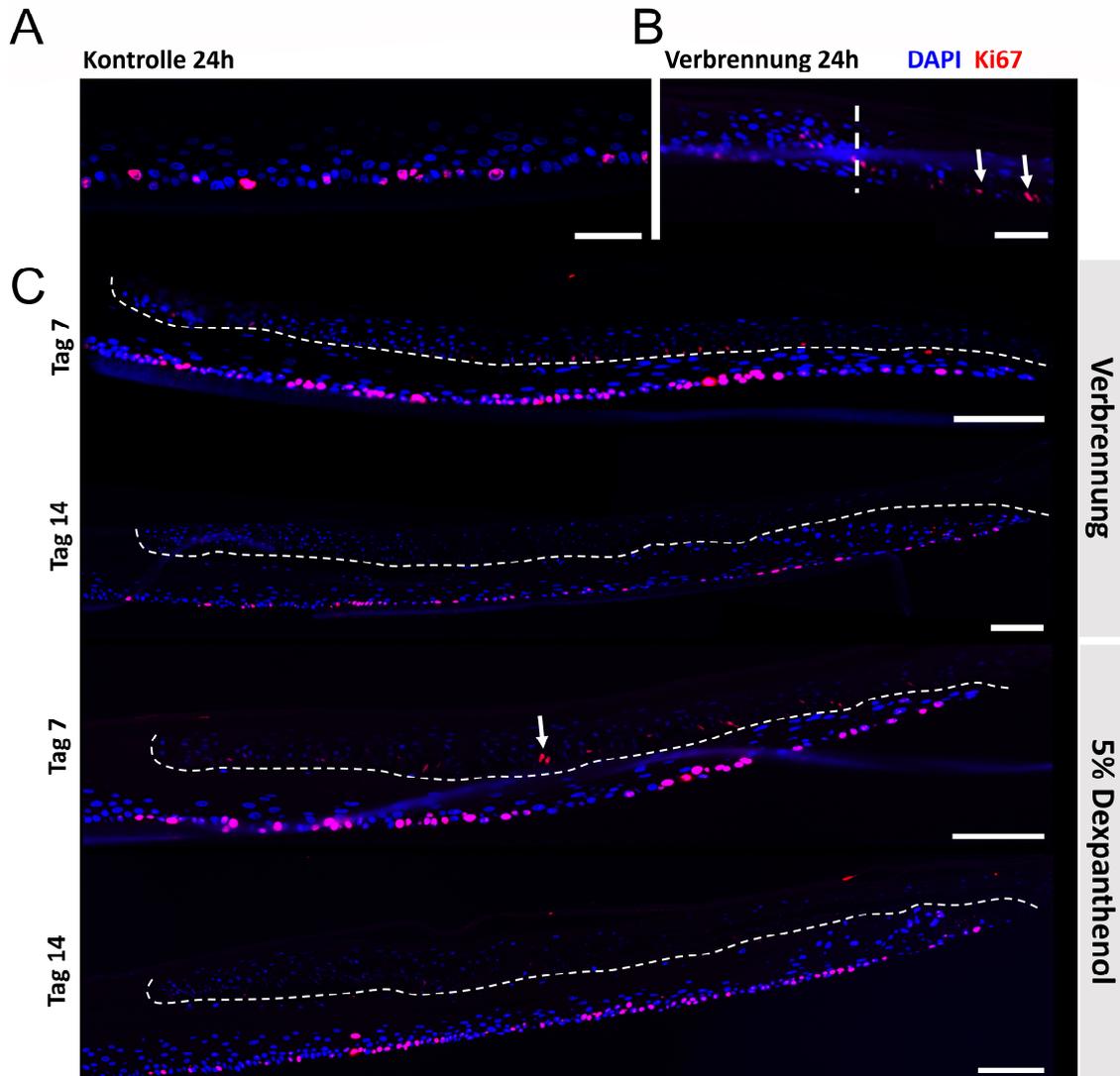


Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung proliferierender Zellen in Modellen.

Immunfluoreszenzfärbung von Ki67. Mit DAPI gefärbte Zellkerne sind in blau dargestellt, Ki67 in rot (A) Färbung eines Kontrollmodells nach 24 h; Maßstabsbalken: 50 μm . (B) DAPI- und Ki67-Färbung 24 h nach Verbrennung. Der Wundrand wird durch die gestrichelte Linie angezeigt; Maßstab: 50 μm . (C) Bilder von Tag 7 und 14 der verbrannten OS-REp-Modelle \pm 5 % Dexpanthenol. Die Bilder zeigen die Entwicklung eines neuen epidermalen Gewebes unter dem alten geschädigten Gewebe; gestrichelte Linien zeigen den Wundrand; Maßstabsbalken: 100 μm . (N=3).

Die anschließende Auswertung der Anzahl an Ki67 positiven Zellen an Tag 14 zeigte, dass in verbrannten Modellen ca. 20 % der Zellen in den Wundrändern Ki67 positiv waren. Eine Behandlung der Modelle mit Dexpanthenol führte zu einem zusätzlichen Anstieg der Anzahl an Ki67 positiven Zellen auf 26 % (Abbildung 23).

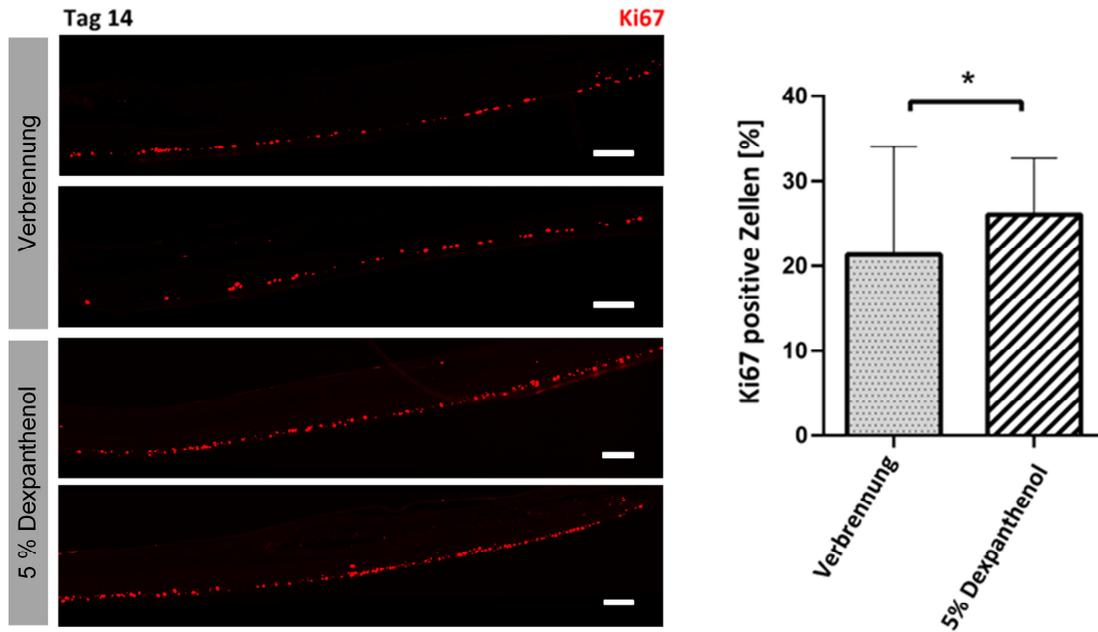


Abbildung 23: Ki67 Färbung und Analyse Ki67 positiver Zellen in den Modellen.

(A) Ki67 Färbung von verbrannten Modellen mit und ohne Behandlung mit 5% Dexpanthenol nach 14 Tagen. Maßstab entspricht 100 μm . (B) Prozentualer Anteil an Ki67 positiven Zellen in Modellen (N=2. Mittelwerte \pm SD; Mann-Whitney test, * $p < 0.05$).

Da Verbrennungswunden mit einer mangelnden **Barrierefunktion** der Haut einhergehen, wurde die Impedanzspektroskopie zur Analyse der Barriereintegrität eingesetzt (Abbildung 24A). Sowohl vor, als auch direkt nach der Verbrennung, variierte der $\text{TEER}_{1000\text{Hz}}$ -Wert nicht zwischen verbrannten ($3,0 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$) und Kontrollmodellen ($3,3 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$). In den darauffolgenden 14 Tagen Kulturzeit zeigten die verwundeten Modelle konstante $\text{TEER}_{1000\text{Hz}}$ -Werte zwischen $3,0$ und $3,4 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$, während sich der TEER Wert bei der Kontrolle kontinuierlich von $3,3 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ an Tag 1 auf $7,3 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ an Tag 14 erhöhte. Diese Stagnation in der Entwicklung der Barriere, resultierte in einer, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant geringeren Barriereintegrität ab Tag 7 nach Verwundung. Die Untersuchung der elektrischen Barrierefunktion der mit Dexpanthenol behandelten Modelle zeigte nur vereinzelt Unterschiede zu unbehandelten Wundmodellen. Während die $\text{TEER}_{1000\text{Hz}}$ Werte von verbrannten Hautäquivalenten über den gesamten Kulturzeitraum stagnierten, führte die Behandlung zu einem signifikanten Abfall der Impedanzwerte an Tag 1, 3 und 7 nach Verwundung. Nachdem die letzte Applikation an Tag 6 erfolgt war, stiegen die Werte wieder an, bis sie an Tag 10 und Tag 14 vergleichbar zu unbehandelten Modellen waren (Abbildung 24A).

Neben der Barrierefunktion wurde untersucht, ob das Verbrennen von Modellen eine Zerstörung von Zellen und damit die Freisetzung von **intrazellulärem LDH** in den Überstand verursachte (Abbildung 24B). Vor allem in den ersten 24 Stunden nach

Verbrennung zeigte sich in beiden verwundeten Gruppen (mit und ohne Dexpanthenol) ein starker Anstieg an LDH im Kulturmedium. Während drei Stunden nach Verwundung bereits ein 20-facher Anstieg des LDH Spiegels messbar war, zeigte sich in allen verwundeten Modellen selbst 24 Stunden später noch immer ein dreifach höherer LDH Wert als vor der Verbrennung. Nachdem an Tag 3 lediglich in verbrannten Modellen ohne Behandlung das letzte Mal eine signifikant erhöhte Menge an sekretiertem LDH im Vergleich zu Kontrollmodellen detektiert werden konnte, sank der LDH Wert für alle späteren Zeitpunkte auf basale Werte ab.

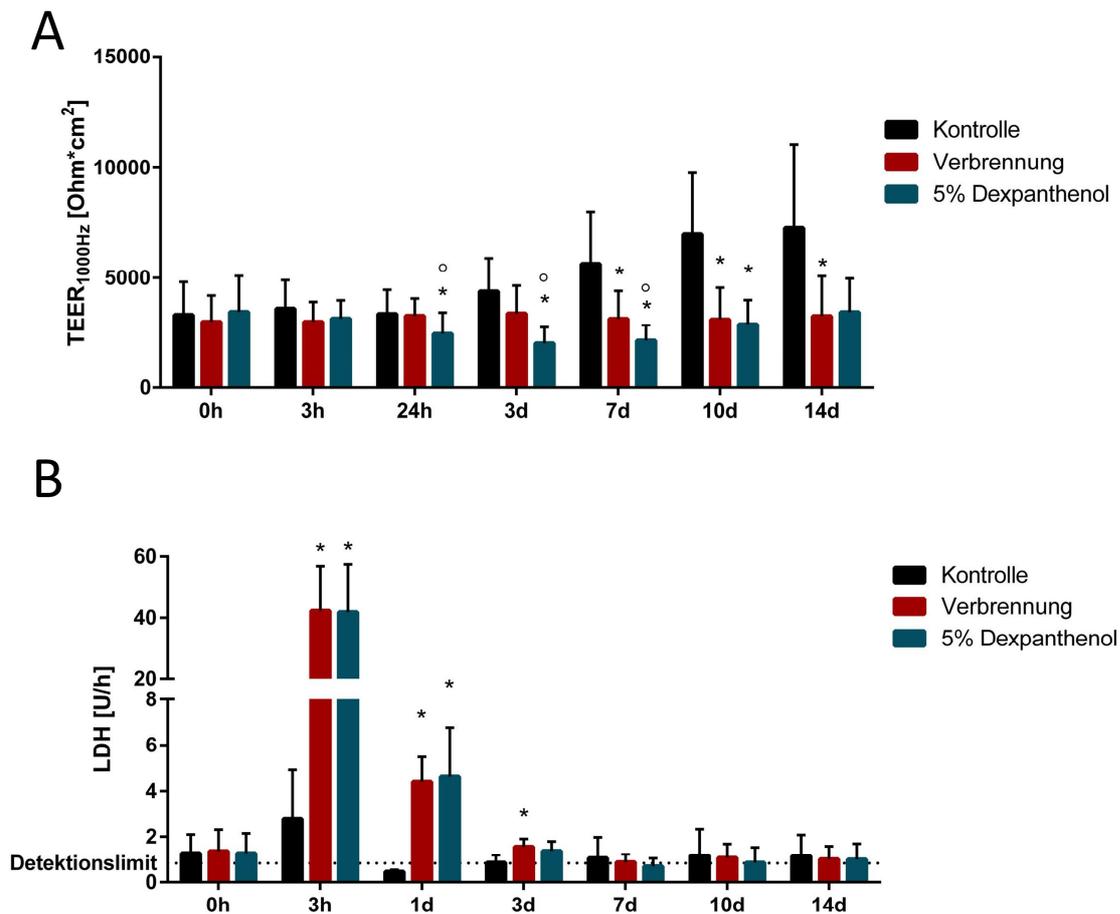


Abbildung 24: Einfluss von Verbrennungswunden auf die Hautbarriere und LDH Sekretion in Modellen.

(A) Der transepitheliale elektrische Widerstand ($TEER_{1000Hz}$) wurde vor (0 h) und 3 h, 24 h, 3 d, 7 d, 14 d nach der Verbrennung gemessen. Es zeigte sich eine Stagnation der Werte der verbrannten Modelle, während der $TEER_{1000Hz}$ der Kontrolle über die Kultivierungszeit anstieg. (B) Konzentration von sekretiertem LDH im Kulturüberstand. Die Verbrennung führt zu einem Peak des LDH-Spiegels im Überstand direkt nach der Verletzung, der jedoch nach 24 Stunden wieder abnimmt. (N=3; Mittelwert \pm Standardabweichung) * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. ° $p < 0,05$ im Vergleich zu verbrannten Modellen.

Auch der **Stoffwechsel** der Modelle war von Interesse, da das Verhältnis von Laktat- und Glukosespiegel im Medium Einblicke in aerobe Bedingungen und zelluläre Stresslevel geben können. Unter normalen, aeroben Bedingungen wird Glukose zuerst

in Pyruvat und dann in Acetyl CoA umgewandelt. Acetyl-CoA tritt dann in den Tricarbonsäurezyklus und die Elektronentransferkette ein, wo es zu Adenosintriphosphat (ATP), Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺), Kohlendioxid und Wasser oxidiert wird. Bei einem Wechsel zu anaeroben Stoffwechselbedingungen oder bei zellulärem Stress wird Glukose nicht mehr zu Acetyl-CoA, sondern durch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat und NAD⁺ umgewandelt ¹⁶².

Der Glukoseverbrauch der Modelle war für die Kontrollgruppe und die verbrannten Modelle über die gesamte Kulturdauer vergleichbar (Abbildung 25A). Lediglich bei Modellen, die mit Dexpanthenol behandelt wurden konnte an Tag 1, 3 und 14 nach Verwundung ein signifikant erhöhter Verbrauch gemessen werden. Gleichzeitig zeigten sich bei der Messung von sekretiertem Laktat stärkere Unterschiede (Abbildung 25B). Hier konnten 1 und 3 Tage nach Verwundung sowohl bei verbrannten, als auch bei mit Dexpanthenol behandelten Modellen eine signifikant höhere Menge an Laktat im Überstand gemessen werden. Darüber hinaus war auch hier in der behandelten Gruppe eine signifikant erhöhte Laktatsekretion an Tag 7 und Tag 14 nach Verbrennung detektierbar, während unbehandelte Modelle an diesen Zeitpunkten wieder vergleichbare Werte zur Kontrolle zeigten.

Da der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion der Modelle eng miteinander verbunden sind, wurde ihr Metabolismus zusätzlich unter Berücksichtigung der Konnektivität zwischen diesen beiden Stoffwechselmechanismen, analysiert (Abbildung 25C). Bereits einen Tag nach der Verbrennung verschob sich die Differenz zwischen Glukoseaufnahme und Laktatproduktion in verwundeten Modellen ins Negative, da mehr Laktat produziert als Glukose verbraucht wurde. Dieser Effekt konnte bis zum Kulturende nach 14 Tagen beobachtet werden, wobei nur an Tag 1 und Tag 3 ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle bestand. Wurden die Modelle nach der Verbrennung mit Dexpanthenol behandelt, konnte im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Unterschied an Tag 1, 3, 10 und 14 festgestellt werden. Es zeigte sich außerdem der Trend, dass das negative Verhältnis zwischen Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in behandelten Modellen stärker ausgeprägt war als in unbehandelten Modellen, was über die gesamte Kulturdauer zu sehen war. Ab Tag 7 nach Verwundung verschob sich auch bei Kontrollmodellen die Differenz ins Negative, jedoch lagen die Werte konstant über denen der verbrannten Gruppen.

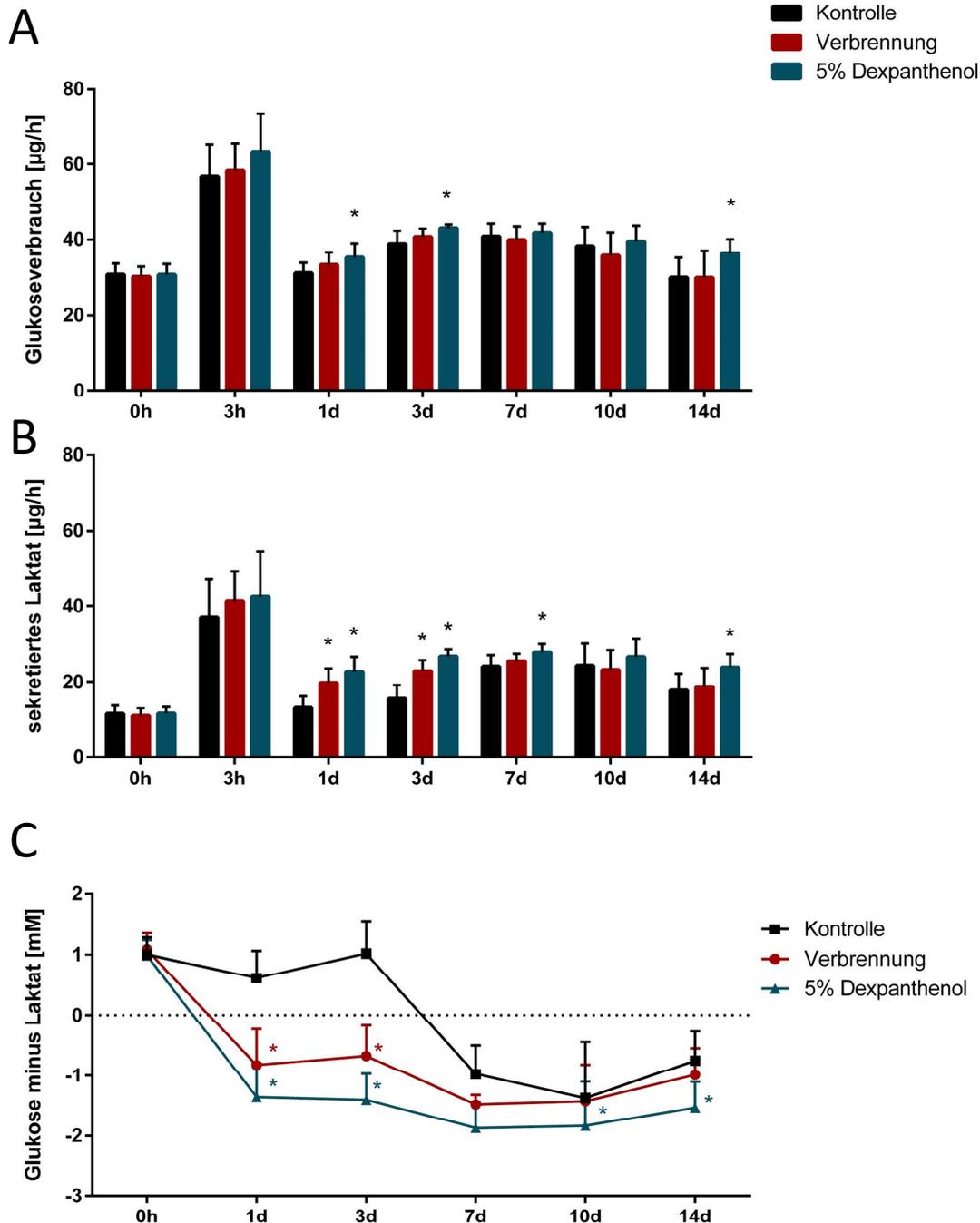


Abbildung 25: Metabolische Unterschiede in Modellen nach Verbrennung.

(A) Glukoseverbrauch aus dem Kulturmedium und (B) Laktatproduktion und –sekretion der Modelle nach Verbrennung. Der Glukoseverbrauch war nach Verwundung nur in behandelten Modellen erhöht, während die Laktatsekretion in beiden verbrannten Gruppen nach Verwundung erhöht war. (C) Glukoseverbrauch subtrahiert von der Laktatproduktion in mM. Der Glukoseverbrauch wird im Vergleich zu dem im frischen Medium gemessenen Glukosespiegel berechnet. Die Verbrennung führt in den ersten drei Tagen nach der Verbrennung zu einem signifikant niedrigeren Wert im Vergleich zur Kontrolle, unabhängig von der Behandlung. (N=3; Mittelwert \pm Standardabweichung) * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. ° $p < 0,05$ im Vergleich zu verbrannten Modellen.

Als abschließende Analyse diente die Messung verschiedener Marker im Kulturüberstand der Modelle, um die **Entzündungsreaktion** nach Verbrennung zu

bestimmen. Hierfür wurden Überstände entnommen und die Konzentrationen der Entzündungsmarker IL-8, IL-6, IL-1 β und VEGF mittels zytometrischem Bead Assay untersucht (Abbildung 26).

Für die Sekretion von IL-8 in verbrannten Modellen konnte gezeigt werden, dass sie, im Vergleich zur Kontrollgruppe, nach 3 Stunden mit 53 pg/h ihren Höchstwert erreichte und dieser signifikante Anstieg auch 24 Stunden (17 pg/h) nach der Verletzung noch erhalten blieb. Im weiteren Verlauf zeichnete sich ein progressiver Rückgang der erhöhten Werte für die verbrannten Modelle ab, die ab Tag 7 konstant bei ca. 5 pg/h blieben. Sowohl bei IL-6, als auch bei IL-1 β konnte, unabhängig von der Behandlung der Modelle, über den gesamten Zeitraum kaum eine Sekretion der Faktoren nachgewiesen werden. Obwohl 3 Stunden nach Verbrennung und ab Tag 7 signifikant erhöhte Werte für IL-6 detektiert wurden, lagen diese bei unter 1 pg pro Stunde und waren somit relativ niedrig. Als letzter Faktor wurde VEGF betrachtet. Nachdem die Sekretion von VEGF in den ersten 24 Stunden in verbrannten Modellen im Vergleich zu unverletzten Modellen signifikant erhöht war, schwankten die Konzentrationen während der weiteren Kultur der Modelle in allen Gruppen, wobei vor allem ab Tag 7 eine erhöhte Sekretion (bis zu 25 pg/h) festgestellt werden konnte. Wurden die verbrannten Modelle mit Dexpanthenol behandelt, konnte der Trend beobachtet werden, dass IL-8, IL-1 β und VEGF ab Tag 3 nach Behandlung vermehrt sekretiert wurden. Im Falle von IL-8 erreichte der Unterschied an Tag 7 und Tag 10 im Vergleich zur Kontrolle mathematische Signifikanz.

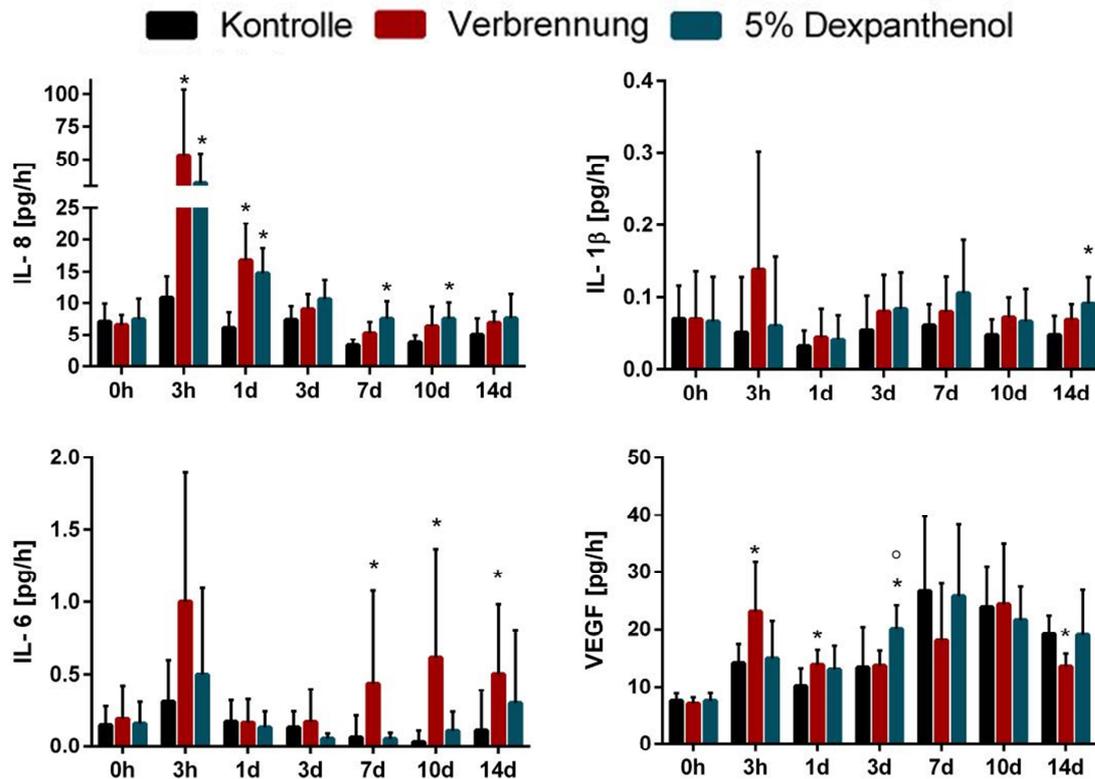


Abbildung 26: Messung von Entzündungsmarkern im Kulturüberstand verbrannter Modelle.

Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine IL-8, IL-6, IL-1β und VEGF in Zellkulturüberständen von verbrannten und unverletzten Modellen zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 14 Tagen, mittels CBA. Die nachgewiesenen IL-8- und VEGF-Spiegel erreichten 3 h nach der Verbrennung ihren Höhepunkt. IL-6 und IL-1β konnten zu keinem bestimmten Zeitpunkt in hoher Konzentration nachgewiesen werden. (N=3; Mittelwert ± Standardabweichung).

* $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. ° $p < 0,05$ im Vergleich zu verbrannten Modellen.

4.2.3 Proof of Concept Testung eines lyophilisierten Produktes

Als letzter Punkt sollten die beiden Teile dieser Arbeit zusammengeführt und ein lyophilisiertes Produkt an den entwickelten Verbrennungsmodellen getestet werden. Hierfür wurden von einem Kooperationspartner an der LMU München gefriergetrocknete Placebo-Formulierungen ohne Zellen zur Verfügung gestellt¹⁵⁹, welche in einer Proof of Concept Studie auf epidermalen Modellen mit Verbrennungen ersten Grades platziert wurden (Abbildung 27). Nach einer Regenerationszeit von 9 Tagen zeigte sich jedoch, dass die lyophilisierte Formulierung einen negativen Einfluss auf die Wundheilung hatte und der Wundschluss verlangsamt war. Nachdem die Modelle mit dem lyophilisierten Produkt bei 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden, führte der hygroskopische Effekt des Produktes dazu, dass sich eine Lösung der Formulierung auf den Modellen bildete. Da epidermale Hautmodelle kein Hydrogel besitzen, was eine dermale Komponente der Modelle darstellt, konnte die Formulierung nicht absorbiert werden. Stattdessen führte

die Lösung zu einem Aufweichen der Epidermis, wodurch die Wundheilung eingeschränkt war.

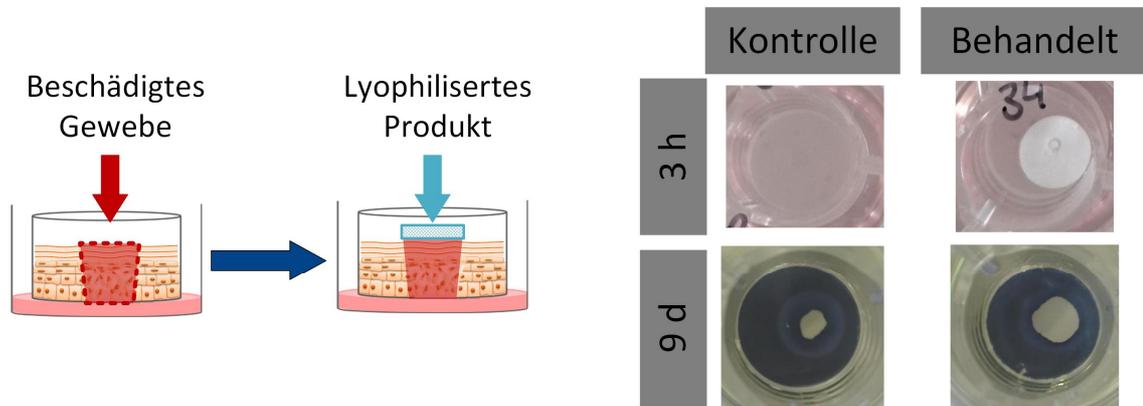


Abbildung 27: Testung eines lyophilisierten Produktes an verbrannten Hautäquivalenten.

Schematische Übersicht der Behandlung (links). Modelle wurden verbrannt und ein lyophilisiertes Produkt ohne Zellen (Placebo) auf die Wunden gegeben (rechts oben). Nach 9 Tagen Regenerationszeit zeigte sich im MTT-Assay eine verringerte Wundheilung in behandelten Modellen (rechts unten). (n=1).

4.2.4 Vorarbeiten zur Untersuchung von Verbrennungen der Grade IIa und IIb

Ein Großteil der Verbrennungen in der Klinik sind Wunden mit tiefen Schweregraden, weshalb die meisten Produkte für diese Wunden entwickelt werden. Da das etablierte epidermale Verbrennungsmodell, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, Limitationen bei der Produkttestung für diese Schweregrade besitzt, sollte abschließend ein Modell entwickelt werden, welches alle Verbrennungsgrade abbilden kann.

Deshalb wurde die in Kapitel 4.2.1 entwickelte Methode zur Verbrennung von epidermalen Modellen weiterentwickelt, um sie an Vollhautäquivalenten zu testen, die aus einer dermalen und epidermalen Schicht bestehen. Da Messing eine höhere thermische Leitfähigkeit als Edelstahl besitzt wurden bei diesem Ansatz Gewichte aus Messing verwendet, die einen Durchmesser von 4 mm hatten¹⁶³. Um verschiedene Schweregrade der Verwundung abbilden zu können, wurde eine Kombination aus verlängerter Kontaktdauer und erhöhter Temperatur gewählt. Anschließend erfolgte eine Analyse der Modelle mittels Hämatoxylin und Eosin Färbung (Abbildung 28).

Wurden die Gewichte auf 80 °C erhitzt und für 3 Sekunden auf den Modellen platziert, so zeigte sich in der histologischen Auswertung der Modelle eine Verbrennungswunde ersten Grades (gepunktete Linie). Eine Schädigung des Modells zeigte sich in diesen Modellen lediglich in der epidermalen Hautschicht. Bei einer verlängerten Kontaktdauer

der Messinggewichte von 7 Sekunden konnte, neben einer Schädigung der Epidermis, auch eine Denaturierung in der oberen dermalen Schicht detektiert werden, was einem Schweregrad IIa entspricht (gepunktete Linie). Um die Verbrennungstiefe weiter zu erhöhen wurden die Gewichte auf 120 °C erhitzt und dann für 13 Sekunden auf den Vollhautmodellen platziert. Diese Verwundung resultierte in einem Defekt, der tief in die dermale Hautschicht hineinreichte und somit einem Verbrennungsgrad IIb entspricht (gepunktete Linie), wodurch alle Schweregrade der epidermalen und dermalen Hautschichten abgebildet werden konnten.

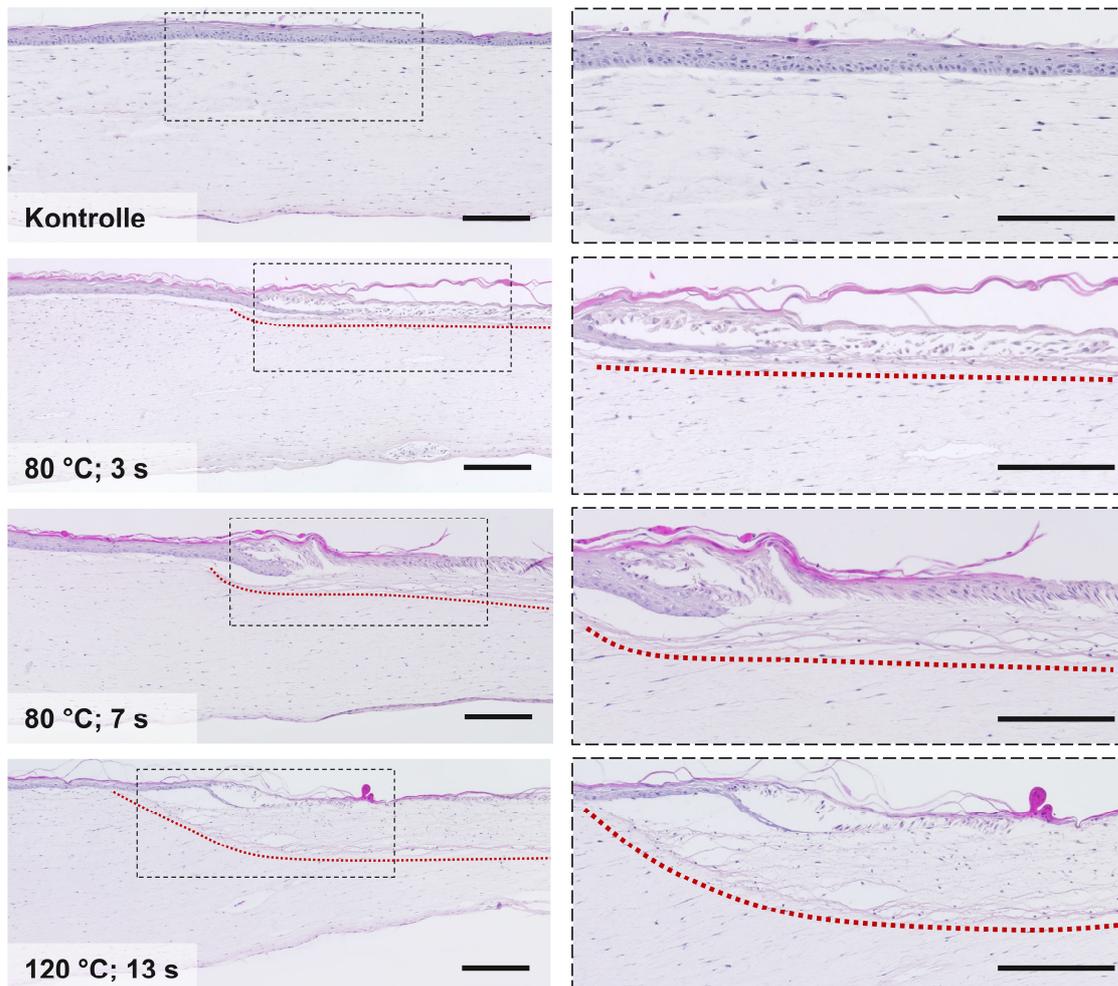


Abbildung 28: Abbildung aller Verbrennungsgrade in Vollhautmodellen.

Hämatoxylin- und Eosinfärbung von Modellen. Die Histologie zeigte ein Vollhautmodell mit intakter Epidermis für die Kontrolle. Mit zunehmender Kontaktdauer und Temperatur zeigten sich Schäden in den Modellen, die den Schweregraden I, IIa und IIb entsprechen. Maßstabsbalken entsprechen 150 μm (N=3).

5 Diskussion

Die Behandlung von Wunden im Allgemeinen und Brandwunden im Speziellen ist bis heute ein hoch komplexes Thema, was sich kontinuierlich im Wandel befindet ⁴. Noch immer sind nicht alle grundlegenden Mechanismen der Wundheilung im Menschen bekannt, was dieses Gebiet hochaktuell und interessant für die Forschung macht ³¹. Neue Erkenntnisse aufseiten der Forschung führen auch gleichzeitig zu einem kontinuierlichen Fortschritt in der Medizin und der Behandlung von Wunden. Dies zeigt sich in der Entwicklung vieler neuer Therapieansätze und Wundaufgaben, die vor allem im Bereich der schwerstverbrannten Patienten bereits einen konstanten Rückgang der Mortalität mit sich bringt ⁴. Oft gehen die Entwicklungen in Forschung und angewandter Medizin hier Hand in Hand, da neue Erkenntnisse aus der Forschung die Entwicklung neuer Therapieansätze fördert und die Erkenntnisse aus der Behandlung von Patienten mit neuen Technologien wichtige Informationen zur Wundheilung *in vivo* für die Forschung bereitstellt. Ein Therapieansatz, der sich in den letzten Jahren als sehr vielversprechend herauskristallisiert hat, ist die Behandlung von Wunden mit zellbasierten Systemen, sogenannten „Advanced Therapy Medicinal Products“ (ATMPs) ⁶². Sie finden Verwendung bei der Versorgung von chronischen Wunden, aber auch bei großflächigen oder tiefen Verbrennungen. Die Anforderungen an solch ein zellbasiertes Produkt sind sehr hoch und durch die Vorgaben von Behörden wie der „European Medicines Agency“ (EMA) auf europäischer Ebene und der „Food and Drug Administration“ (FDA) in den USA genau reguliert, um einen größtmöglichen Schutz der Patienten vor adversen Effekten zu garantieren ¹⁶⁴. Weitere Punkte bei der Entwicklung solcher Produkte sind, neben behördlichen Vorgaben, aber auch praktische Aspekte, wie zum Beispiel eine einfache Lagerung und Verfügbarkeit der Produkte für den Endverbraucher. Dies ist wichtig, da vor allem in Ländern der Dritten Welt die Zahlen von schweren Verbrennungen signifikant höher sind als in den Industriestaaten ^{49,165}. Gleichzeitig führen eine begrenzte Infrastruktur und weniger gut ausgestattete Kliniken dazu, dass Produkte nicht kurzfristig bestellt oder lange bei tiefkalten Temperaturen vor Ort gelagert werden können.

Im Falle eines Produkts zur Behandlung von Verbrennungen, könnte man durch die Gefriertrocknung von Keratinozyten die Vorteile eines zellbasierten Therapeutikums mit den Vorteilen einer langfristigen Lagerung bei moderaten Temperaturen kombinieren. Dabei müssen mehrere Punkte adressiert werden, um ein solches Produkt herstellen und anschließend präklinisch testen zu können. Zunächst sollte die Produktion der Zellen soweit angepasst werden, dass eine anschließende Überführung in ein GMP reguliertes Umfeld einfach möglich ist. Wichtigster Faktor hierbei war der Ersatz von

tierischen Komponenten durch chemisch definierte Supplemente. Außerdem sollte eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht, die Keratinozyten für ein Zellprodukt zu charakterisieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Produktentwicklung war es, die Kryokonservierung von Keratinozyten so zu optimieren, dass sowohl die Einfrierrate, als auch die verwendeten CPAs mit den Anforderungen eines Lyophilisierungsprozesses konform sind. Außerdem musste auch bei der Wahl der CPAs darauf geachtet werden, dass diese Chemikalien später in medizinischen Produkten verwendet werden können. Die hier gewonnenen Ergebnisse konnten anschließend durch den Kooperationspartner an der LMU München angewendet werden, um Keratinozyten in den dort ansässigen Laboren erfolgreich zu lyophilisieren.

Abschließend sollte ein *in vitro* Wundmodell etabliert werden, welches zur Erforschung von Verbrennungen und deren Heilung genutzt werden kann. Anhand dieses Modells sollte dann das in Kooperation entwickelte gefriergetrocknete Zelltherapeutikum in einem ersten präklinischen Experiment getestet werden.

5.1 Kulturbedingungen für Keratinozyten als ATMP

Als erster Punkt dieser Arbeit sollte adressiert werden, Keratinozyten für ein medizinisches Produkt so zu isolieren, expandieren und charakterisieren, dass eine einfache Überführung in ein GMP Umfeld möglich ist.

Die Verwendung von humanen Keratinozyten zur Transplantation in schwerverbrannten Patienten findet seit vielen Jahren Anwendung in der Klinik ⁴⁶. Sie nehmen somit eine Vorreiterrolle bei zellbasierten Therapeutika ein, die mithilfe von Tissue-Engineering Ansätzen hergestellt und verwendet werden ⁷⁹. Ein großer Vorteil ist hier, dass die Behandlung von Patienten nicht auf die Verwendung von autologem Material beschränkt ist, sondern auch der Einsatz von allogenen Zellen sehr gute Ergebnisse hervorgebracht hat ¹⁶⁶. Vor allem bei Menschen mit schwersten Verbrennungen ist dies sehr wichtig, da zum einen aufgrund der Größe der Wunde kaum oder kein Gewebe vorhanden ist, aus dem Zellen zur Behandlung gewonnen werden können ¹⁶⁷. Zum anderen muss der teils immense Defekt der Hautbarriere zügig verschlossen werden, um den Patienten vor Infektionen und Dehydrierung zu schützen ¹⁶⁶. Keratinozyten als Therapeutikum fallen jedoch unter die Kategorie der ATMPs, welche, wie bereits erwähnt, mit strengen regulatorischen Anforderungen an den Herstellungsprozess einhergehen ¹⁶⁸. Da diese Anforderungen seit 2017 verschärft wurden, ist es für viele Kliniken nicht mehr möglich die Zellen aus ihren eigenen Zellbanken zu verwenden, was dazu führt, dass ein wichtiger Behandlungsbaustein zur Versorgung dieser sehr herausfordernden Wunden wegfällt ¹⁶⁴. Der Bedarf nach einer standardisierten, zellbasierten Wundaufgabe ist also

in großem Maß gegeben. Entsprechend der behördlichen Vorgaben für eine spätere Nutzung im Rahmen einer Therapie, müssen die Zellen also möglichst ohne die Verwendung tierischer Komponenten kultiviert und unter anderem auf ihre Reinheit und Funktionalität hin getestet werden ¹⁶⁹.

Aufgrund ihres Potentials bei der Behandlung von Brandwunden, sollte als erster Teil dieser Arbeit deshalb die Isolation, Kultur und Charakterisierung von Keratinozyten so angepasst werden, dass sie den regulatorischen Vorgaben entspricht und standardisiert durchgeführt werden kann. Ein wichtiger Punkt hierbei ist die Einhaltung der „Good Manufactory Practice“ (GMP) Standards ¹⁷⁰. Neben einer angemessenen Laborausstattung, der Aus- und regelmäßigen Weiterbildung des Personals und der richtigen Dokumentation, liegt ein wichtiges Augenmerk hier auf den verwendeten Substanzen bei der Herstellung des Produktes. Um Supplemente tierischen Ursprungs verwenden zu können, müssen diese qualifiziert werden, was einen sehr aufwändigen Prozess darstellt. Aufgrund dessen werden tierische Komponenten, wenn möglich, durch synthetische Stoffe und chemisch definierte Supplemente ersetzt. Dies stellt jedoch eine nicht unwesentliche Abweichung zu bisher verwendeten Protokollen dar ¹⁶⁴.

In einer Proof of Concept Studie innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Isolation von Keratinozyten ohne FCS aus adulter Spenderhaut möglich ist. Die Spenderhaut für ein medizinisches Produkt kann jedoch von verschiedenen Quellen bezogen werden. Dies führt zum einen dazu, dass unterschiedlich lange Transportzeiten entstehen, zum anderen kann die Donorhaut aus verschiedenen Regionen des Körpers stammen. Wichtig ist, dass auch bei verlängerter Transport- und Lagerzeit keine signifikanten Verluste bei der Zellisolation entstehen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch eine verlängerte Lagerzeit und die Verwendung von Haut aus plastischen Operationen (statt Präputien) nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis der Isolation hat.

Während die Isolation von Keratinozyten jedoch nur ein relativ kurzer Prozess ist, bei dem FCS ersetzt werden kann, war vor allem die anschließende Expansion und Kultur der Zellen interessant. Hier sollten die Keratinozyten über einen Zeitraum von mehreren Wochen unter BPE-freien Konditionen in Kultur gehalten werden und proliferieren, ohne ihre Viabilität oder Funktionalität zu verlieren.

Die ersten standardisierten Protokolle zur Isolation und Kultur von Keratinozyten wurden bereits in den 1970er Jahren entwickelt ¹⁷¹. In den darauffolgenden Jahren wurden diese Protokolle modifiziert und verbessert, sodass die daraus gewonnenen Zellen zur Behandlung von Patienten eingesetzt werden konnten ^{172,173}. Jedoch fanden hier, neben diversen Wachstumsfaktoren, auch Feederlayer Verwendung, die die Zellen zur

Proliferation anregen. Diese bestehen meist aus murinen 3T3 Fibroblasten, die durch Bestrahlung in einen mitotisch inaktivierten, nicht proliferativen Zustand versetzt werden¹⁷¹. Ein großes Problem hierbei ist, dass unter diesen Kulturbedingungen ein potentiell Risiko durch Toxine, eine virale Verunreinigung durch FCS oder die Fibroblasten besteht. Da der Schutz von Patienten im Vordergrund steht, haben die Anforderung an Zellen als therapeutische Produkte stetig zugenommen und serum- und „feeder“-freie Kulturmedien wurden entwickelt^{174–176}. Viele dieser Protokolle sind aber noch immer nicht komplett frei von tierischen Komponenten, da sich bovines Hypophysenextrakt (BPE) als potenter Medienzusatz bei der Kultur von epithelialen Zellen erwiesen hat^{176,177}.

In dieser Studie wurde deshalb im direkten Vergleich zu einem Medienzusatz mit BPE ein kommerziell erhältlicher Medienzusatz verwendet, der frei von tierischen Komponenten ist und somit den geltenden Regularien entspricht. Bereits in der 2D Kultur der Keratinozyten zeigte sich, dass BPE freie Konditionen die Zellpopulation beeinflussen, was sich in einer Erniedrigung der Proliferation der Zellen und einer erhöhten Verdopplungszeit spiegelte. Dieser Effekt wurde bereits in den frühen 1980er Jahren beschrieben, als Gilchrest et al. verschiedene Medienzusätze zur Kultivierung von Keratinozyten testeten¹⁷⁸. Auch sie konnten beobachten, dass die Proliferation der Zellen ohne den Zusatz von BPE stark abnahm. Dieser Effekt war in den hier vorgestellten Ergebnissen jedoch aufgrund verbesserter BPE freier Medienzusätze deutlich geringer.

Um zusätzlich zu überprüfen, ob das zur Zellexpansion verwendete Medium einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der Zellen hat, war es wichtig zu untersuchen, ob sie noch in der Lage waren, qualitativ hochwertige Hautäquivalente zu bilden. In der 3D Kultur behielten die Keratinozyten die Fähigkeit zu Differenzieren und ein physiologisch intaktes, epidermales Gewebe zu bilden. Dieses war vergleichbar mit bereits publizierten OS-REp Modellen¹⁷⁹. Es konnten weder bei der Analyse der Viabilität der Modelle, noch bei der Messung der elektrischen Barriere mittels Impedanzspektroskopie Unterschiede entdeckt werden. Beide Methoden zeigten, dass durch eine Vorkultur der Zellen mit chemisch definierten Supplementen vergleichbare Werte erreicht wurden zu Zellen, die mit BPE haltigem Standardmedium kultiviert wurden. Auch die histologische Begutachtung der erstellten Hautäquivalente zeigte eine gute Qualität über die gesamte Kulturdauer von 21 Tagen, unabhängig des Mediums während der Vorkultur.

Den größten Effekt auf die Qualität der Modelle hatte nicht das verwendete Medium zur Expansion der Zellen, sondern die Passagenzahl der Keratinozyten im Hautäquivalent. Hier konnte man beobachten, dass sowohl die Barriereeigenschaft, als auch die histologische Beurteilung der Modelle beider Mediengruppen eine Abnahme der Qualität

in Passage 4 aufzeigten. Dies steht in Zusammenhang mit dem begrenzten Proliferationspotential primärer Zellen, die häufig nur in niedrigen Passagen eingesetzt werden können, da bereits nach relativ kurzer Kulturzeit ihr Wachstum stagniert^{180,181}. Auch bei der Kultur der primären Keratinozyten konnte dieser Effekt beobachtet werden. Wurden sie in höheren Passagen kultiviert, bzw. zu viele Teilungszyklen erreicht, so konnte bereits in der 2D Kultur beobachtet werden, dass die Zellen, unabhängig vom verwendeten Medium, weniger proliferieren und stattdessen beginnen zu differenzieren. Hieraus resultierte auch die Abnahme der Qualität der OS-REp Modelle (bei TEER Werten und BSGC Score), die mit diesen Zellen aufgebaut wurden.

Die Verwendung von chemisch definiertem Medium zeigte zwar keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen ein epidermales Gewebe zu bilden, sie führte jedoch dazu, dass die Schwankungen innerhalb der Versuchsgruppen viel geringer ausfielen. Obwohl Varianzen aufgrund der Verwendung verschiedener Donoren oder unterschiedlicher Herstellungsladungen von Medien und Supplementen auftreten können¹⁸², waren diese in Modellen, die BPE-frei vorkultiviert wurden, mit einer über 50 % niedrigeren Standardabweichung, sehr gering. Hier konnten sowohl hinsichtlich der Viabilität, Impedanz, als auch Histologie konstant stabilere Ergebnisse erzielt werden. Das spricht dafür, dass die Zusammensetzung der Population der eingesetzten Zellen über mehrere Experimente hinweg sehr homogen war. Die Verwendung von chemisch definierten Supplementen könnte sich also, trotz der Zunahme der Verdopplungszeit, als vorteilhaft erweisen. Denn um eine gleichbleibende Qualität und Wirkung eines medizinischen Produktes zu erreichen, ist es sehr wichtig, dass das Ausgangsprodukt, in diesem Fall die Keratinozyten, immer in gleicher Kondition eingesetzt werden. Der Einsatz von BPE freiem Medium eignet sich somit hier sehr gut, da die damit erzielten Ergebnisse über mehrere Passagen und bei mehreren Donoren sehr stabil waren.

Neben ihrer Fähigkeit, ein intaktes Hautmodell auszubilden, sollten die Zellen auch direkt nach der 2D Kultur charakterisiert werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Durchflusszytometrie verwendet, um die Expression spezifischer Zellmarker beobachten zu können. Dies erlaubt eine schnelle und zuverlässige Analyse, die direkt nach der Kultur durchgeführt werden kann, unter Einsatz einer geringen, definierten Zellzahl. Hier zeigte sich, dass vor allem der Marker K14 geeignet ist, um die Gesamtpopulation der Zellen abzubilden, während K1 und K10 vor allem zur Detektion von differenzierten Zellen genutzt werden kann^{183,184}. Die Zellen wurden über drei Passagen charakterisiert und zeigten stets ein positives Signal für K14 für fast 100 % der Zellen, was bestätigt, dass es sich um eine reine Zellpopulation handelte. Ein positives Signal für Keratin 1 und 10 konnte vor allem zu Beginn der Kultur und am Ende der Passage 2 nachgewiesen werden.

Nach der Isolation der Zellen aus der Epidermis befinden sich sowohl basale, als auch differenzierende Keratinozyten in der Kultur. Zwar adhären beide Subtypen an die Kulturflaschen, jedoch proliferieren nur erstere, weshalb nur ein geringer Anteil an K1 und K10 positiven Zellen nach Passage 0 detektiert werden konnte¹⁸⁵. Dieser Anteil nahm in der darauffolgenden Passage noch weiter ab. Der Grund hierfür ist, dass die differenzierten Zellen weiter überwuchert wurden, da die Differenzierung von Keratinozyten hauptsächlich durch eine Kalziumkonzentrationen von über 0,1 mM im Medium induziert wird¹⁸⁶. Da die Konzentration von Kalzium im verwendeten Medium jedoch nur bei 0,03 mM lag, proliferierten die Zellen weiterhin, ohne zu differenzieren¹⁸⁵. Die erneute Zunahme an differenzierten Keratinozyten nach Passage 2 kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnte hier der bereits erwähnte Effekt zum Tragen kommen, dass primäre Zellen in Kultur nur ein begrenztes Proliferationspotential haben¹⁸⁷. Zum anderen ist es auch möglich, dass die Zellen während der Kultur eine zu hohe Konfluenz erreicht haben, was, neben der Abnahme der Proliferation, ebenfalls die Differenzierung zur Folge haben kann¹⁸⁴.

Eine potentielle Verunreinigung der Zellpopulation durch Fibroblasten der Dermis sollte mit Hilfe des Fibroblastenmarkers Vimentin erreicht werden¹⁸⁸. Eine Unterscheidung anhand dieses Markers konnte jedoch nicht getroffen werden, da dieser auch von Keratinozyten in gleichem Maße exprimiert wird. Hierfür eignet sich jedoch die Verwendung des bereits etablierten Antikörpers für Keratin 14. Bei einem gewünschten Anteil von über 90 % K14 positiven Zellen, zeigten die kultivierten Keratinozyten hier sogar beinahe 100 % positives Signal für K14. Da dermale Fibroblasten dieses Filament nicht exprimieren, konnte eine Mischkultur aus 50 % Keratinozyten und 50 % Fibroblasten einfach detektiert werden¹⁸⁹. Sie führte zur Bildung von zwei klar unterscheidbaren Populationen während der Durchflusszytometrie. Zwar beschreiben Katagata et al., dass von ihnen kultivierte Fibroblasten Keratin 14 exprimieren, jedoch wurde in dieser Studie eine Zelllinie genutzt, die meist in einer hohen Passagenzahl Verwendung findet¹⁹⁰. Dies steht im Gegensatz zu den hier verwendeten primären Fibroblasten, die ausschließlich in frühen Passagen nach der Isolation kultiviert wurden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Isolation und Kultur von Keratinozyten für ein medizinisches Produkt unter serumfreien, chemisch definierten Bedingungen möglich ist. Hierfür mussten geringfügige Anpassungen bereits bestehender Protokolle vorgenommen werden, die jedoch keinen Einfluss auf charakteristische Fähigkeiten der Zellen *in vitro* hatten. Außerdem bietet die Durchflusszytometrie mit den Markern Keratin 1, 10 und 14 die Möglichkeit die Zusammensetzung und Reinheit der Zellpopulation zu bestimmen und die Zellen zu charakterisieren.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zellen bei Verwendung chemisch definierter Supplemente in einem weniger stark proliferativen Zustand gehalten, oder in ihn versetzt werden, weshalb sie während der 3D Kultur in der Lage sind, länger stabil zu differenzieren und ein epidermales Gewebe auszubilden. So eliminiert die Verwendung eines chemisch definierten Supplements interexperimentelle Varianzen, die aufgrund von Schwankungen in der Zusammensetzung tierischer Medienzusätze, wie BPE, entstehen ¹⁹¹. Hier kann die Spenderabhängigkeit viel mehr zum Tragen kommen, was vor allem in der angewandten Forschung, wie in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie von Interesse ist ¹⁹². Durch diese Eigenschaft können dann bereits in der Entwicklung und Testung von Substanzen Donorvariationen abgebildet werden. Die mögliche Verwendung von Medien ohne Zusätze tierischen Ursprungs ist aber nicht nur bei der Entwicklung neuer Zelltherapeutika von großem Interesse, sondern auch ein wichtiger Schritt in der Forschung. Die Etablierung alternativer Testmethoden zu Tierversuchen und die Einhaltung der 3R Prinzipien ¹⁹³ kann nämlich erst dann wirklich umgesetzt werden, wenn auch innerhalb der Zellkultur keine tierischen Komponenten mehr vonnöten sind.

5.2 Konservierung von Keratinozyten für eine langfristige Lagerung

Als nächster Punkt bei der Produktentwicklung sollte die Kryokonservierung von Keratinozyten so optimiert werden, dass sowohl die Einfrierrate, als auch die verwendeten CPAs zur Lyophilisierung der Zellen verwendet werden können. Bei der Wahl der CPAs musste zudem darauf geachtet werden, dass diese Chemikalien später in medizinischen Produkten verwendet werden können. Ein großer Vorteil eines lyophilisierten Produktes ist die mögliche Lagerung bei moderaten Temperaturen ohne einen signifikanten Qualitätsverlust ¹⁹⁴. Denn neben der Gewinnung der Zellen für ein ATMP, ist ein weiterer wichtiger Punkt die Lagerung des Endproduktes. Obwohl die Behandlung von Wunden mit zellbasierten Produkten viele Vorteile mit sich bringt, so stellt die Lagerung und der Transport dieser Systeme ein großes Problem dar. Einige Produkte sind nur bei Bedarf bestellbar, da eine Lagerung nicht möglich ist ⁴. Andere Produkte sind zwar haltbar, jedoch nur bei sehr tiefen Temperaturen, wie - 80 °C, was spezielle Tiefkühlagerstätten erfordert, die nicht in jeder Klinik vorhanden sind ¹⁶⁵. Um dieses Problem zu umgehen, ist es wichtig ein Therapeutikum zu entwickeln, welches in einem Standard Gefrier- oder Kühlschrank bei moderaten Temperaturen, zwischen - 20 °C und 4 °C, für längere Zeiträume stabil gelagert werden kann. Die Gefriertrocknung von Produkten stellt hierfür eine geeignete Möglichkeit dar, und wurde in der Vergangenheit auch bereits für viele biologische Stoffe, wie Antikörper ¹⁹⁵,

angewendet. Da im Zuge der Lyophilisierung dem System jedoch ein Großteil des Wassers entzogen wird, gestaltet sich dieser Vorgang bei Zellen als sehr schwierig. Ferner konnte für Hefen ¹⁹⁶ und mononukleäre Zellen, wie Thrombozyten ⁹⁸, die Gefriertrocknung bereits erfolgreich durchgeführt werden, was dieses Verfahren auch für die Konservierung von Keratinozyten als Therapeutikum sehr interessant macht. Wichtig hierbei ist, dass der erste Schritt innerhalb der Lyophilisierung, die Kryokonservierung, optimiert wurde, damit die Zellen in einem möglichst optimalen Zustand getrocknet werden können.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfrierprozess von Keratinozyten zu optimieren und somit einen ersten Schritt in Richtung einer erfolgreichen Lyophilisierung von Zellen zu gehen. Die aktuelle Forschung im Bereich der Kryobiologie fokussiert sich vor allem auf die erfolgreiche Konservierung im Rahmen der Reproduktionsmedizin, sowohl von Menschen, als auch von Tieren und Pflanzen ^{197,198}. Hier gelangen schon große Erfolge im Bereich der Konservierung von einzelligen Systemen, wie Oozyten ^{108,199} und Spermien ¹⁹⁸, aber auch mehrzellige Embryonen ²⁰⁰ und Organoide ²⁰¹, bis hin zu Organen ^{92,202} können erfolgreich eingefroren und wieder aufgetaut werden. Um die Kryokonservierung von Keratinozyten zu optimieren, wurden die Zellen im Zuge dieser Arbeit sowohl bei unterschiedlichen Einfrierraten, als auch mit unterschiedlichen Kryoprotektiva eingefroren.

Als Kryoprotektiva wurden mit DMSO, Trehalose und Hydroxyethylstärke (HES) sowohl eine zellpermeable (DMSO), als auch zwei nicht membrangängige Substanzen (Trehalose, HES), die bereits in klinischen Anwendungen verwendet werden ^{203,204}, gewählt. Außerdem wurde jeweils eine Kombination aus beiden Kategorien verwendet, um zu adressieren, ob dies einen zusätzlichen positiven Effekt auf das Überleben der Zellen nach dem Einfrieren hat. Wie Mazur et al. bereits 1965 anhand der „2-Faktor-Hypothese“ beschrieb ⁸⁹, gibt es für jeden Zelltyp eine optimale Einfriergeschwindigkeit. Schnelleres oder langsames Herabkühlen der Zellen führt zu einer verminderten Viabilität durch osmotischen Stress oder durch die Bildung von intrazellulärem Eis. Mithilfe von Chemikalien wie DMSO, ist es jedoch möglich den Bereich der optimalen Temperatur zu erweitern und so selbst bei „suboptimalen“ Kühlraten eine erfolgreiche Kryokonservierung von Zellen zu erreichen ¹²². Die Kombination aus einer Kühlrate von 1 K/min und der Verwendung von 5 - 10 % DMSO als CPA hat sich so in vielen Laboren weltweit als sehr erfolgreich bewährt und wird zur Konservierung verschiedenster Zelltypen angewendet ²⁰⁵. Auch in dieser Arbeit zeigte sich, dass diese Kombination bei Suspensionszellen sehr effektiv war, da im Vergleich mit den anderen CPAs und Kühlraten, die meisten viablen Zellen nach dem Auftauen gefunden werden konnten.

Gleichzeitig zeigte sich, dass bei schnelleren Kühlraten, wie sie bei der Lyophilisierung Anwendung finden, vor allem nicht-zellpermeable Stoffe, wie Trehalose und HES zum Schutz der Zellen geeignet sind ^{206–209}.

Hydroxyethylstärke lieferte hier nicht nur bei Keratinozyten in Suspension sehr gute Ergebnisse, sondern vor allem auch bei adhärennten Zellen. Hier kamen vermutlich mehrere Faktoren zum Tragen, die HES zu einem geeigneten CPA machen. Zum einen ist das Polymer aufgrund seiner Größe osmotisch inaktiv und bildet eine stabilere Glasmatrix ²¹⁰, was die Konservierung und Lagerung auch unter suboptimalen Bedingungen, wie Adhärenz- statt Suspensionskultur, ermöglicht. Außerdem erhöht HES die Viskosität des Einfriermediums, wodurch Zellen langsamer dehydriert werden, was wiederum Zellschäden verringert oder ganz verhindert ^{211,212}. Die erfolgreiche Konservierung zeigte sich auch in der Tatsache, dass die Zellen nach dem Auftauen proliferativ waren und innerhalb einer Woche einen dichten Monolayer gebildet hatten. Jedoch müsste man für eine medizinische Anwendung untersuchen, ob die Zellen selbst in einer Wundumgebung noch proliferieren und ob sie sich während des Wundschlusses in den Organismus des Patienten integrieren. Idealerweise würden die Zellen einer Wundaufgabe lediglich als „Carrier“ dienen, um Wachstumsfaktoren direkt in die Wunde zu applizieren, wobei Keratinozyten hier eine ideale Grundlage darstellen ⁴.

Während sich bei den nicht-membrangängigen Substanzen HES als sehr wirksam zum Schutz von Zellen vor Schädigungen durch das Einfrieren zeigte, konnte Trehalose nur bedingt überzeugen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der Zucker lediglich als Medienzusatz angewendet und nicht, wie bereits vielfach publiziert, artifiziell in die Zellen eingebracht wurde ²¹³. Trehalose kann zwar auch extrazellulär während des Einfriervorgangs schützen, jedoch ist dieser Effekt sehr begrenzt. Um eine maximale Schutzwirkung zu erreichen, muss sie auf beiden Seiten der Zellmembran vorliegen ^{214,215}. Bei der Kryokonservierung von Suspensionszellen konnten, im Vergleich zu HES, trotzdem ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden. Dies wurde möglicherweise durch eine Aufnahme von Trehalose in die Zellen während des Einfriervorgangs begünstigt ²¹⁶. Bei adhärennt eingefrorenen Zellen waren bereits direkt nach dem Auftauen keine viablen Zellen mehr detektierbar. Die begrenzte Wirkung von extrazellulärer Trehalose war hier nicht ausreichend, um die komplexere Konservierung von adhärennten Zellen zu ermöglichen. Bereits seit vielen Jahren ist bekannt, dass sich während des Einfrierens intrazelluläre Eiskristalle zwischen Zellen in Monolayern und Geweben verbreiten können ^{217,218}, jedoch wurde erst in den frühen 2000er Jahren durch Acker et al. ²¹⁹ und Irimia und Karlsson ²²⁰ bestätigt, dass dies unter anderem über die Gap-Junctions zwischen den Zellen im Monolayer geschieht. Lange Zeit ging man davon aus, dass die Bildung dieser intrazellulären Eiskristalle in Zellen unweigerlich zu deren

Tod führt. Neuere Studien legen jedoch nahe, dass hierdurch auch ein kryoprotektiver Schutz der Zellen entstehen kann^{221,222}. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung dafür sein, weshalb bei einem der drei Donoren die adhärenen Zellen auch mit Trehalose als CPA das Einfrieren und Auftauen überlebten. Im Gegensatz zu den beiden anderen Spendern waren die Zellen hier konfluent, was eine Ausbreitung von Eiskristallen zwischen den Zellen begünstigte, die wiederum einen kryoprotektiven Effekt ausübten.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Zellen während der Kryokonservierung am besten durch Kombination von intra- und extrazellulären CPAs geschützt werden, wurde auch jeweils eine Kombination aus HES/Trehalose mit einer geringen Konzentration DMSO eingesetzt. Ein positiver Effekt der Supplementierung konnte aber nur bei der Kryokonservierung von Suspensionszellen festgestellt werden. Hier könnte vor allem in frühen Phasen des Kühlvorgangs der Gefrierpunkt der Lösung durch DMSO herabgesetzt werden, was dazu führt, dass bei niedrigen Temperaturen weniger Eiskristalle entstehen und somit die Konzentration der gelösten Salze niedriger ist. Dass der positive Effekt nur gering ausfiel, kann auch an der eingesetzten Konzentration von 2 % DMSO liegen. Es wurde bereits gezeigt, dass der Einsatz von DMSO in niedrigen Konzentrationen lediglich zu einem dünneren Lipid-Bilayer von Membranen führt, während sich ab einer Konzentration von 10 % zusätzlich Poren in der Membran bilden, durch die Wasser strömen kann, um unterschiedliche Salzkonzentrationen zwischen intra- und extrazellulärem Raum auszugleichen²²³.

Zusammenfassend konnte wissenschaftlich belegt werden, dass die Kryokonservierung von Keratinozyten sowohl in Suspension, als auch adhären möglich ist. Auch die Anwendung verschiedener Kühlraten stellt kein Problem dar, solange die verwendeten CPAs entsprechend ausgewählt und angepasst werden. In dieser Arbeit zeigten die extrazellulären Stoffe HES und Trehalose, welche auch in der klinischen Anwendung bedenkenlos verwendet werden können, eine gute Wirksamkeit bei der Kryokonservierung von Keratinozyten. Trotz der eingeschränkten Wirkung von Trehalose im Monolayer, stellt der Zucker ein vielversprechendes CPA für die Lyophilisierung von Keratinozyten in Suspension dar, da bekannt ist, dass hohe Konzentrationen von Mono- und Disacchariden in biologischen Systemen während der Trocknung einen schützenden Effekt ausüben²²⁴. Somit wurde ein erster grundlegender Prozess zur Konservierung von Keratinozyten etabliert. Des Weiteren gelang es Kooperationspartnern an der LMU München mit Hilfe dieser Daten Keratinozyten erfolgreich zu lyophilisieren und die Entwicklung des geplanten Zelltherapeutikums damit einen Schritt weiter zu führen.

5.3 Untersuchung von Verbrennungswunden an *in vitro* Modellen

Als abschließender Punkt sollte ein *in vitro* Wundmodell für Verbrennungen etabliert werden. Dieses System sollte genutzt werden, um Verbrennungswunden und deren Heilung zur Erforschung und das in Kooperation entwickelte gefriergetrocknete Zelltherapeutikum in einem ersten präklinischen Experiment zu testen.

Obwohl ihre Vorhersagekraft oftmals fragwürdig ist, sind *in vivo* Wundmodelle noch immer der Goldstandard, um die Wirksamkeit von Wundbehandlungen zu bewerten²²⁵. Allerdings stellen sich bei Untersuchung mittels Tiermodellen erhebliche praktische Herausforderungen, wie z. B. der Umgang mit extrem kalten und heißen Materialien. Darüber hinaus erfordern diese Experimente eine umfangreiche Ausstattung in der jeweiligen Forschungseinrichtung und erfordern spezielle Geräte, um eine reproduzierbare Wunde zu erzeugen²²⁶. Auch die Analyse von Tierversuchen wird oft durch Faktoren, wie einer variablen Epidermis- und Dermisdicke erschwert und ist zudem auf wenige Methoden, wie die makroskopische Begutachtung und die Histologie, beschränkt. Im Gegensatz dazu können *in vitro* Modelle relativ einfach in Standard Zellkulturlabore implementiert werden und weisen eine geringe Variabilität zwischen und innerhalb verschiedener Chargen auf¹⁵³. Ferner ermöglichen diese Modelle die parallele Untersuchung von mehreren Versuchsgruppen und damit einen höheren Durchsatz bei der präklinischen Bewertung. Aufgrund dessen war ein Ziel dieser Arbeit, zunächst ein *in vitro* Testmodell zur Untersuchung leichter Verbrennungen (Grad I) zu etablieren und zu charakterisieren.

Verbrennungswunden der Haut sind nur bedingt vergleichbar mit mechanischen Wunden, denn eine Verletzung durch thermische Energie führt zu anderen physikalischen und zellulären Reaktionen und Prozessen in der Haut als eine mechanische Wunde²²⁷. Zunächst führt die hohe Temperatur zu einer schnellen Denaturierung von zellulären Proteinen und schließlich zur Nekrose in den betroffenen Bereichen. Diese resultiert, neben der Ablösung der Epidermis von der darunter liegenden Basalmembran, in histologischen Merkmalen, wie z.B. Zellschwellung, Lockerung der Zell-Zell-Kontakte und nekrotischer Fragmentierung der Zellkerne²²⁸⁻²³¹. Die gleichen histologischen Effekte waren auch in den verbrannten Epidermismodellen nachweisbar, zusammen mit einer lokalen Reduktion der Viabilität, einem starken Anstieg von LDH im Kulturmedium und dem Verlust von HMGB1. Nach den akuten Auswirkungen einer Verbrennung ersten Grades beginnen Keratinozyten zu proliferieren und in den Wundbereich einzuwandern, um den Defekt zu schließen²²⁷. Wenn jedoch kein Debridement durchgeführt wird, was vor allem bei tieferen Verbrennungswunden

wichtig ist, unterscheidet sich die Heilung einer Brandwunde erheblich von der einer mechanischen Wunde ²²⁷. In einer nicht debridierten Verbrennung verbleibt das nekrotische, verbrannte Gewebe über dem Wundbett und die neu geformte Epidermis muss unter dem zerstörten Gewebe wachsen. Durch dieses Einwachsen wird das verbrannte Gewebe nach oben geschoben und später durch Abschuppung abgelöst. Mit diesem Prozess übereinstimmend zeigten die H&E- und HMGB1 Färbungen, dass die Reepithelisierung in den Verbrennungsmodellen ebenfalls von den Wundrändern ausging, wodurch das nekrotische Gewebe nach oben verdrängt wurde. Die neu gebildete Epidermis zeigte dabei sowohl eine passende physiologische Morphologie, als auch ein basales und supra-basales Keratinnetzwerk, bestehend aus Keratin 10 und 14.

Da proliferative Keratinozyten in der Basalschicht der Epidermis für die Gewebeerneuerung verantwortlich sind ^{232,233}, war Ki67 auch in den hier etablierten Modellen auf die Basalschicht beschränkt. Obwohl ein schwaches Ki67-Signal auch in den verbrannten Bereichen gefunden wurde, war dies eher auf denaturierte Ki67-Proteinsignale zurückzuführen. Das Fortschreiten und die Geschwindigkeit der Reepithelialisierung konnten anhand der gemessenen Wundfläche bestimmt werden. Auf Basis der prozentualen Wundfläche wurde hierfür zunächst die tatsächliche Fläche der Verbrennungswunde bestimmt. Anhand dessen konnte im Anschluss der Radius der Wunde berechnet werden. Mit zunehmender Reepithelialisierung der Modelle verringerten sich Wundfläche und -radius und es konnte eine Heilungsgeschwindigkeit von 120 µm pro Tag berechnet werden. Diese war ähnlich zu bereits etablierten und publizierten Wundmodellen, die eine Geschwindigkeit von 170 µm pro Tag ermittelten ^{234,235}.

Neben den morphologischen Merkmalen wurden weitere Parameter für die Gewebefunktionalität, wie die elektrische Hautbarriere, bewertet. Die Impedanz der unverwundeten Kontrollmodelle stieg mit der Zeit an, was auf eine fortschreitende Gewebereifung hinweist. Zwar behielten die verbrannten Modelle eine gewisse Barrierefunktion bei, diese stagnierte aber im Laufe der Zeit, was die histologischen Daten bestätigte, die einen unvollständigen Heilungsprozess innerhalb von 14 Tagen zeigten. Die intakte Barriere nach dem Verwundungsprozess steht vor allem im Gegensatz zu mechanisch verwundeten Modellen. Bei diesen führte eine Verletzung mit Hilfe einer Biopsiestanze zu einem fast vollständigen Verlust der elektrischen Hautbarriere ²³⁵. Eine Verbrennungswunde entfernt jedoch nicht Teile der Epidermis, sondern führt zu einer Denaturierung der Proteine und Lipide. Somit ist die physikalische Barriere der Epidermis teilweise intakt, weshalb keine Abnahme der Werte in der Impedanzmessung zu sehen war.

Auf der Stoffwechselebene konnte in den Verbrennungsmodellen in der ersten Woche nach der Verwundung eine stressassoziierte Umstellung auf einen "anaeroben" Stoffwechsel beobachtet werden. Dieser ist durch eine Verschiebung der Differenz zwischen Glukoseverbrauch und Laktatproduktion zu negativen Werten gekennzeichnet²³⁶ und konnte auch in einem zuvor publizierten Wundmodell beobachtet werden²³⁵. Außerdem gibt es Hinweise, dass ein erhöhter Laktatlevel im Serum, auch Hyperlaktatämie genannt, bei einigen Patienten in der Klinik nach einer Verbrennung auftritt, wo er als prognostischer Marker für einen Schockzustand genutzt werden kann²³⁷.

Nach einer Verwundung antwortet die Haut auf eine Verbrennungswunde mit zahlreichen zellulären Signalen. Die Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 sind wichtige Mediatoren der Entzündungsreaktion nach einer Verwundung und werden mit einer gesteigerten Keratinozytenproliferation und -motilität in Verbindung gebracht^{238–242}. In den Verbrennungsmodellen waren IL-8 und IL-6, nicht aber IL-1 β , 3 Stunden nach dem Einbringen der Wunde signifikant erhöht, kehrten dann aber auf die Basalwerte zurück. Die beobachtete Abnahme der IL-8- und IL-6 Konzentration über den Heilungszeitraum stimmt damit überein, dass z.B. IL-8 nur während der entzündlichen Phase der Wundheilung hochreguliert wird²⁴³. Damit übereinstimmend gibt es mehrere Berichte von Verbrennungspatienten, die ebenfalls einen starken Anstieg von IL-8 und IL-6 in der Akutphase kurz nach der Brandverletzung zeigen, gefolgt von einem allmählichen Rückgang für beide Faktoren^{244–249}. Zwar zeigte sich nur kurz nach Verbrennung der Modelle eine signifikant erhöhte Sekretion von VEGF, jedoch könnte diese durch das zuvor ausgeschiedene IL-8 induziert worden sein. Ein solcher Zusammenhang zwischen der Sekretion von IL-8 und der Induktion von VEGF konnte in der Vergangenheit bereits mehrfach nachgewiesen werden^{250,251}. Während die Sekretion von IL-1 β *in vivo* nach Verwundung sofort erhöht ist, wird beschrieben, dass sie bis in die späte proliferative Phase des Heilungsprozesses anhält^{252–255}. Dieser Effekt konnte in den Modellen nicht beobachtet werden, ist aber möglicherweise auf das Fehlen von Immunkomponenten wie Makrophagen und Neutrophilen zurückzuführen, die bei der Wundheilung eine wichtige Rolle spielen^{239,256,257}. Insgesamt konnte jedoch festgestellt werden, dass die hier etablierten Verbrennungsmodelle bezüglich ihrer Zytokinprofile eine hohe Korrelation zur *in vivo* Situation beim Menschen zeigen.

Vergleicht man das hier etablierte epidermale Verbrennungsmodell mit früheren Studien, die ausschließlich in Vollhautsystemen durchgeführt wurden, konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Insbesondere hinsichtlich der histologischen Analyse des Wundheilungsprozesses zeigten die Modelle ähnliche Ergebnisse wie bereits von Breetveld et. al und Iljas et. al beschrieben^{234,258}. Obwohl auch die Entzündungsreaktion

in früheren Publikationen untersucht wurde²⁵⁹, wurde sie bisher nur kurzzeitig nach der Verbrennung beobachtet (maximal 48 h). Darüber hinaus fanden Veränderungen des Stoffwechsels und der elektrischen Barriere, die in dieser Arbeit über den gesamten Kulturzeitraum bestimmt wurden, bisher in keiner Veröffentlichung über Verbrennungswunden Beachtung.

Um in Zukunft auch Wunden verschiedener Tiefgrade darstellen und untersuchen zu können, wurde außerdem ein weiteres *in vitro* Wundmodell auf Basis eines Vollhautäquivalents etabliert. Da diese Modelle auch eine dermale Komponente besitzen, war es möglich, nicht nur epidermale Verletzungen zu erzeugen, sondern auch Wunden in tieferen Gewebeschichten. So konnten erfolgreich die Verbrennungsgrade I, IIa und IIb in den Modellen abgebildet werden und ihre Regeneration kann in zukünftigen Studien untersucht werden.

Hinsichtlich des zuerst etablierten epidermalen Verbrennungsmodells konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal ein Modell vorgestellt werden, um die Wirkung von thermischen Verletzungen ausschließlich auf die Epidermis zu analysieren. Es erlaubt eine tiefere und spezifischere Analyse der Keratinozytenpopulation während der Wundheilung und einen tieferen Einblick in die metabolischen und molekularen Veränderungen der Keratinozyten. Dies geschieht unbeeinflusst von Störfaktoren durch andere Zelltypen, Gewebe oder Umweltfaktoren. Mithilfe des anschließend entwickelten Vollhaut-Verbrennungsmodells kann die Komplexität des Modells jedoch sukzessiv erhöht und um weitere Faktoren, wie einer Immunkomponente oder Vaskularisierung, ergänzt werden.

5.3.1 Die Behandlungserfolge an einem epidermalen Wundmodell sind limitiert

Als abschließender Punkt sollte evaluiert werden, ob das epidermale Verbrennungsmodell sich zur präklinischen Testung aktiver Substanzen eignet. Im Zuge dessen sollte auch das in Kooperation entwickelte gefriergetrocknete Zelltherapeutikum in einem ersten präklinischen Experiment appliziert werden.

Um zu testen, ob das hier entwickelte epidermale Wundmodell in die präklinische Bewertung von Therapien für Brandwunden implementiert werden kann, wurde zunächst die Wirkung einer kommerziellen Salbe auf den Wundheilungsprozess untersucht. Bepanthen® Wund- und Heilsalbe mit dem Wirkstoff Dexpanthenol (Pantothenensäure) ist eine topische Formulierung, die zur Behandlung kleinerer Wunden, wie z. B.

oberflächlicher Verbrennungen, eingesetzt wird und in vielen Haushalten vorhanden ist ²⁶⁰.

In dieser Arbeit zeigte Dexpanthenol einen positiven Effekt auf die Morphologie der neu gebildeten Epidermis. Die Behandlung führte außerdem zu einem verlängerten negativen Verhältnis von Glukoseverbrauch und Laktatproduktion, was auf einen höheren Metabolismus oder ein gesteigertes Wachstum der Keratinozyten hinweist. Dies stimmt mit einer Studie überein, in der beschrieben wurde, dass Fibroblasten nach Verwundung einen erhöhten Umsatz von CoA aufweisen, was in einem erhöhten Bedarf an Pantothersäure resultiert. Dieser Bedarf konnte durch die Behandlung mit Dexpanthenol gedeckt werden, wodurch die Wundheilung verbessert wurde ²⁶¹. Diese Beobachtung wurde in den Epidermismodellen auch durch eine erhöhte Anzahl Ki67-positiver Zellen im Bereich des Wundrands und einer gesteigerten Viabilität des umliegenden Gewebes nach 14 Tagen unterstützt. Trotz dieser positiven Effekte von Dexpanthenol wurde die Reepithelisierung der Modelle nach Verbrennung nicht signifikant verbessert. Sie könnten jedoch *in vivo* stärker ausgeprägt sein und die in früheren Studien beobachteten positiven Effekte einer Dexpanthenol-Behandlung auf die Wundheilung erklären ^{262,263}. So konnte in einer zuvor veröffentlichten Studie von Marquardt et al. in einem Vollhautäquivalent ein positiver Effekt auf den Wundverschluss durch Behandlung mit Dexpanthenol beobachtet werden ²⁶². Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf einige grundlegende Unterschiede im Versuchsaufbau zurückzuführen sein. Abgesehen von der möglichen Beeinflussung durch die Fibroblasten im dermalen Teil des Modells unterschieden sich die Art der Verwundung und die Wundgröße erheblich von dem hier etablierten Verbrennungsmodell. Während in dieser Arbeit eine Verbrennungswunde ersten Grades zugefügt wurde, wurde in der erwähnten Studie ein Laser zur Verwundung verwendet. Dadurch wurde das nekrotische Gewebe direkt aus der Wundfläche entfernt und somit ein direktes Eindringen der Substanz(en) in den Wundbereich und die angrenzenden Zellen ermöglicht.

Während weitere Studien berichteten, dass eine Dexpanthenol-Behandlung auch *in vivo* einen positiven Effekt auf die Barrierefunktion der Haut hat ²⁶⁴ (festgestellt über den transepidermalen Wasserverlust), konnte in dem hier entwickelten Verbrennungsmodell eine Abnahme der Impedanzwerte nach der Behandlung beobachtet werden. Die Reduktion der TEER_{1000Hz} Werte kann durch die Behandlung mit der Salbe erklärt werden. Die Applikation von Dexpanthenol führt zu einer Auflockerung der Ziegelstein- und Mörtelstruktur im Stratum corneum und somit zu einer Abnahme der Impedanzwerte. So wurde bereits beschrieben, dass bei der Behandlung von Schweinehaut mit Dexpanthenol, der Wirkstoff mit extrazellulären Lipidsegmenten und Proteinen innerhalb der Korneozyten interagiert und deren Mobilität erhöht ²⁶⁵.

Dieser Effekt ist vor allem in *in vitro* Modellen verstärkt zu beobachten, da die Salbe auf dem Modell verbleibt und nicht durch z. B. einen Wundverband entfernt wird. Es wurde außerdem bereits beschrieben, dass Dexpanthenol den Hydratationsgrad im Stratum corneum erhöht²⁶³, was den Wasserverlust und die elektrische Barriere auf unterschiedliche Weise beeinflussen könnte.

In zukünftigen Studien sollte die Behandlung auch über eine systemische Applikation von Dexpanthenol in das Kulturmedium erfolgen, um zu prüfen, ob durch eine direktere Applikation der Substanz die positiven Effekte auf die Wundheilung stärker ausgeprägt werden ²⁶².

Die Proof of Concept Studie mit Applikation des lyophilisierten Zellprodukts bestätigte außerdem, dass nicht alle Therapien mit einem epidermalen Modell getestet werden können. Für diese und ähnliche Wundaufgaben wird eine dermale Komponente benötigt. Das zusätzlich entwickelte Vollhautmodell zur Untersuchung verschiedener Verbrennungsgrade könnte hier eine vielversprechende Alternative darstellen.

6 Fazit und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit konnten viele Parameter erfüllt werden, die es ermöglichen, ein zellbasiertes Therapeutikum zur Behandlung von Wunden zu produzieren. Hierfür wurden die Kulturbedingungen der Zellen an gängige GMP-Standards angepasst. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zellen, trotz veränderter Kulturbedingungen, ihre Funktionalität behielten und weiterhin in der Lage waren zu differenzieren und stratifizieren. Als nächster Schritt könnten nun Methoden etabliert werden, die es ermöglichen die Effizienz der Zellexpansionsphase zu erhöhen. Hierfür eignen sich Systeme, wie Multilayer-Kulturflaschen ²⁶⁶ oder Hollow-Fiber Reaktoren ²⁶⁷.

Die Vorarbeiten zur Konservierung der Zellen konnten bereits erfolgreich genutzt werden, um Keratinozyten zu lyophilisieren. Die Durchführung präklinischer Studien zur Evaluierung der Wirksamkeit von gefriergetrockneten Keratinozyten bei der Behandlung von Brandwunden wird hier der nächste wichtige Schritt in der Produktentwicklung sein.

Im Zuge dieser Arbeit konnte außerdem ein Modell entwickelt werden, das physiologisch eine Verbrennung ersten Grades darstellt und, neben der Sekretion wichtiger Stress- und Entzündungsmarker, eine Reepithelialisierung über zwei Wochen aufweist. Auch die Behandlung der Modelle mit 5 % Dexpanthenol zeigte positive Effekte, die sich vor allem im Glukose-Metabolismus und der physiologischen Qualität der regenerierten Haut zeigten. Da die Therapieformen, die an diesem Modell getestet werden können, limitiert sind, wurde anschließend ein Wundmodell etabliert, das eine dermale Komponente besitzt. Hier war es möglich, alle Verbrennungsgrade abzubilden. Als nächster Schritt soll die Wundheilung dieses Modells untersucht und erste Behandlungen daran getestet werden. In Zukunft könnte die Implementierung von verschiedenen Gewebekomponenten, wie z. B. subkutanem Gewebe (Fettgewebe) oder Teilen des Immunsystems, die potenzielle Verwendung des Verbrennungsmodells erweitern. Eine weitere spannende Möglichkeit zur Weiterentwicklung des Verbrennungsmodells wäre die Zugabe von Zellen aus dem Hautmikrobiom. Dies würde dazu beitragen, die unvollkommenen Bedingungen innerhalb einer Wunde *in vivo* weiter zu rekapitulieren und zum Beispiel chronische Wunden zu simulieren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Zuge dieser Arbeit die Grundpfeiler gelegt wurden, um in Zukunft ein zellbasiertes Therapeutikum zu entwickeln, welches auch bei moderaten Temperaturen gelagert werden kann. Zusätzlich wurden Modelle zur Untersuchung von Verbrennungswunden etabliert, welche der Reduktion von Tierversuchen dienen können, da sie die *in vitro* Situation der Wundheilung im Menschen zuverlässig abbilden.

7 References

1. Yousef H, Alhadj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/> (2021).
2. Yamaguchi, Y. & Yoshikawa, K. Cutaneous wound healing: an update. *The Journal of dermatology* **28**, 521–534; 10.1111/j.1346-8138.2001.tb00025.x (2001).
3. Sun, B. K., Siprashvili, Z. & Khavari, P. A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science (New York, N.Y.)* **346**, 941–945; 10.1126/science.1253836 (2014).
4. Shpichka, A. *et al.* Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem cell research & therapy*, 94; 10.1186/s13287-019-1203-3 (2019).
5. Haake, A. R. and Holbrook, K. (ed.). *The Structure and Development of Skin*. (1999).
6. Burgeson, R. E. Genetic Heterogeneity of Collagens. *The Journal of investigative dermatology* **79**, 25–30; 10.1038/jid.1982.6 (1982).
7. Harper, R. A. & Grove, G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro. *Science (New York, N.Y.)* **204**, 526–527; 10.1126/science.432659 (1979).
8. Strong, A. L., Neumeister, M. W. & Levi, B. Stem Cells and Tissue Engineering: Regeneration of the Skin and Its Contents. *Clinics in plastic surgery* **44**, 635–650; 10.1016/j.cps.2017.02.020. (2017).
9. Han, X., Bibb, R. & Harris, R. Design of bifurcation junctions in artificial vascular vessels additively manufactured for skin tissue engineering. *Journal of Visual Languages & Computing* **28**, 238–249; 10.1016/j.jvlc.2014.12.005 (2015).
10. Arda, O., Göksügür, N. & Tüzün, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology* **32**, 3–13; 10.1016/j.clindermatol.2013.05.021 (2014).
11. Abdo, J. M., Sopko, N. A. & Milner, S. M. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine* **28**, 100179; 10.1016/j.wndm.2020.100179 (2020).
12. Dijkhoff, I. M. *et al.* Impact of airborne particulate matter on skin: a systematic review from epidemiology to in vitro studies. *Particle and fibre toxicology* **17**, 35; 10.1186/s12989-020-00366-y (2020).
13. van Smeden J. A breached barrier: Analysis of stratum corneum lipids and their role in eczematous patients [Internet]. Available at <https://openaccess.leidenuniv.nl/handle/1887/20998>. (2013).
14. Rousselle, P., Braye, F. & Dayan, G. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Advanced drug delivery reviews* **146**, 344–365; 10.1016/j.addr.2018.06.019 (2019).
15. Clark, R. A. Fibrin and wound healing. *Annals of the New York Academy of Sciences* **936**, 355–367; 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03522.x (2001).
16. Velnar, T., Bailey, T. & Smrkolj, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of international medical research* **37**, 1528–1542; 10.1177/147323000903700531 (2009).
17. Ross, R. & Odland, G. Human wound repair. II. Inflammatory cells, epithelial-mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. *The Journal of cell biology* **39**, 152–168; 10.1083/jcb.39.1.152 (1968).
18. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **16**, 585–601; 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x (2008).
19. Nissen, N. N. *et al.* Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The American Journal of Pathology* **152**, 1445–1452 (1998).
20. Tsirogianni, A. K., Moutsopoulos, N. M. & Moutsopoulos, H. M. Wound healing: immunological aspects. *Injury*, S5-12; 10.1016/j.injury.2006.02.035 (2006).

21. Moulin, V. Growth factors in skin wound healing. *European journal of cell biology* **68**, 1–7 (1995).
22. Mateo, R. B., Reichner, J. S. & Albina, J. E. Interleukin-6 activity in wounds. *The American journal of physiology* **266**, R1840–4; 10.1152/ajpregu.1994.266.6.R1840 (1994).
23. Kishimoto, T. The biology of interleukin-6. *Blood* **74**, 1–10 (1989).
24. Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J. & Werb, Z. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science (New York, N.Y.)* **241**, 708–712; 10.1126/science.3041594 (1988).
25. Schultz, G., Rotatori, D. S. & Clark, W. EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. *Journal of cellular biochemistry* **45**, 346–352; 10.1002/jcb.240450407 (1991).
26. COHEN, S. & ELLIOTT, G. A. The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *The Journal of investigative dermatology* **40**, 1–5; 10.1038/jid.1963.1. (1963).
27. Carpenter, G. & COHEN, S. Epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry* **265**, 7709–7712 (1990).
28. Krawczyk, W. S. A pattern of epidermal cell migration during wound healing. *The Journal of cell biology* **49**, 247–263; 10.1083/jcb.49.2.247 (1971).
29. Radice, G. P. The spreading of epithelial cells during wound closure in *Xenopus* larvae. *Developmental Biology* **76**, 26–46; 10.1016/0012-1606(80)90360-7 (1980).
30. Usui, M. L. *et al.* Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **13**, 468–479; 10.1111/j.1067-1927.2005.00067.x (2005).
31. Safferling, K. *et al.* Wound healing revised: a novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models. *The Journal of cell biology* **203**, 691–709; 10.1083/jcb.201212020 (2013).
32. Lisovsky, A., Chamberlain, M. D., Wells, L. A. & Sefton, M. V. Cell Interactions with Vascular Regenerative MAA-Based Materials in the Context of Wound Healing. *Advanced healthcare materials* **4**, 2375–2387; 10.1002/adhm.201500192 (2015).
33. *Atlas of Wound Healing* (Elsevier, 2019).
34. Watt, S. M. & Pleat, J. M. Stem cells, niches and scaffolds: Applications to burns and wound care. *Advanced drug delivery reviews*, 82–106; 10.1016/j.addr.2017.10.012 (2018).
35. Kordestani, S. S. Burn Wounds. In *Atlas of Wound Healing* (Elsevier2019), pp. 101–114.
36. Ong, Y. S., Samuel, M. & Song, C. Meta-analysis of early excision of burns. *Burns* **32**, 145–150; 10.1016/j.burns.2005.09.005 (2006).
37. Wilgus, T. A., Ferreira, A. M., Oberyszyn, T. M., Bergdall, V. K. & Dipietro, L. A. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 579–590; 10.1038/labinvest.2008.36 (2008).
38. Wolfram, D., Tzankov, A., Pülzl, P. & Piza-Katzer, H. Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]* **35**, 171–181; 10.1111/j.1524-4725.2008.34406.x (2009).
39. Oryan, A., Alemzadeh, E. & Moshiri, A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. *Journal of wound care* **26**, 5–19; 10.12968/jowc.2017.26.1.5 (2017).
40. Schaefer TJ, S. K. Burn Evaluation And Management. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430741/>.
41. Sarrazy, V., Billet, F., Micallef, L., Coulomb, B. & Desmoulière, A. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **19 Suppl 1**, s10–5; 10.1111/j.1524-475X.2011.00708.x (2011).

42. Evers, L. H., Bhavsar, D. & Mailänder, P. The biology of burn injury. *Experimental dermatology*, 777–783; 10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x (2010).
43. Dunn, J. L. M. *et al.* Mammalian target of rapamycin regulates a hyperresponsive state in pulmonary neutrophils late after burn injury. *Journal of leukocyte biology*, 909–918; 10.1002/JLB.3AB0616-251RRR (2018).
44. Hampson, P. *et al.* Neutrophil Dysfunction, Immature Granulocytes, and Cell-free DNA are Early Biomarkers of Sepsis in Burn-injured Patients: A Prospective Observational Cohort Study. *Annals of surgery* **265**, 1241–1249; 10.1097/SLA.0000000000001807 (2017).
45. Kaufman, T. *et al.* Nucleosomes and neutrophil extracellular traps in septic and burn patients. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 254–262; 10.1016/j.clim.2017.08.014 (2017).
46. ter Horst, B., Chouhan, G., Moiemmen, N. S. & Grover, L. M. Advances in keratinocyte delivery in burn wound care. *Advanced drug delivery reviews* **123**, 18–32; 10.1016/j.addr.2017.06.012 (2018).
47. Abdel-Sayed, P. *et al.* Cell therapies for skin regeneration: an overview of 40 years of experience in burn units. *Swiss medical weekly* **149**, w20079; 10.4414/smw.2019.20079 (2019).
48. World Health Organization. Burns. Available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns> (2018).
49. Our World in Data. Death rate from fires and burns, 2017. Available at <https://ourworldindata.org/grapher/fire-death-rates>.
50. Stylianou, N., Buchan, I. & Dunn, K. W. A review of the international Burn Injury Database (iBID) for England and Wales: descriptive analysis of burn injuries 2003–2011. *BMJ open*, e006184; 10.1136/bmjopen-2014-006184 (2015).
51. Spanholtz, T. A., Theodorou, P., Amini, P. & Spilker, G. Severe burn injuries: acute and long-term treatment. *Deutsches Arzteblatt international* **106**, 607–613; 10.3238/arztebl.2009.0607 (2009).
52. Statistisches Bundesamt. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik. Available at <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Publikationen/Downloads-Krankenhaeuser/fallpauschalen-krankenhaus-2120640167004.html> (2016).
53. Ahn, C. S. & Maitz, P. K. M. The true cost of burn. *Burns*, 967–974; 10.1016/j.burns.2012.05.016 (2012).
54. Baxter, C. R. & Shires, T. Physiological response to crystalloid resuscitation of severe burns. *Annals of the New York Academy of Sciences* **150**, 874–894; 10.1111/j.1749-6632.1968.tb14738.x (1968).
55. Kwon, S. H. *et al.* Current and Emerging Topical Scar Mitigation Therapies for Craniofacial Burn Wound Healing. *Frontiers in physiology* **11**, 916; 10.3389/fphys.2020.00916 (2020).
56. Hettiaratchy, S. & Dziewulski, P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ (Clinical research ed.)* **328**, 1427–1429; 10.1136/bmj.328.7453.1427 (2004).
57. Muller, M. J. & Herndon, D. N. The challenge of burns. *The Lancet* **343**, 216–220; 10.1016/s0140-6736(94)90995-4 (1994).
58. Klein, M. B. *et al.* The Versajet water dissector: a new tool for tangential excision. *The Journal of burn care & rehabilitation* **26**, 483–487; 10.1097/01.bcr.0000185398.13095.c5 (2005).
59. Loo, Y. L., Goh, B. K. L. & Jeffery, S. An Overview of the Use of Bromelain-Based Enzymatic Debridement (Nexobrid®) in Deep Partial and Full Thickness Burns: Appraising the Evidence. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* **39**, 932–938; 10.1093/jbcr/iry009 (2018).
60. Carter, J. E. & Holmes, J. H. The Surgical Management of Burn Wounds. In *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Elsevier2016), Vol. 29, pp. 289–298.
61. Klama-Baryła, A. *et al.* Autologous and Allogeneic Skin Cell Grafts in the Treatment of Severely Burned Patients: Retrospective Clinical Study. *Transplantation proceedings* **50**, 2179–2187; 10.1016/j.transproceed.2017.11.079 (2018).

62. Shevchenko, R. V., James, S. L. & James, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of the Royal Society, Interface*, 229–258; 10.1098/rsif.2009.0403 (2010).
63. Beumer, G. J., van Blitterswijk, C. A., Bakker, D. & Ponc, M. A new biodegradable matrix as part of a cell seeded skin substitute for the treatment of deep skin defects: A physico-chemical characterisation. *Clinical Materials* **14**, 21–27; 10.1016/0267-6605(93)90043-7 (1993).
64. Uccioli, L. A clinical investigation on the characteristics and outcomes of treating chronic lower extremity wounds using the tissuetech autograft system. *The international journal of lower extremity wounds* **2**, 140–151; 10.1177/1534734603258480 (2003).
65. Dieckmann, C., Renner, R., Milkova, L. & Simon, J. C. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Experimental dermatology* **19**, 697–706; 10.1111/j.1600-0625.2010.01087.x (2010).
66. Esteban-Vives, R. *et al.* Second-degree burns with six etiologies treated with autologous noncultured cell-spray grafting. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries* **42**, e99–e106; 10.1016/j.burns.2016.02.020 (2016).
67. Karr, J. C. Retrospective comparison of diabetic foot ulcer and venous stasis ulcer healing outcome between a dermal repair scaffold (PriMatrix) and a bilayered living cell therapy (Apligraf). *Advances in skin & wound care* **24**, 119–125; 10.1097/01.ASW.0000395038.28398.88. (2011).
68. Noordenbos, J., Doré, C. & Hansbrough, J. F. Safety and efficacy of TransCyte for the treatment of partial-thickness burns. *The Journal of burn care & rehabilitation* **20**, 275–281; 10.1097/00004630-199907000-00002 (1999).
69. Purdue, G. F. *et al.* A multicenter clinical trial of a biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds. *The Journal of burn care & rehabilitation* **18**, 52–57; 10.1097/00004630-199701000-00009 (1997).
70. Still, J., Glat, P., Silverstein, P., Griswold, J. & Mazingo, D. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. *Burns* **29**, 837–841; 10.1016/s0305-4179(03)00164-5 (2003).
71. Taghiabadi, E., Beiki, B., Aghdami, N. & Bajouri, A. Amniotic Membrane Seeded Fetal Fibroblasts as Skin Substitute for Wound Regeneration. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1879**, 211–219; 10.1007/7651_2018_135 (2019).
72. Wang, J. H.-C., Thampatty, B. P., Lin, J.-S. & Im, H.-J. Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts. *Gene* **391**, 1–15; 10.1016/j.gene.2007.01.014 (2007).
73. Binder, K. W. *et al.* In situ bioprinting of the skin for burns. *Journal of the American College of Surgeons* **211**, S76; 10.1016/j.jamcollsurg.2010.06.198 (2010).
74. Skardal, A. *et al.* Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem cells translational medicine*, 792–802; 10.5966/sctm.2012-0088 (2012).
75. Esteban-Vives, R. *et al.* Cell-spray auto-grafting technology for deep partial-thickness burns: Problems and solutions during clinical implementation. *Burns*, 549–559; 10.1016/j.burns.2017.10.008 (2018).
76. Foubert, P. *et al.* Adipose-Derived Regenerative Cell Therapy for Burn Wound Healing: A Comparison of Two Delivery Methods. *Advances in wound care* **5**, 288–298; 10.1089/wound.2015.0672 (2016).
77. Lee, J. H., Bae, I.-H., Choi, J. K. & Park, J. W. Evaluation of a highly skin permeable low-molecular-weight protamine conjugated epidermal growth factor for novel burn wound healing therapy. *Journal of pharmaceutical sciences* **102**, 4109–4120; 10.1002/jps.23725 (2013).
78. Galiano, R. D. *et al.* Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells. *The American Journal of Pathology* **164**, 1935–1947; 10.1016/S0002-9440(10)63754-6 (2004).
79. Clark, R. A. F., Ghosh, K. & Tonnesen, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 1018–1029; 10.1038/sj.jid.5700715 (2007).
80. Fuller, B. J. *et al.* Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. *Cryo letters* **34**, 432–452 (2013).

81. Correia, C. *et al.* Effective Hypothermic Storage of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Compatible With Global Distribution of Cells for Clinical Applications and Toxicology Testing. *Stem cells translational medicine* **5**, 658–669; 10.5966/sctm.2015-0238 (2016).
82. Petrenko, Y. *et al.* Clinically Relevant Solution for the Hypothermic Storage and Transportation of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Stem cells international* **2019**, 5909524; 10.1155/2019/5909524 (2019).
83. Minasian, S. M., Galagudza, M. M., Dmitriev, Y. V., Karpov, A. A. & Vlasov, T. D. Preservation of the donor heart: from basic science to clinical studies. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* **20**, 510–519; 10.1093/icvts/ivv432 (2015).
84. Jang, T. H. *et al.* Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative medicine research* **6**, 12–18; 10.1016/j.imr.2016.12.001 (2017).
85. Whaley, D. *et al.* Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell transplantation* **30**, 963689721999617; 10.1177/0963689721999617 (2021).
86. POLGE, C., SMITH, A. U. & PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* **164**, 666; 10.1038/164666a0 (1949).
87. SMITH, A. PREVENTION OF HEMOLYSIS DURING FREEZING AND THAWING OF RED BLOOD-CELLS. *The Lancet* **256**, 910–911; 10.1016/s0140-6736(50)91861-7 (1950).
88. MAZUR, P., Leibo, S. P. & Chu, E.H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Experimental Cell Research* **71**, 345–355; 10.1016/0014-4827(72)90303-5 (1972).
89. MAZUR, P. CAUSES OF INJURY IN FROZEN AND THAWED CELLS. *Federation proceedings* **24**, S175-82 (1965).
90. Baust, J. G., Gao, D. & Baust, J. M. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis* **5**, 90–96; 10.4161/org.5.3.10021 (2009).
91. Talwar, P. & Prakash, V. Clinical Applications of Vitrification. In *Vitrification in Assisted Reproduction*, edited by G. Allahbadia, M. Kuwayama & G. Gandhi (Springer India, New Delhi, 2015), pp. 51–63.
92. Fahy, G. M. *et al.* Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology* **48**, 157–178; 10.1016/j.cryobiol.2004.02.002. (2004).
93. MacFarlane, D. R. *Advances in low-temperature biology* (JAI Press, London, Greenwich Conn., 1992).
94. MacFarlane, D. R. Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. *Cryobiology* **24**, 181–195; 10.1016/0011-2240(87)90022-8 (1987).
95. Tavukcuoglu, S., Al-Azawi, T., Khaki, A. A. & Al-Hasani, S. Is vitrification standard method of cryopreservation. *Middle East Fertility Society Journal* **17**, 152–156; 10.1016/j.mefs.2012.07.007 (2012).
96. Arav, A. & Natan, Y. The Near Future of Vitrification of Oocytes and Embryos: Looking into Past Experience and Planning into the Future. *Transfusion medicine and hemotherapy : offzielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* **46**, 182–187; 10.1159/000497749 (2019).
97. Kapoore, R. V. *et al.* Effects of cryopreservation on viability and functional stability of an industrially relevant alga. *Scientific reports* **9**, 2093; 10.1038/s41598-019-38588-6 (2019).
98. Bode, A. P. & Fischer, T. H. Lyophilized platelets: fifty years in the making. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology* **35**, 125–133; 10.1080/10731190600974962 (2007).
99. Arndt, T. Lyophilisation. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, edited by A. M. Gressner & T. Arndt (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2019), p. 1549.
100. Buitink, Claessens, Hemminga & Hoekstra. Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollen. *Plant physiology* **118**, 531–541; 10.1104/pp.118.2.531 (1998).
101. Manohar, P. & Ramesh, N. Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. *Scientific reports* **9**, 15242; 10.1038/s41598-019-51742-4 (2019).

102. Balczun, C. & Scheid, P. L. Lyophilisation as a simple and safe method for long-term storage of free-living amoebae at ambient temperature. *Parasitology research* **117**, 3333–3336; 10.1007/s00436-018-6029-x (2018).
103. Zhang, M. *et al.* Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: preservation of DNA integrity. *Scientific reports* **7**, 6198; 10.1038/s41598-017-06542-z (2017).
104. Puhlev, I., Guo, N., Brown, D. R. & Levine, F. Desiccation tolerance in human cells. *Cryobiology* **42**, 207–217; 10.1006/cryo.2001.2324 (2001).
105. *Lyophilization of Pharmaceuticals and Biologicals. New Technologies and Approaches*. 1st ed. (Springer New York, New York, NY, 2019).
106. Shuja, F. *et al.* Development and testing of freeze-dried plasma for the treatment of trauma-associated coagulopathy. *The Journal of trauma* **65**, 975–985; 10.1097/TA.0b013e3181801cd9 (2008).
107. Shendy, M. B., Taha, A. E., El Sayed, E. L., Albehwar, A. M. & Abou El Naga, H. I. Lyophilization as an alternative method for preservation of some continuous cell cultures. *GSC Biol. and Pharm. Sci.* **5**, 1–8; 10.30574/gscbps.2018.5.1.0079 (2018).
108. Bissoyi, A. *et al.* Recent Advances and Future Direction in Lyophilisation and Desiccation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells international* **2016**, 3604203; 10.1155/2016/3604203 (2016).
109. Hunt, C. J. Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1590**, 41–77; 10.1007/978-1-4939-6921-0_5 (2017).
110. MAZUR, P. KINETICS OF WATER LOSS FROM CELLS AT SUBZERO TEMPERATURES AND THE LIKELIHOOD OF INTRACELLULAR FREEZING. *The Journal of general physiology* **47**, 347–369; 10.1085/jgp.47.2.347 (1963).
111. Dumont, F., Marechal, P.-A. & Gervais, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Applied and environmental microbiology* **70**, 268–272; 10.1128/AEM.70.1.268-272.2004 (2004).
112. Lovelock, J. E. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et biophysica acta* **10**, 414–426; 10.1016/0006-3002(53)90273-x (1953).
113. Meryman, H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology* **8**, 489–500; 10.1016/0011-2240(71)90040-X (1971).
114. Lovelock, J. E. Het mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochimica et biophysica acta* **11**, 28–36; 10.1016/0006-3002(53)90005-5 (1953).
115. Pegg, D. E. Principles of cryopreservation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1257**, 3–19; 10.1007/978-1-4939-2193-5_1 (2015).
116. Mazur, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* **14**, 251–272; 10.1016/0011-2240(77)90175-4 (1977).
117. MAZUR, P. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **125**, 658–676; 10.1111/j.1749-6632.1965.tb45420.x (1965).
118. Steponkus, P. L., Dowgert, M. F. & Gordon-Kamm, W. J. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: The influence of cold acclimation. *Cryobiology* **20**, 448–465; 10.1016/0011-2240(83)90035-4 (1983).
119. Muldrew, K. & McGann, L. E. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophysical Journal* **57**, 525–532; 10.1016/S0006-3495(90)82568-6 (1990).
120. Toner, M., Cravalho, E. G. & Karel, M. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. *Cryobiology* **67**, 1582–1593; 10.1063/1.345670 (1990).
121. Gao, D. & Critser, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR journal* **41**, 187–196; 10.1093/ilar.41.4.187 (2000).
122. Fuller, B. J., Benson, E. E. & Lane, N. *Life in the frozen state* (CRC Press, Boca Raton, Fla, 2004).

123. Proksch, E., Jensen, J.-M., Crichton-Smith, A., Fowler, A. & Clitherow, J. Rationale Behandlung von Patienten mit Verbrennungen 1. Grades [Rational treatment of first-degree burns]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **58**, 604–610; 10.1007/s00105-007-1364-3 (2007).
124. Rowan, M. P. *et al.* Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical care (London, England)* **19**, 243; 10.1186/s13054-015-0961-2 (2015).
125. Dunn, L. *et al.* Murine model of wound healing. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e50265; 10.3791/50265 (2013).
126. Rittié, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal of cell communication and signaling*, 103–120; 10.1007/s12079-016-0330-1 (2016).
127. McDonald, T. A., Zepeda, M. L., Tomlinson, M. J., Bee, W. H. & Ivens, I. A. Subcutaneous administration of biotherapeutics: current experience in animal models. *Current opinion in molecular therapeutics* **12**, 461–470 (2010).
128. Abdullahi, A., Amini-Nik, S. & Jeschke, M. G. Animal models in burn research. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 3241–3255; 10.1007/s00018-014-1612-5. (2014).
129. Avci, P. *et al.* Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 331–355; 10.1517/17460441.2013.761202 (2013).
130. Dorsett-Martin, W. A. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **12**, 591–599; 10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x. (2004).
131. Sullivan, T. P., Eaglstein, W. H., Davis, S. C. & Mertz, P. The pig as a model for human wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **9**, 66–76; 10.1046/j.1524-475x.2001.00066.x (2001).
132. Khiao In, M. *et al.* Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *Anatomia, histologia, embryologia* **48**, 207–217; 10.1111/ahe.12425 (2019).
133. Wilhelm, K.-P., Wilhelm, D. & Bielfeldt, S. Models of wound healing: an emphasis on clinical studies. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 3–12; 10.1111/srt.12317 (2017).
134. Gordillo, G. M. *et al.* Preclinical Models of Wound Healing: Is Man the Model? Proceedings of the Wound Healing Society Symposium. *Advances in wound care* **2**, 1–4; 10.1089/wound.2012.0367 (2013).
135. The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia* **1**, 500; 10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x (1960).
136. Kurosawa TM. Japanese Regulation of Laboratory Animal Care with 3Rs. Special Issue: Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation (AATEX)* **2007**, 317–321 (2007).
137. Törnqvist, E. *et al.* Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PloS one* **9**, e101638; 10.1371/journal.pone.0101638 (2014).
138. *European Union (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. OJEU L 276/33 (2010).*
139. DIRECTIVE 2003/15/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. DIRECTIVE 2003/15/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. In *Official Journal of the European Union, L 66 March 2003, Vol. L 66/26 Volume 46.*
140. Kurosawa TM. Japanese Regulation of Laboratory Animal Care with 3Rs. Special Issue: Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation (AATEX)* **2007**, 317–321 (2007).

141. European Union (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *OJEU L 276/33* (2010).
142. Törnqvist, E. *et al.* Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS one* **9**, e101638; 10.1371/journal.pone.0101638 (2014).
143. Hettler, A., Werner, S., Eick, S., Laufer, S. & Weise, F. A new in vitro model to study cellular responses after thermomechanical damage in monolayer cultures. *PLoS one*, e82635; 10.1371/journal.pone.0082635. (2013).
144. Fernandes, A. C. M. *et al.* Development of experimental in vitro burn model. *Acta cirurgica brasileira* **29 Suppl 2**, 15–20; 10.1590/s0102-86502014001400004. (2014).
145. Coolen, N. A., Vlig, M., van den Bogaerd, A. J., Middelkoop, E. & Ulrich, M. M. W. Development of an in vitro burn wound model. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **16**, 559–567; 10.1111/j.1524-475X.2008.00403.x. (2008).
146. Emanuelsson, P. & Kratz, G. Characterization of a new in vitro burn wound model. *Burns* **23**, 32–36; 10.1016/s0305-4179(96)00073-3 (1997).
147. Marques, A. P. (ed.). *Skin tissue models* (Academic Press, London, England, 2018).
148. Mesquita, R. L. *et al.* Effect of low-intensity therapeutic ultrasound on wound healing in rats subjected to third-degree burns. *Acta cirurgica brasileira* **31**, 36–43; 10.1590/S0102-86502016001000006 (2016).
149. Payne, W. G. *et al.* Effect of amnion-derived cellular cytokine solution on healing of experimental partial-thickness burns. *World journal of surgery* **34**, 1663–1668; 10.1007/s00268-010-0420-9. (2010).
150. El-Kased, R. F., Amer, R. I., Attia, D. & Elmazar, M. M. Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. *Scientific reports*, 9692; 10.1038/s41598-017-08771-8. (2017).
151. Brandenburg, K. S. *et al.* Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Full-thickness Scald Burn Wounds in Rats. *Scientific reports*, 13627; 10.1038/s41598-019-50003-8. (2019).
152. Calum, H., Høiby, N. & Moser, C. Mouse Model of Burn Wound and Infection: Thermal (Hot Air) Lesion-Induced Immunosuppression. *Current protocols in mouse biology*, 77–87; 10.1002/cpmo.25. (2017).
153. Groeber, F. *et al.* Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **36**, 254–261; 10.1016/j.tiv.2016.07.008 (2016).
154. Groeber, F. *et al.* Impedance spectroscopy for the non-destructive evaluation of in vitro epidermal models. *Pharmaceutical research* **32**, 1845–1854; 10.1007/s11095-014-1580-3 (2015).
155. Schmitz, T. *et al.* Nanostructured TiN-Coated Electrodes for High-Sensitivity Noninvasive Characterization of in Vitro Tissue Models. *ACS Appl. Nano Mater.* **1**, 2284–2293; 10.1021/acsnm.8b00345 (2018).
156. Schneider, V. *et al.* A 3D In Vitro Model for Burn Wounds: Monitoring of Regeneration on the Epidermal Level. *Biomedicines* **9**; 10.3390/biomedicines9091153 (2021).
157. McGrath, J. A., Eady, R. A. J. & Pope, F. M. Anatomy and Organization of Human Skin. In *Rook's Textbook of Dermatology*, edited by T. Burns, S. Breathnach, N. Cox & C. Griffiths (Blackwell Publishing, Inc, Malden, Massachusetts, USA, 2004), pp. 45–128.
158. Kasper, J. C. & Friess, W. The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **78**, 248–263; 10.1016/j.ejpb.2011.03.010 (2011).
159. Rockinger, U., Müller, C., Bracher, F., Funk, M. & Winter, G. DMSO as new, counterintuitive excipient for freeze-drying human keratinocytes. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **160**, 105746; 10.1016/j.ejps.2021.105746 (2021).

160. Ebner, F., Heller, A., Rippeke, F. & Tausch, I. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *American journal of clinical dermatology* **3**, 427–433; 10.2165/00128071-200203060-00005 (2002).
161. Schiraldi, M. *et al.* HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *The Journal of experimental medicine* **209**, 551–563; 10.1084/jem.20111739 (2012).
162. Phipers, B. & Pierce, J. T. Lactate physiology in health and disease. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* **6**, 128–132; 10.1093/bjaceaccp/mkl018 (2006).
163. Rashedul, I. M. *et al.* Influence of Different Tool Electrode Materials on Electrochemical Discharge Machining Performances. *Micromachines* **12**; 10.3390/mi2091077 (2021).
164. Hartmann-Fritsch, F., Marino, D. & Reichmann, E. About ATMPs, SOPs and GMP: The Hurdles to Produce Novel Skin Grafts for Clinical Use. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* **43**, 344–352; 10.1159/000447645 (2016).
165. Stokes, M. A. R. & Johnson, W. D. Burns in the Third World: an unmet need. *Annals of burns and fire disasters* **30**, 243–246 (2017).
166. Domaszewska-Szostek, A. P., Krzyżanowska, M. O., Czarnecka, A. M. & Siemionow, M. Local Treatment of Burns with Cell-Based Therapies Tested in Clinical Studies. *Journal of clinical medicine* **10**; 10.3390/jcm10030396 (2021).
167. Lootens, L., Brusselaers, N., Beele, H. & Monstrey, S. Keratinocytes in the treatment of severe burn injury: an update. *International wound journal* **10**, 6–12; 10.1111/j.1742-481X.2012.01083.x (2013).
168. *Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on Advanced Therapy Medicinal Products and Amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004.* (2007).
169. *Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use.* (2003).
170. Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products. In *EudraLex The Rules Governing Medicinal Products in the European Union*, Vol. 2017.
171. Rheinwatd, J. G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation keratinizin colonies from single cell is. *Cell* **6**, 331–343; 10.1016/S0092-8674(75)80001-8 (1975).
172. Green, H., Kehinde, O. & Thomas, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 5665–5668; 10.1073/pnas.76.11.5665 (1979).
173. Hefton, J., Finkelstein, J., Madden, M. & Thomas Shires, G. GRAFTING OF BURN PATIENTS WITH ALLOGRAFTS OF CULTURED EPIDERMAL CELLS. *The Lancet* **322**, 428–430; 10.1016/S0140-6736(83)90392-6 (1983).
174. Coolen, N. A. *et al.* Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells. *Cell transplantation* **16**, 649–661 (2007).
175. Corte, P. de *et al.* Feeder layer- and animal product-free culture of neonatal foreskin keratinocytes: improved performance, usability, quality and safety. *Cell and tissue banking* **13**, 175–189; 10.1007/s10561-011-9247-3 (2012).
176. Lamb, R. & Ambler, C. A. Keratinocytes propagated in serum-free, feeder-free culture conditions fail to form stratified epidermis in a reconstituted skin model. *PloS one* **8**, e52494; 10.1371/journal.pone.0052494 (2013).
177. Borowiec, A.-S., Delcourt, P., Dewailly, E. & Bidaux, G. Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control. *PloS one* **8**, e77507; 10.1371/journal.pone.0077507 (2013).

178. Gilchrest, B. A., Calhoun, J. K. & Maciag, T. Attachment and growth of human keratinocytes in a serum-free environment. *Journal of cellular physiology* **112**, 197–206; 10.1002/jcp.1041120207 (1982).
179. Groeber, F. *et al.* Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **36**, 254–261; 10.1016/j.tiv.2016.07.008 (2016).
180. *Principles of Tissue Engineering* (Elsevier, 2020).
181. Kwist, K., Bridges, W. C. & Burg, K. J. L. The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology* **68**, 1661–1667; 10.1007/s10616-015-9883-8 (2016).
182. Beachy SH, Wizemann T, Hackmann M, editors. Exploring Sources of Variability Related to the Clinical Translation of Regenerative Engineering Products: Proceedings of a Workshop. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544028/> (2019 Mar 21).
183. Sanz-Gómez, N., Freije, A. & Gandarillas, A. Keratinocyte Differentiation by Flow Cytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2109**, 83–92; 10.1007/7651_2019_237 (2020).
184. Poumay, Y. & Pittelkow, M. R. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *The Journal of investigative dermatology* **104**, 271–276; 10.1111/1523-1747.ep12612810 (1995).
185. HUANG, Y.-C., WANG, T.-W., SUN, J.-S. & LIN, F.-H. EFFECT OF CALCIUM ION CONCENTRATION ON KERATINOCYTE BEHAVIORS IN THE DEFINED MEDIA. *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.* **18**, 37–41; 10.4015/S1016237206000087 (2006).
186. Bikle, D. D., Xie, Z. & Tu, C.-L. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert review of endocrinology & metabolism* **7**, 461–472; 10.1586/eem.12.34 (2012).
187. Henrot, P. *et al.* A Method for Isolating and Culturing Skin Cells: Application to Endothelial Cells, Fibroblasts, Keratinocytes, and Melanocytes From Punch Biopsies in Systemic Sclerosis Skin. *Frontiers in immunology* **11**, 566607; 10.3389/fimmu.2020.566607 (2020).
188. Chang, H. Y. *et al.* Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12877–12882; 10.1073/pnas.162488599 (2002).
189. Chen, Y., Mistry, D. S. & Sen, G. L. Highly rapid and efficient conversion of human fibroblasts to keratinocyte-like cells. *The Journal of investigative dermatology* **134**, 335–344; 10.1038/jid.2013.327 (2014).
190. Katagata, Y., Takeda, H., Ishizawa, T., Hozumi, Y. & Kondo, S. Occurrence and comparison of the expressed keratins in cultured human fibroblasts, endothelial cells and their sarcomas. *Journal of dermatological science* **30**, 1–9; 10.1016/s0923-1811(02)00039-7 (2002).
191. Gstraunthaler, G., Lindl, T. & van der Valk, J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology* **65**, 791–793; 10.1007/s10616-013-9633-8 (2013).
192. Faber, S. C. & McCullough, S. D. Through the Looking Glass: In Vitro Models for Inhalation Toxicology and Interindividual Variability in the Airway. *Applied in vitro toxicology* **4**, 115–128; 10.1089/aivt.2018.0002 (2018).
193. The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia* **1**, 500; 10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x (1960).
194. Butreddy, A., Dudhipala, N., Janga, K. Y. & Gaddam, R. P. Lyophilization of Small-Molecule Injectables: an Industry Perspective on Formulation Development, Process Optimization, Scale-Up Challenges, and Drug Product Quality Attributes. *AAPS PharmSciTech* **21**, 252; 10.1208/s12249-020-01787-w (2020).
195. Hamaly, M. A., Abulateefeh, S. R., Al-Qaoud, K. M. & Alkilany, A. M. Freeze-drying of monoclonal antibody-conjugated gold nanorods: Colloidal stability and biological activity. *International journal of pharmaceuticals* **550**, 269–277; 10.1016/j.ijpharm.2018.08.045 (2018).
196. Bond, C. Freeze-drying of yeast cultures. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **368**, 99–107; 10.1007/978-1-59745-362-2_6 (2007).

197. Keskin-tepe, L. & Eroglu, A. Freeze-drying of mammalian sperm. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1257**, 489–497; 10.1007/978-1-4939-2193-5_25 (2015).
198. Palazzese, L. *et al.* Whole genome integrity and enhanced developmental potential in ram freeze-dried spermatozoa at mild sub-zero temperature. *Scientific reports* **10**, 18873; 10.1038/s41598-020-76061-x (2020).
199. Patrizio, P., Loi, L. & Arav, A. Lyophilization and rehydration of bovine oocytes after vitrification: a new technological breakthrough. *Fertility and Sterility* **98**, S125–S126; 10.1016/j.fertnstert.2012.07.463 (2012).
200. Amstislavsky, S. Y., Brusentsev, E. Y., Okotrub, K. A. & Rozhkova, I. N. Embryo and gamete cryopreservation for genetic resources conservation of laboratory animals. *Russ J Dev Biol* **46**, 47–59; 10.1134/S1062360415020022 (2015).
201. Clinton, J. & McWilliams-Koepfen, P. Initiation, Expansion, and Cryopreservation of Human Primary Tissue-Derived Normal and Diseased Organoids in Embedded Three-Dimensional Culture. *Current protocols in cell biology* **82**, e66; 10.1002/cpcb.66 (2019).
202. Di Liu & Pan, F. Advances in cryopreservation of organs. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban* **36**, 153–161; 10.1007/s11596-016-1559-x (2016).
203. Stoll, C., Holovati, J. L., Acker, J. P. & Wolkers, W. F. Synergistic effects of liposomes, trehalose, and hydroxyethyl starch for cryopreservation of human erythrocytes. *Biotechnology progress* **28**, 364–371; 10.1002/btpr.1519 (2012).
204. Thomas, M. J.G., Parry, E. S., Nash, S. G. & Bell, S. H. A method for the cryopreservation of red blood cells using hydroxyethyl starch as a cryoprotectant. *Transfusion Science* **17**, 385–396; 10.1016/0955-3886(96)00009-4 (1996).
205. Awan, M. *et al.* Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative medicine* **15**, 1463–1491; 10.2217/rme-2019-0145 (2020).
206. Liu, W. *et al.* Impacts of trehalose and L-proline on the thermodynamic nonequilibrium phase change and thermal properties of normal saline. *Cryobiology* **96**, 92–98; 10.1016/j.cryobiol.2020.07.011 (2020).
207. Buchanan, S. S. *et al.* Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. *Stem cells and development* **13**, 295–305; 10.1089/154732804323099226 (2004).
208. Ntai, A., La Spada, A., Blasio, P. de & Biunno, I. Trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells. *Stem cell research* **31**, 102–112; 10.1016/j.scr.2018.07.021 (2018).
209. Naaldijk, Y., Johnson, A. A., Friedrich-Stöckigt, A. & Stolzing, A. Cryopreservation of dermal fibroblasts and keratinocytes in hydroxyethyl starch-based cryoprotectants. *BMC biotechnology* **16**, 85; 10.1186/s12896-016-0315-4 (2016).
210. Oldenhof, H. *et al.* Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. *Biology of reproduction* **88**, 68; 10.1095/biolreprod.112.104661 (2013).
211. Stolzing, A., Naaldijk, Y., Fedorova, V. & Sethe, S. Hydroxyethylstarch in cryopreservation - mechanisms, benefits and problems. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* **46**, 137–147; 10.1016/j.transci.2012.01.007 (2012).
212. Takahashi, T., Hirsh, A., Erbe, E. & Williams, R. J. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes. *Biophysical Journal* **54**, 509–518; 10.1016/S0006-3495(88)82983-7 (1988).
213. Stewart, S. & He, X. Intracellular Delivery of Trehalose for Cell Banking. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **35**, 7414–7422; 10.1021/acs.langmuir.8b02015 (2019).
214. Eroglu, A., Toner, M. & Toth, T. L. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertility and Sterility* **77**, 152–158; 10.1016/s0015-0282(01)02959-4 (2002).

-
215. Eroglu, A. *et al.* Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature biotechnology* **18**, 163–167; 10.1038/72608 (2000).
216. Zhang, M., Oldenhof, H., Sieme, H. & Wolkers, W. F. Freezing-induced uptake of trehalose into mammalian cells facilitates cryopreservation. *Biochimica et biophysica acta* **1858**, 1400–1409; 10.1016/j.bbamem.2016.03.020 (2016).
217. Acker, J. P., Larese, A., Yang, H., Petrenko, A. & McGann, L. E. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. *Cryobiology* **38**, 363–371; 10.1006/cryo.1999.2179 (1999).
218. Acker, J. P. & McGann, L. E. Cell-cell contact affects membrane integrity after intracellular freezing. *Cryobiology* **40**, 54–63; 10.1006/cryo.1999.2221 (2000).
219. Acker, J. P., Elliott, J. A.W. & McGann, L. E. Intercellular Ice Propagation: Experimental Evidence for Ice Growth through Membrane Pores. *Biophysical Journal* **81**, 1389–1397; 10.1016/S0006-3495(01)75794-3 (2001).
220. Irimia, D. & Karlsson, J. O.M. Kinetics and Mechanism of Intercellular Ice Propagation in a Micropatterned Tissue Construct. *Biophysical Journal* **82**, 1858–1868; 10.1016/S0006-3495(02)75536-7 (2002).
221. Acker, J. P. & McGann, L. E. Innocuous intracellular ice improves survival of frozen cells. *Cell transplantation* **11**, 563–571 (2002).
222. Acker, J. P. & McGann, L. E. Protective effect of intracellular ice during freezing? *Cryobiology* **46**, 197–202; 10.1016/s0011-2240(03)00025-7 (2003).
223. Gurtovenko, A. A. & Anwar, J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *The journal of physical chemistry. B* **111**, 10453–10460; 10.1021/jp073113e (2007).
224. Crowe, J. H., Carpenter, J. F. & Crowe, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology* **60**, 73–103; 10.1146/annurev.physiol.60.1.73 (1998).
225. Parnell, L. K. S. & Volk, S. W. The Evolution of Animal Models in Wound Healing Research: 1993-2017. *Advances in wound care* **8**, 692–702; 10.1089/wound.2019.1098 (2019).
226. Masson-Meyers, D. S. *et al.* Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International journal of experimental pathology* **101**, 21–37; 10.1111/iep.12346 (2020).
227. Tiwari, V. K. Burn wound: How it differs from other wounds? *Indian journal of plastic surgery : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India* **45**, 364–373; 10.4103/0970-0358.101319 (2012).
228. Da Costa, P. E. Robbins' pathologic basis of disease. R. S. Cotran, V. Kumar and S. L. Robbins. W. B. Saunders, Philadelphia, 1989. No. of pages: 1519. Price £37. ISBN:0 7216 2302 6. *J. Pathol.* **160**, 89; 10.1002/path.1711600125 (1990).
229. JACKSON, D. M. The diagnosis of the depth of burning. *The British journal of surgery* **40**, 588–596; 10.1002/bjs.18004016413 (1953).
230. Gibson, A. L. F., Bennett, D. D. & Taylor, L. J. Improving the histologic characterization of burn depth. *Journal of cutaneous pathology* **44**, 998–1004; 10.1111/cup.12991 (2017).
231. Sangita, C., Garima, G., Jayanthi, Y., Arneet, A. & Neelkamal, K. Histological indicators of cutaneous lesions caused by electrocution, flame burn and impact abrasion. *Medicine, science, and the law* **58**, 216–221; 10.1177/0025802418776116 (2018).
232. Ando, M., Kawashima, T., Kobayashi, H. & Ohkawara, A. Immunohistological detection of proliferating cells in normal and psoriatic epidermis using Ki-67 monoclonal antibody. *Journal of dermatological science* **1**, 441–446; 10.1016/0923-1811(90)90014-5 (1990).
233. Petrovic, A. *et al.* Immunohistochemical distribution of Ki67 in epidermis of thick glabrous skin of human digits. *Archives of dermatological research* **310**, 85–93; 10.1007/s00403-017-1793-5 (2018).
234. Breetveld, M., Richters, C. D., Rustemeyer, T., Scheper, R. J. & Gibbs, S. Comparison of wound closure after burn and cold injury in human skin equivalents. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 1918–1921; 10.1038/sj.jid.5700330 (2006).

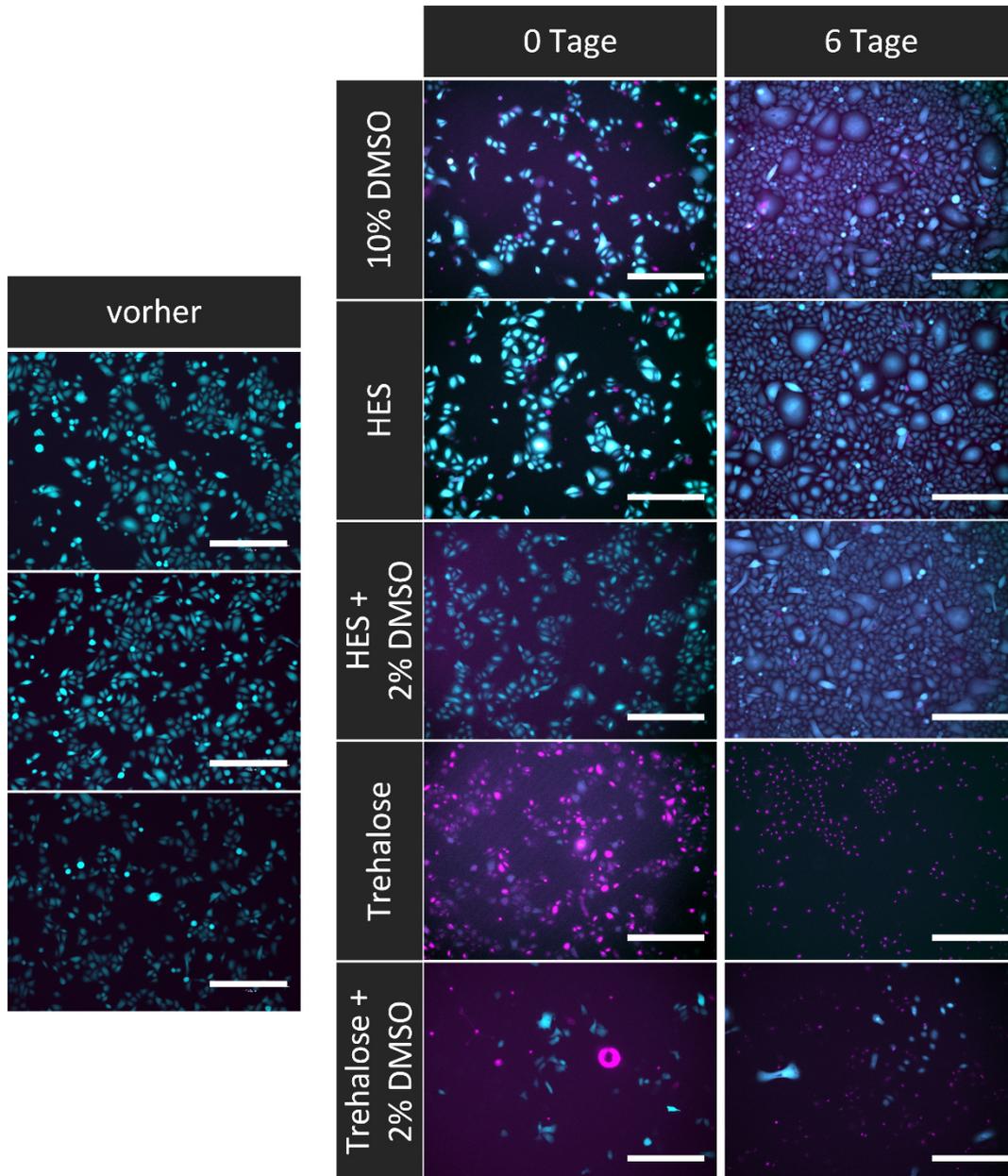
235. Kieseewetter, L., Littau, L., Walles, H., Boccaccini, A. R. & Groeber-Becker, F. Reepithelialization in focus: Non-invasive monitoring of epidermal wound healing in vitro. *Biosensors & bioelectronics* **142**, 111555; 10.1016/j.bios.2019.111555 (2019).
236. Phipers, B. & Pierce, J. T. Lactate physiology in health and disease. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* **6**, 128–132; 10.1093/bjaceaccp/mkl018 (2006).
237. Mokline, A. *et al.* Lactate: prognostic biomarker in severely burned patients. *Annals of burns and fire disasters* **30**, 35–38 (2017).
238. Gröne, A. Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **88**, 1–12; 10.1016/S0165-2427(02)00136-8 (2002).
239. Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A. & Gurtner, G. C. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological reviews* **99**, 665–706; 10.1152/physrev.00067.2017 (2019).
240. Werner, S., Krieg, T. & Smola, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 998–1008; 10.1038/sj.jid.5700786 (2007).
241. Jiang, W. G., Sanders, A. J., Ruge, F. & Harding, K. G. Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC- γ and potential clinical implications. *Experimental and therapeutic medicine* **3**, 231–236; 10.3892/etm.2011.402 (2012).
242. Kondo, S., Kono, T., Sauder, D. N. & McKenzie, R. C. IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. *The Journal of investigative dermatology* **101**, 690–694; 10.1111/1523-1747.ep12371677 (1993).
243. Nicolaus, C. *et al.* In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *Journal of ethnopharmacology* **196**, 94–103; 10.1016/j.jep.2016.12.006 (2017).
244. Kim, H. S., Kim, J.-H., Yim, H. & Kim, D. Changes in the levels of interleukins 6, 8, and 10, tumor necrosis factor alpha, and granulocyte-colony stimulating factor in Korean burn patients: relation to burn size and postburn time. *Annals of laboratory medicine* **32**, 339–344; 10.3343/alm.2012.32.5.339 (2012).
245. Yeh, F. L., Lin, W. L., Shen, H. D. & Fang, R. H. Changes in levels of serum IL-8 in burned patients. *Burns* **23**, 555–559; 10.1016/S0305-4179(97)00071-5 (1997).
246. Ozbalkan, Z., Aslar, A. K., Yildiz, Y. & Aksaray, S. Investigation of the course of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines after burn sepsis. *International journal of clinical practice* **58**, 125–129; 10.1111/j.1368-5031.2004.0106.x (2004).
247. Gragnani, A. *et al.* Gene expression profile of cytokines and receptors of inflammation from cultured keratinocytes of burned patients. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **40**, 947–956; 10.1016/j.burns.2013.11.022 (2014).
248. Yeh, F.L., Lin, W.L., Shen, H.D. & Fang, R.H. Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients. *Burns* **25**, 131–136; 10.1016/S0305-4179(98)00150-8 (1999).
249. Tian, J. *et al.* Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem* **2**, 129–136; 10.1002/cmdc.200600171 (2007).
250. Martin, D., Galisteo, R. & Gutkind, J. S. CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NF κ B through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *The Journal of biological chemistry* **284**, 6038–6042; 10.1074/jbc.C800207200 (2009).
251. Li, M. *et al.* Interleukin-8 increases vascular endothelial growth factor and neuropilin expression and stimulates ERK activation in human pancreatic cancer. *Cancer science* **99**, 733–737; 10.1111/j.1349-7006.2008.00740.x (2008).
252. Chang, K.-C. *et al.* The optimal time for early burn wound excision to reduce pro-inflammatory cytokine production in a murine burn injury model. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **36**, 1059–1066; 10.1016/j.burns.2010.02.004 (2010).
253. Hübner, G. *et al.* Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* **8**, 548–556; 10.1006/cyto.1996.0074 (1996).

254. Kubo, H. *et al.* Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Legal medicine (Tokyo, Japan)* **16**, 8–13; 10.1016/j.legalmed.2013.10.002 (2014).
255. Schinkel, C. *et al.* Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. *Shock (Augusta, Ga.)* **4**, 241–246; 10.1097/00024382-199510000-00002 (1995).
256. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **16**, 585–601; 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x (2008).
257. Werner, S. & Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* **83**, 835–870; 10.1152/physrev.2003.83.3.835 (2003).
258. Ilijas, J. D. *et al.* A human skin equivalent burn model to study the effect of a nanocrystalline silver dressing on wound healing. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*; 10.1016/j.burns.2020.07.007 (2020).
259. Wallace, R. G. *et al.* Development of dynamic cell and organotypic skin models, for the investigation of a novel visco-elastic burns treatment using molecular and cellular approaches. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*; 10.1016/j.burns.2020.04.036 (2020).
260. Gorski, J., Proksch, E., Baron, J. M., Schmid, D. & Zhang, L. Dexpanthenol in Wound Healing after Medical and Cosmetic Interventions (Postprocedure Wound Healing). *Pharmaceuticals* **13**; 10.3390/ph13070138 (2020).
261. Weimann, B. I. & Hermann, D. Studies on wound healing: effects of calcium D-pantothenate on the migration, proliferation and protein synthesis of human dermal fibroblasts in culture. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition* **69**, 113–119; 10.1024/0300-9831.69.2.113 (1999).
262. Marquardt, Y. *et al.* Characterization of a novel standardized human three-dimensional skin wound healing model using non-sequential fractional ultrapulsed CO₂ laser treatments. *Lasers in surgery and medicine* **47**, 257–265; 10.1002/lsm.22341 (2015).
263. Ebner, F., Heller, A., Rippke, F. & Tausch, I. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *American journal of clinical dermatology* **3**, 427–433; 10.2165/00128071-200203060-00005 (2002).
264. Gehring, W. & Gloor, M. Effect of topically applied dexpanthenol on epidermal barrier function and stratum corneum hydration. Results of a human in vivo study. *Arzneimittel-Forschung* **50**, 659–663; 10.1055/s-0031-1300268 (2000).
265. Proksch, E., Bony, R. de, Trapp, S. & Boudon, S. Topical use of dexpanthenol: a 70th anniversary article. *The Journal of dermatological treatment* **28**, 766–773; 10.1080/09546634.2017.1325310 (2017).
266. Abraham, E. J. *et al.* Scale-up of mammalian cell culture using a new multilayered flask. *Journal of visualized experiments : JoVE*; 10.3791/3418 (2011).
267. Storm, M. P. *et al.* Hollow Fiber Bioreactors for In Vivo-like Mammalian Tissue Culture. *Journal of visualized experiments : JoVE*; 10.3791/53431 (2016).

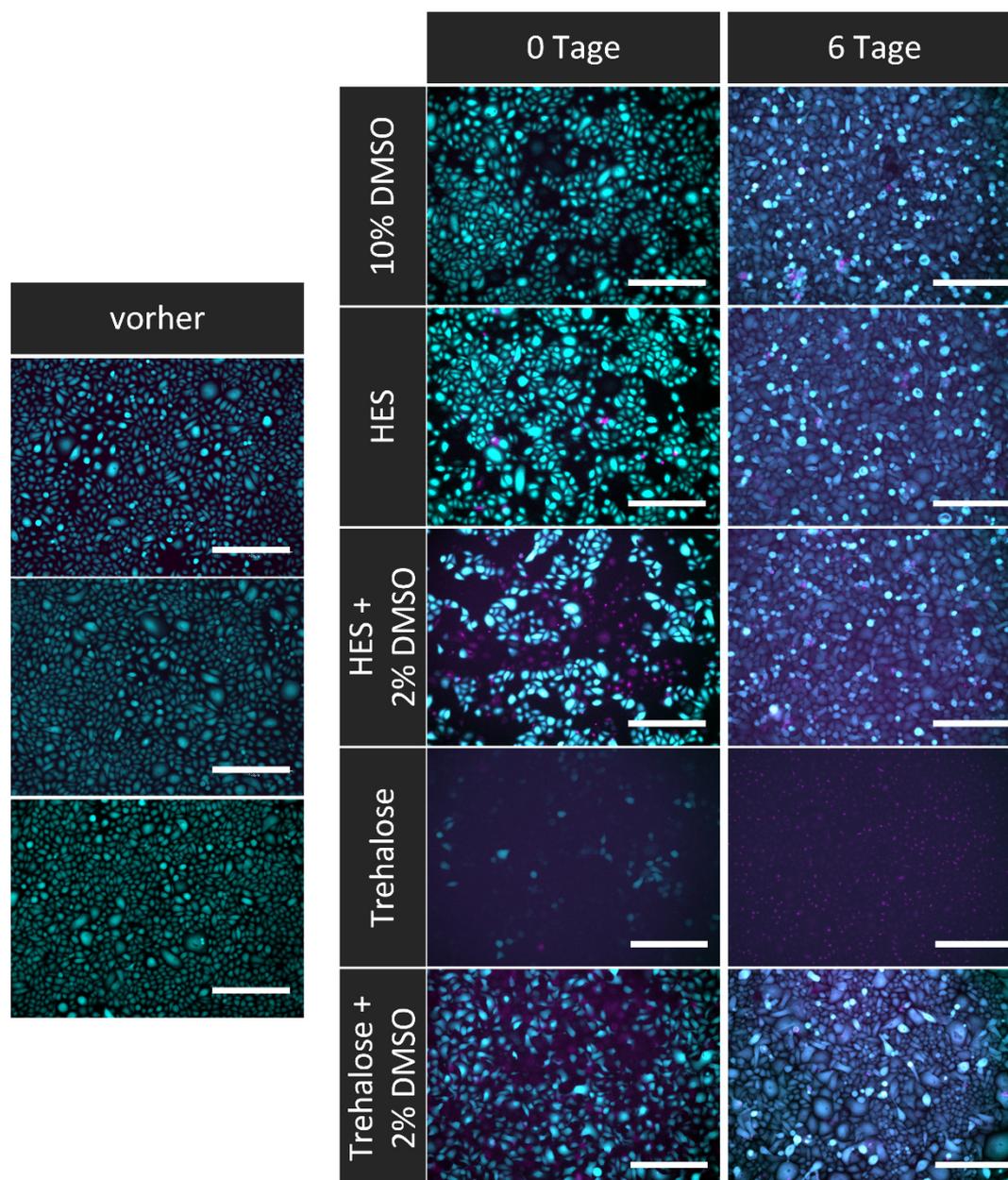
8 Appendix

8.1 Supplementäre Daten

Adhärent konservierte Keratinozyten



Supplementäre Abbildung 1: Kryokonservierung von adhärenen Zellen (Donor 2).
FDA/PI Färbung von adhären eingefrorenen Keratinozyten (Donor 2) mit 10 % DMSO, Hydroxyethylstärke (HES), HES + 2 % DMSO, Trehalose, und Trehalose + 2% DMSO bei 20 K/min. Die Viabilität der Zellen wurde vor dem Einfrieren, direkt nach dem Auftauen und 6 Tage nach dem Auftauen bestimmt; Die Maßstabsbalken entsprechen 450 μm.



Supplementäre Abbildung 2: Kryokonservierung von adhärennten Zellen (Donor 3).

FDA/PI Färbung von adhärennt eingefrorenen Keratinozyten (Donor 3) mit 10 % DMSO, Hydroxyethylstärke (HES), HES + 2 % DMSO, Trehalose, und Trehalose + 2% DMSO bei 20 K/min. Die Viabilität der Zellen wurde vor dem Einfrieren, direkt nach dem Auftauen und 6 Tage nach dem Auftauen bestimmt; Die Maßstabsbalken entsprechen 450 μm .

8.2 Danksagungen

Ich hatte mir immer vorgenommen, diesen Teil als allerletzten Punkt meiner Doktorarbeit zu schreiben. Dieser Zeitpunkt ist nun endlich gekommen und ich möchte ganz herzlich DANKE sagen.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Heike Walles und PD Dr. Marco Metzger für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg anfertigen zu dürfen.

Außerdem danke ich den Mitgliedern meines Prüfungskomitees, Prof. Dr. Markus Engstler und Prof. Dr. Gerhard Winter für die Begleitung meiner Arbeit über die letzten Jahre, für die interessierten Nachfragen und den fachlichen Rat.

Danke auch an Prof. Dr. Christian Janzen für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Florian Groeber-Becker. Danke für all deine Unterstützung, deine Zeit und ein offenes Ohr, wann immer ich deinen Rat benötigt habe. Aber auch dafür, dass du mich in den letzten Jahren konstant gefordert und gefördert, und so maßgeblich zu meiner beruflichen und persönlichen Entwicklung beigetragen hast.

Ich möchte auch Dr. Martin Funk, Ives Bernardelli de Mattos und Dr. Ute Rockinger danken, die Teil des Forschungsprojektes waren, im Zuge dessen meine Arbeit entstanden ist. Danke für die vielen Ideen, Hilfe bei IFs und zahlreiche spannende Treffen.

Die letzten 4 Jahre waren eine aufregende Reise, die ich sowohl physisch als auch psychisch vermutlich nicht so unbeschadet überstanden hätte, ohne ein tolles Team mit wundervollen Kollegen an meiner Seite.

Hier zu allererst ein Danke an meine beiden Studenten Elvan Akyürek und Saskia Zöphel. Euch bei euren Abschlussarbeiten zu begleiten war einer der besten Teile meiner Doktorarbeit und ich möchte mich bei euch herzlich bedanken für eure Arbeit, die zum Teil auch in diese Dissertation eingeflossen ist. Vor allem an Saskia auch nochmal ein großes Danke, dass du trotz widrigster Bedingungen während einer Pandemie deinen Enthusiasmus nicht verloren hast! (und zusätzlich noch die Kaffee/Tee- und Keksversorgung unserer Gruppe sicherstellst)

Von Herzen Danke an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der „Hautgruppe“. Mit euch wurden die besten Momente meiner Doktorarbeit noch viel besser und selbst die frustrierendsten Tage waren nur halb so schlimm. Danke für jede Kaffeepause, für die Hilfe im Labor, für jedes tolle Gespräch und jede Umarmung: Amelie, Angela, Anna L,

Anna R, Annika, Babsi, Carla, Christa, Christian, Christoph, Corinna, Dilan, Elvan, Franzi, Julian, Laurin, Lisa, Maxi, Nicola, Sabina, Saskia.

Danke auch an: Anna Kristina & Özlem, Christina, Marc, Shabaz, alle Sebastians und Tobis, aber auch an alle anderen Kollegen am TERM für diese tolle Zeit.

Ein ganz besonderes Danke geht an Kendra: Danke, dass du mittlerweile nicht nur eine Kollegin, sondern eine Freundin geworden bist, die mein Leben täglich ein bisschen bunter macht.

Natürlich haben auch viele Menschen außerhalb des Labors ein riesen Danke verdient. Hier möchte ich mich insbesondere bei meinen Freunden Alan, Christian, Doro, Domi, Kadda, Katha, Katja, Nata und Nina bedanken. Für all die Unterstützung in jeder Lebenslage, jedes Lachen, jedes Treffen, euren Rückhalt und noch vieles mehr.

Ein ganz besonderes Danke geht an meine Familie, meine Eltern, meine Geschwister und meine Großmutter. Danke, nicht nur dafür, dass ihr geschätzt 300 Kommafehler in dieser Arbeit ausgebessert und bis tief in die Nacht zusammen mit mir Kämpfe mit Kopfzeilen und Seitenzahlen ausgetragen habt. Danke dafür, dass ihr mich so manches Mal vor dem Durchdrehen bewahrt habt und mich erdet. Aber auch für eure Unterstützung und dafür, dass ihr bei all meinen Plänen hinter mir steht. Euer stetiges Vertrauen in mich und das Wissen, dass ihr mir immer den Rücken frei haltet bedeutet mir unendlich viel.

Last but not least: Tobi. Ich könnte vermutlich Seiten füllen ohne ganz umfassen zu können, wofür ich dir dankbar bin.

Deshalb **Danke!** Für einfach alles.

8.3 Affidativ

I hereby confirm that my thesis entitled "Development of an in vitro model for first degree burn wounds to test a cell based wound dressing" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of an examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

8.3.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Entwicklung eines in vitro Modells für Verbrennungen ersten Grades zur Testung einer zellbasierten Wundauflage“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

8.4 Publikationsliste

1. Delacher M., Simon M., Sanderink L., Hotz-Wagenblatt A., Wuttke M., Schambeck K., Schmidleithner L., Bittner S., Pant A., Ritter U., Hehlgans T., Riegel D., **Schneider V.**, Groeber-Becker F., Eigenberger A., Gebhard C., Strieder N., Fischer A., Rehli M., Hoffmann P., Edinger M., Strowig T., Huehn J., Schmidl C., Werner J.M., Prantl L., Brors B., Imbusch C.D., Feuerer M., „Single-cell chromatin accessibility landscape identifies tissue repair program in human regulatory T cells“, 2021, Immunity
2. **Schneider V.**, Kruse D., de Mattos I.B., Zöphel S., Tiltmann K.-K., Reigl A., Khan S., Funk M., Bodenschatz K., Groeber-Becker F., “A 3D In Vitro Model for Burn Wounds: Monitoring of Regeneration on the Epidermal Level.” 2021, Biomedicines
3. Weigel T., Malkmus C., **Weigel V.**, Wußmann M., Brennecke J., Groeber-Becker F., Hansmann J., „Full synthetic 3D fibrous scaffolds for stromal tissues – replacement of animal derived scaffold materials demonstrated by multilayered skin” 2021, Advanced Materials (Submitted)

