

Aus der Klinik und Poliklinik  
für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie – Plastische Operationen  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Modifikation der Makrophagen-Aktivität durch Extrakorporale Stoßwellentherapie in  
einem dreidimensionalen Hautmodell

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Moritz Große-Leege  
aus Osnabrück

Mainz, 2025



Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 03. Dezember 2025

Nachnutzungslizenz: CC BY 4.0



Diese Arbeit widme ich meiner wundervollen Familie.

# Inhaltsverzeichnis

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                        | <b>V</b>    |
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                        | <b>VIII</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                          | <b>X</b>    |
| <b>1 Einleitung.....</b>                                  | <b>1</b>    |
| 1.1 Einführung .....                                      | 1           |
| 1.2 Ziel der Dissertation.....                            | 2           |
| <b>2 Literaturdiskussion.....</b>                         | <b>3</b>    |
| 2.1 Wundheilung.....                                      | 3           |
| 2.2 Makrophagen.....                                      | 6           |
| 2.2.1 Polarisierung der Makrophagen .....                 | 6           |
| 2.2.2 Bedeutung von Makrophagen für die Wundheilung ..... | 8           |
| 2.3 Extrakorporale Stoßwellentherapie.....                | 9           |
| 2.3.1 Physikalische Grundlagen.....                       | 9           |
| 2.3.2 Effekte der Stoßwelle auf das Gewebe .....          | 13          |
| 2.3.3 Biologische Wirkung.....                            | 14          |
| 2.3.4 Problemstellungen im Versuchsaufbau .....           | 15          |
| 2.4 3D-Modelle in der Zellkultur.....                     | 16          |
| <b>3 Material und Methoden.....</b>                       | <b>19</b>   |
| 3.1 Material .....  | 19          |
| 3.1.1 Verwendete Zellen .....                             | 19          |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....                         | 19          |
| 3.1.3 Zusätze der Zellkulturmedien .....                  | 21          |
| 3.1.4 Antikörper und Farbstoffe.....                      | 22          |
| 3.1.5 Chemikalien.....                                    | 24          |
| 3.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen.....          | 26          |
| 3.1.7 Gebrauchsgegenstände und Geräte .....               | 28          |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.1.8   | Software .....  | 30 |
| 3.2     | Methoden.....   | 31 |
| 3.2.1   | Steriles Arbeiten .....   | 31 |
| 3.2.2   | Isolation der Primärzellen.....                                     | 31 |
| 3.2.2.1 | Isolation HUVECs .....  | 31 |
| 3.2.2.2 | Isolation Fibroblasten.....   | 32 |
| 3.2.2.3 | Isolation primärer mononukleärer Zellen .....                       | 32 |
| 3.2.2.4 | Plasmaaufbereitung.....   | 34 |
| 3.2.2.5 | Adhärenzen der Monozyten .....                                      | 34 |
| 3.2.2.6 | Differenzierung der M1-ähnlichen Makrophagen zu M1-Makrophagen..... | 35 |
| 3.2.2.7 | Entnahme der Makrophagen .....                                      | 36 |
| 3.2.3   | 3D-Hautmodell auf Basis einer Kollagenmembran .....                 | 37 |
| 3.2.3.1 | Besiedlung der Kollagenmatrices .....                               | 37 |
| 3.2.4   | Histologische Analyse .....   | 39 |
| 3.2.4.1 | Hämatoxylin-Eosin Färbung .....                                     | 39 |
| 3.2.4.2 | Immunhistochemische Färbung.....                                    | 39 |
| 3.2.4.3 | Immunfluoreszenzfärbung .....                                       | 40 |
| 3.2.5   | 3D-Modell auf Basis des Kollagengels.....                           | 41 |
| 3.2.5.1 | Ansetzen des Kollagengels .....                                     | 42 |
| 3.2.5.2 | Überführen der Makrophagen in das Kollagengel .....                 | 43 |
| 3.2.5.3 | Stoßwellentherapie .....  | 44 |
| 3.2.5.4 | Isolation der Makrophagen aus dem Kollagengel.....                  | 45 |
| 3.2.6   | Kultivieren der Zellen auf einer Zellkulturplatte .....             | 46 |
| 3.2.6.1 | Ablösen der Zellen von der Zellkulturplatte .....                   | 46 |
| 3.2.7   | Durchflusszytometrie .....  | 47 |
| 3.2.7.1 | FACS-Färbung der Zellen.....  | 48 |
| 3.2.7.2 | FACS-Messung .....  | 49 |
| 3.2.7.3 | FACS-Auswertung .....   | 50 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.2.8    | Statistische Auswertung .....  | 50        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse.....</b>   | <b>51</b> |
| 4.1      | Histologische Analyse der Bio-Gide® Kollagenmembranen .....                                      | 51        |
| 4.1.1    | Nachweis der Makrophagen in Monokultur .....   | 51        |
| 4.1.2    | Immunhistochemischer Nachweis zellulärer Aktivität innerhalb der besiedelten Kollagenmatrix..... | 52        |
| 4.1.3    | Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der HUVECs .....   | 54        |
| 4.2      | Analyse der Kollagengel-Versuche.....  | 55        |
| 4.2.1    | Gruppenvergleich Stoßwellentherapie .....  | 57        |
| 4.2.2    | Gruppenvergleich Positivkontrollen .....   | 58        |
| 4.2.3    | Vergleich aller Gruppen.....   | 59        |
| 4.2.3.1  | CD209 Antikörper .....   | 60        |
| 4.2.3.2  | CD86 Antikörper .....  | 61        |
| 4.2.3.3  | CD200R Antikörper.....   | 62        |
| 4.2.3.4  | CD163 Antikörper .....   | 63        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>65</b> |
| 5.1      | 3D <i>in vitro</i> Hautmodelle .....   | 65        |
| 5.2      | Kollagenmembran als Basis eines 3D <i>in vitro</i> Hautmodells .....                             | 67        |
| 5.2.1    | Fibroblasten in der Kollagenmembran .....  | 68        |
| 5.2.2    | HUVECs in der Kollagenmembran.....   | 69        |
| 5.2.3    | Makrophagen in der Kollagenmembran .....   | 70        |
| 5.2.4    | Fazit 3D-Hautmodell auf Basis einer Kollagenmembran.....   | 73        |
| 5.3      | Hydrogele als Basis von 3D <i>in vitro</i> Hautmodellen.....                                     | 74        |
| 5.4      | 3D-Hautmodell auf Basis eines bovinen Kollagengels .....   | 75        |
| 5.4.1    | Stoßwellenapplikation .....  | 76        |
| 5.4.1.1  | Auswahl der Parameter der ESWT.....  | 78        |
| 5.4.1.2  | Auswertung der Oberflächenmoleküle der Makrophagen .....   | 80        |
| 5.4.1.3  | Vergleich der Positivkontrollen .....  | 82        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 5.4.1.4   | Einfluss der ESWT auf die Differenzierung der Makrophagen .....              | 83         |
| 5.4.2     | Diskussion des Versuchsaufbaus .....   | 87         |
| 5.4.2.1   | Stoßwellenübertragung.....   | 87         |
| 5.4.2.2   | Methode der Analyse der Makrophagen.....                                     | 88         |
| <b>6</b>  | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>92</b>  |
| <b>7</b>  | <b>Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>93</b>  |
| <b>8</b>  | <b>Anhang.....</b>   | <b>110</b> |
| 8.1       | Protokolle der Versuchsreihe 3D-Hautmodell auf Basis einer Kollagenmembran.. | 110        |
| 8.1.1     | Isolation der Fibroblasten aus oraler Mundschleimhaut.....                   | 110        |
| 8.1.2     | Isolation der HUVECs .....   | 110        |
| 8.1.3     | Immunhistochemische Färbungen .....  | 112        |
| 8.1.4     | CD31-Fluoreszenzfärbung .....  | 114        |
| <b>9</b>  | <b>Danksagung .....</b>  | <b>115</b> |
| <b>10</b> | <b>Tabellarischer Lebenslauf.....</b>  | <b>116</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| 2D            | zweidimensional   |
| 3D            | dreidimensional   |
| 5-HT          | 5-Hydroxytryptamin  |
| AK            | Antikörper  |
| $\alpha$ -SMA | <i><math>\alpha</math>-Smooth Muscle Actin</i>                |
| BC            | Buffy-Coat  |
| BSA           | bovines Serumalbumin  |
| CD            | <i>Cluster of Differentiation</i>                             |
| COX-2         | Cyklooxygenase-2  |
| CXCL          | <i>Chemokine Ligand</i>                                       |
| DF            | Durchflusszytomtrie   |
| DMEM          | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>                     |
| DPBS          | <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>                   |
| EZM           | Extrazellulärmatrix   |
| EDTA          | Ethylendiamintetraessigsäure                                  |
| ELISA         | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>                      |
| eNOS          | <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>                      |
| ERK 1/2       | <i>Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2</i> |
| ESWT          | Extrakorporale Stoßwellentherapie                             |
| FACS          | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>                    |
| FCS           | fötales Kälberserum   |
| fESWT         | fokussierte Extrakorporale Stoßwellentherapie                 |
| FIZZ1         | <i>Found In Inflammatory Zones 1</i>                          |
| FMO           | <i>Fluorescence Minus One</i>                                 |
| FP            | FACS-Puffer   |
| FSC           | <i>Forward Scatter</i>  |
| HDMEC         | <i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cells</i>           |

|                |  |
|----------------|--|
| HE             | Hämatoxylin-Eosin                                    |
| HIF-1 $\alpha$ | <i>Hypoxia-Inducible Factor 1<math>\alpha</math></i> |
| HSC            | Haematopoetic Stem Cells                             |
| HUVEC          | <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>        |
| IF             | Immun-Fluoreszenzfärbung                             |
| IHC            | immunohistochemischen Färbung                        |
| IL-1           | Interleukin-1  |
| IL-1 $\alpha$  | Interleukin-1 $\alpha$                               |
| IL-1 $\beta$   | Interleukin-1 $\beta$                                |
| IL-4           | Interleukin-6  |
| IL-6           | Interleukin-6  |
| IL-10          | Interleukin-10                                       |
| IL-12          | Interleukin-12                                       |
| IL-13          | Interleukin-13                                       |
| IL-33          | Interleukin-33                                       |
| iNOS           | <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>               |
| LPS            | Lipopolysaccharide                                   |
| M1-DM          | Differenzierungsmedium M1-Makrophagen                |
| M1-like-DM     | Differenzierungsmedium M1-ähnliche Makrophagen       |
| MAPK           | Mitogen-aktivierte Proteinkinase                     |
| MFI            | mediane Fluoreszenzintensität                        |
| MHC-II         | <i>Major Histocompatibility Complex II</i>           |
| MMP            | Matrix-Metalloproteasen                              |
| MSZ            | mesenchymale Stammzellen                             |
| NaOH           | Natriumhydroxid                                      |
| NF- $\kappa$ B | <i>Nuclear Factor-<math>\kappa</math>B</i>           |
| Pa             | Pascal   |
| PBMCs          | <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>            |

|                  |   |
|------------------|---|
| PCNA             | <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>                                 |
| PIPAm            | <i>Poly-N-Isopropylacrylamid</i>  |
| P/S              | <i>Penicillin-Streptomycin</i>  |
| qPCR             | <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>                             |
| rESWT            | <i>radiale Extrakorporale Stoßwellentherapie</i>                          |
| rh GM-CSF        | <i>Recombinant Human Granolocyte Macrophage-colony Stimulating Factor</i> |
| rh IL-4          | <i>Recombinant Human Interleukin 4</i>                                    |
| rh INF- $\gamma$ | <i>Recombinant Human Interferon-<math>\gamma</math></i>                   |
| rh M-CSF         | <i>Recombinant human macrophage-colony stimulating factor</i>             |
| ROS              | <i>Reactive oxygen species</i>  |
| rpm              | <i>Revolutions Per Minute</i>   |
| RPMI             | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>                                    |
| SDF-1            | <i>Stromal Cell-Derived Factor-1</i>                                      |
| SSC              | <i>Side Scatter</i>   |
| TGF- $\beta$     | <i>Tumor Growth Factor <math>\beta</math></i>                             |
| TLR              | <i>Toll Like Receptor</i>   |
| TNF- $\alpha$    | <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>                          |
| VEGF             | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>                                 |
| VE-Wasser        | <i>vollentsalztes Wasser</i>  |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Phasen der Wundheilung.....   | 5  |
| Abbildung 2: Polarisierung der Makrophagen.....  | 8  |
| Abbildung 3: Graphische Darstellung der fokussierten und radialen Stoßwelle.....   | 11 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der Effekte einer Stoßwelle in Gewebe.....   | 13 |
| Abbildung 5: Buffycoat nach Dichtegradientenzentrifugation.....  | 33 |
| Abbildung 6: PBMCs nach Adhärenz der Monozyten auf einer gewaschenen Zellkulturschale.<br>.....                              | 35 |
| Abbildung 7: Auf der Zellkulturschale adhärenente Makrophagen unmittelbar vor der Entnahme.<br>.....                         | 36 |
| Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf des Kollagengel-Versuchsaufbaus.....  | 41 |
| Abbildung 9: Kollagengel-Ansatz.....   | 43 |
| Abbildung 10: Belegung der verwendeten Zellkulturplatten.....  | 43 |
| Abbildung 11: Durchführung der ESWT.....   | 45 |
| Abbildung 12: Makrophagen in Zellkultur.....   | 47 |
| Abbildung 13: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Durchflusszytometrie.....                                      | 48 |
| Abbildung 14: HE-Färbung der mit Makrophagen in Mono-Kultur besiedelten<br>Kollagenmembran.....                              | 52 |
| Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung der Fibroblasten und HUVECs in der<br>Kollagenmembran.....                     | 53 |
| Abbildung 16: Immunhistochemische CD45 Färbung der Tri-Kultur in der Kollagenmembran.<br>.....                               | 54 |
| Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der HUVECs in der Kollagenmembran<br>an Tag 14 und 21.....               | 55 |
| Abbildung 18: Gating der Makrophagen in der Durchflusszytometrie.....  | 56 |
| Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse einer Makrophagenpopulation.....   | 57 |
| Abbildung 20: Übersicht der MFI-Messwerte der Gruppen „mit ESWT“ und „ohne ESWT“ ...   | 58 |
| Abbildung 21: Übersicht der MFI-Messwerte der Gruppen „Positivkontrolle Gel“ und<br>„Positivkontrolle Zellkulturplatte“..... | 59 |
| Abbildung 22: Übersicht der MFI-Messwerte des CD209 Antikörpers.....   | 60 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 23: Übersicht der MFI-Messwerte des CD86 Antikörpers.....    | 61 |
| Abbildung 24: Übersicht der MFI-Messwerte des CD200R Antikörpers. .... | 62 |
| Abbildung 25: Übersicht der MFI-Messwerte des CD163 Antikörpers.....   | 64 |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Akustische Impedanz verschiedener Medien.....   | 12 |
| Tabelle 2: Primärzellen mit Angabe des Isolationsgewebes.....  | 19 |
| Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben. ....  | 19 |
| Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze mit Herstellerangaben.....                                  | 21 |
| Tabelle 5: Verwendete Antikörper und Todfarbstoff mit Angabe von Anwendung, Artikelnummer und Hersteller. .... | 22 |
| Tabelle 6: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben. ....  | 24 |
| Tabelle 7: Verwendete Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen mit ihren Zusammensetzungen. ....                  | 26 |
| Tabelle 8: Verwendete Gebrauchsgegenstände und Geräte mit Herstellerangabe.....                                | 28 |
| Tabelle 9: Verwendete Software mit Angabe der Version.....   | 30 |
| Tabelle 10: FACS-Färbungen mit Inhalt der Färbelösung.....   | 49 |
| Tabelle 11: MFI-Messwerte des CD209 Antikörpers.....   | 60 |
| Tabelle 12: MFI-Messwerte des CD86 Antikörpers.....  | 62 |
| Tabelle 13: MFI-Messwerte des CD200R Antikörpers.....  | 63 |
| Tabelle 14: MFI-Messwerte des CD163 Antikörpers.....   | 64 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Der Erhalt einer funktionellen Haut- und Schleimhautbarriere spielt eine wesentliche Rolle für die Homöostase des Körpers. Sie übernimmt wichtige Schutzfunktionen gegen thermische, physikalische und chemische Noxen (1). Kommt es zu einer Verletzung der Haut durch einen Unfall oder eine chirurgische Intervention, ist eine physiologisch ablaufende Wundheilung von essentieller Bedeutung für den Organismus. Dabei können chronische Erkrankungen die Wundheilung erheblich beeinträchtigen und sorgen in der Folge für eine erhöhte Anfälligkeit des Körpers für Infektionen, Flüssigkeitsverlust oder thermische Dysregulationen (1, 2).

Im Rahmen der Wundheilung übernehmen Makrophagen eine zentrale Rolle. Sie beeinflussen die Angiogenese und lösen in der inflammatorischen Phase der Wundheilung die Neutrophilen als Mediatoren der Entzündungsreaktion ab (3-7). Nach der initialen Verletzung des Gewebes werden im Blut zirkulierende Monozyten rekrutiert, die im Verlauf differenzieren und dabei unterschiedliche Phänotypen annehmen können (2). In der Literatur wird besonders zwischen pro-inflammatorischen, antimikrobiellen M1-Makrophagen und anti-inflammatorischen, die Wundheilung stimulierenden M2-Makrophagen unterschieden (6, 8, 9). In einer physiologisch ablaufenden Wundheilung findet ein Wechsel der Polarisierung statt; bis zum dritten Tag nach einer Verletzung des Gewebes dominieren M1-Makrophagen (2). Danach findet ein Übergang zu einer M2-dominierten Makrophagenpopulation im Wundgebiet statt (7, 10).

Bei chronischen Wunden kommt es zu einer anhaltenden Entzündungsreaktion und infolgedessen zu einer exzessiven Narbenbildung. Dabei spielen Makrophagen eine zentrale Rolle. So fördert eine prolongierte Anwesenheit von pro-inflammatorischen Makrophagen die Entzündung, wohingegen eine verstärkte anti-inflammatorische Aktivität die Regeneration des Gewebes anregt (11). Gleichzeitig führt eine überschießende M2-Funktion zu einer verstärkten Narbenbildung und Fibrose (12). Die Balance der unterschiedlich polarisierten Makrophagen scheint daher von großer Bedeutung zu sein. Durch eine gezielte Stimulation der Makrophagenpolarisation zu Gunsten ihrer gewebergenerativen Eigenschaften ist eine positive Beeinflussung der Wundheilung denkbar.

Die Extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) stellt hierbei, als nicht-invasive Therapie zur Förderung der lokalen Geweberegeneration eine vielversprechende Methode zur Beeinflussung der Wundheilung dar (13). Seit vielen Jahren ist sie zur Behandlung verschiedener muskuloskelettaler Erkrankungen zugelassen (14, 15). Klinisch sind nach der Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen neben den lokal schmerzlindernden auch anti-inflammatorische, pro-angiogene und regenerative Eigenschaften zu beobachten (14, 16-18).

Dabei sind die genauen Hintergründe der Wirkungsweise bislang nicht ausreichend geklärt (13, 19-21).

Bislang ist bekannt, dass die ESWT unter anderem die Transkription und Modulation von intrazellulären Proteinen beeinflusst (22, 23). Die Wirkung der ESWT auf Zellen des Immunsystems ist dagegen wenig untersucht. Sukubo et al. beschrieben jedoch erstmals eine Förderung der Polarisation zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen (24).

## 1.2 Ziel der Dissertation

Trotz der zunehmenden Anzahl wissenschaftlicher Studien zu den therapeutischen Effekten der ESWT mangelt es bislang an belastbaren und realitätsnahen Modellen zur Untersuchung ihrer Wirkmechanismen. Die bisher verwendeten *in-vitro*-Systeme basieren überwiegend auf Zellkulturen in Flüssigmedien (24-26). Angesichts der bei ESWT beobachtbaren Phänomene wie Kavitation und Flüssigkeitsströme in Interzellularräumen ist die Validität solcher Versuchsansätze jedoch als begrenzt einzuschätzen. Daher besteht derzeit eine Diskrepanz zwischen den klinisch nachgewiesenen Effekten der ESWT und der Frage, wie diese durch zelluläre Veränderungen vermittelt werden.

Vor diesem Hintergrund hatte die vorliegende Arbeit zunächst das Ziel, ein neues dreidimensionales (3D) Gewebemodell zu entwickeln, das eine belastbare Untersuchung der molekularen Mechanismen der ESWT ermöglicht. Dieses Modell soll physiologische Bedingungen simulieren, wie sie in der menschlichen Haut vorherrschen und gleichzeitig die Kultur und Behandlung humaner Makrophagen erlauben.

Da die Wundheilung eng mit einer strukturierten immunologischen Reaktion verknüpft ist, spielen Makrophagen und insbesondere ihre Polarisierung eine entscheidende Rolle für einen physiologischen Heilungsverlauf. Während ein Ungleichgewicht in der Zellzusammensetzung negative Auswirkungen auf die Gewebemöostase haben kann, könnte die gezielte Stimulation einer physiologisch geordneten immunologischen Reaktion die Wundheilung fördern.

Klinische Daten deuten darauf hin, dass die ESWT in der Lage ist, Entzündungsreaktionen zu reduzieren und die Geweberegeneration positiv zu beeinflussen (14, 16-18). Trotz der etablierten Anwendung dieses Verfahrens in verschiedenen Indikationen sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch unzureichend erforscht. Daher zielt ein zweiter Schritt dieser Arbeit darauf ab, potentielle Effekte der ESWT auf die Polarisierung von Makrophagen zu untersuchen, da diese möglicherweise die anti-inflammatorische Wirkung erklären könnten, die klinisch beobachtet wurde. Im Fokus steht hierbei insbesondere die potentielle Umpolarisierung von M1-Makrophagen zu M2-Makrophagen.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Wundheilung

Der Prozess der Wundheilung kann in vier sich zeitlich überlagernde Phasen eingeteilt werden: Hämostase, Inflammation, Proliferation und Remodellierung (Abbildung 1) (7, 27).

Die Phase der Hämostase ist geprägt durch die Bildung eines Blutkoagels sowie eine Kontraktion der betroffenen Gefäße (28). Treffen Thrombozyten auf die subendotheliale Matrix eines geschädigten Gefäßes, interagieren Rezeptoren auf ihrer Oberfläche mit extrazellulären Matrixproteinen, wie dem von-Willebrand-Faktor oder Fibronectin, wodurch sie an der Gefäßwand adhären (7). Im weiteren Verlauf kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten und zu einer Vernetzung der Zellen zu einem Koagel. Dieses besteht aus Fibrin, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin (29). Das Koagel übernimmt mehrere Aufgaben: Es stoppt die Blutung, dient als Plattform für migrierende Zellen und bildet ein Reservoir aus Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die das Verhalten der Zellen der frühen Wundheilung beeinflussen (6, 30).

In der inflammatorischen Phase wird eine Immunreaktion durch *Damage-Associated Molecular Patterns*, die durch nekrotische Zellen und zerstörtes Gewebe ausgesendet werden, sowie *Pathogen-Associated Molecular Patterns* initiiert, indem diese lokale Immunzellen, wie Mastzellen, Makrophagen, oder T-Zellen, aktivieren (7, 31). Daraufhin werden proinflammatorische Botenstoffe, wie Lipopolysaccharide (LPS), *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin 1 (IL-1), freigesetzt, die ihrerseits Leukozyten anregen (32, 33). Zudem stimulieren sie den Prozess der Vasodilatation und die Freisetzung von Zelladhäsionsmolekülen, wie Selektinen (7, 34). Diese begünstigen ihrerseits die Diapedese sowie Adhäsion von Neutrophilen und Monozyten und nehmen daher eine entscheidende Rolle im Verlauf der inflammatorischen Phase der Wundheilung ein (7, 34). Neutrophile Granulozyten beteiligen sich durch Phagozytose und Freisetzung von *reactive oxygen species* (ROS), antimikrobiellen Peptiden und proteolytischen Enzymen an der Entfernung von nekrotischem Gewebe und Pathogenen (35). Die im Blut zirkulierenden Monozyten migrieren in das Wundgebiet und differenzieren zu Makrophagen. Ihre höchste Konzentration haben sie dabei eine Woche nach dem initialen Gewebeschaden (36).

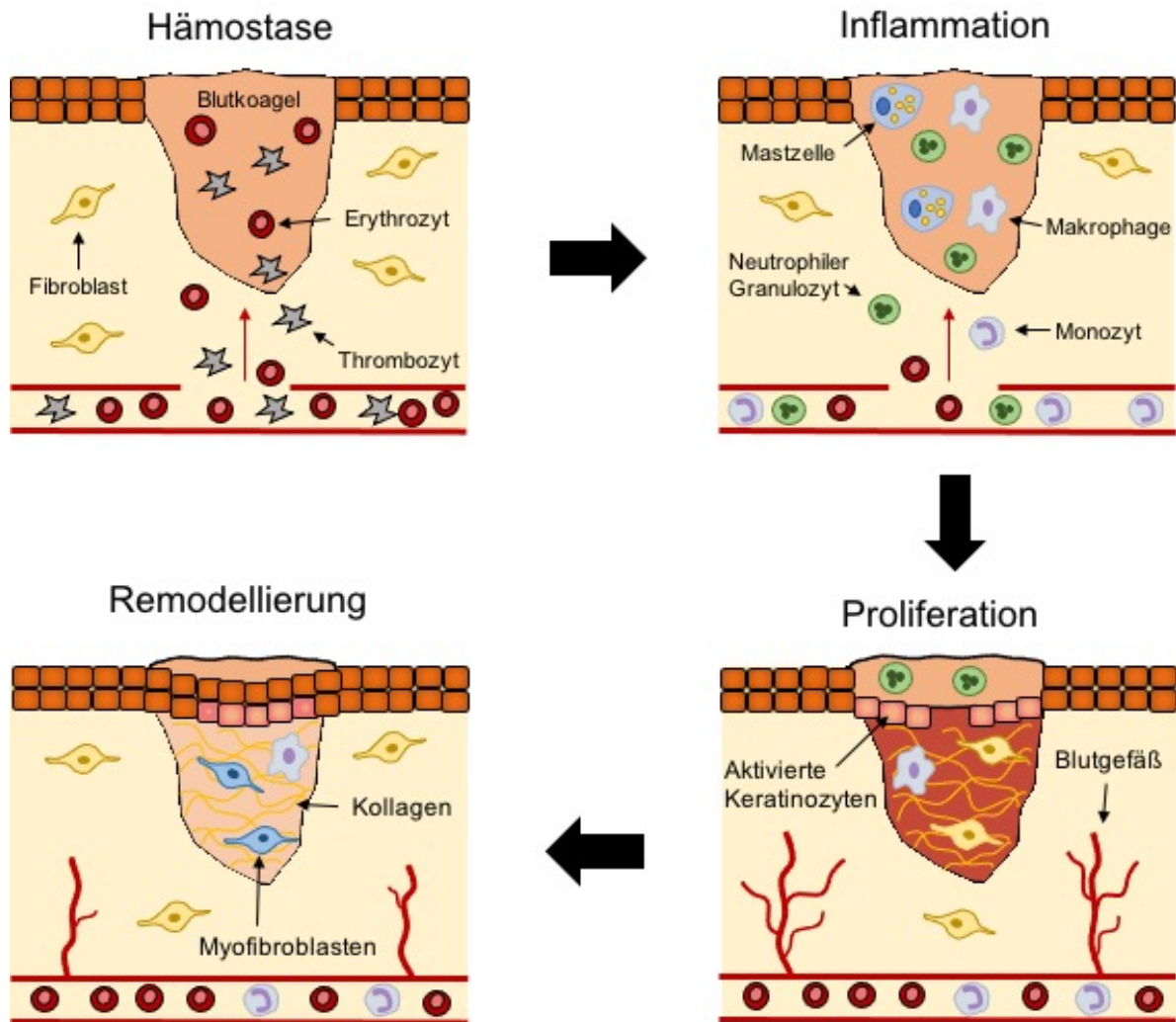
Die proliferative Phase, die auch mit dem Begriff der Gewebeformation beschrieben wird, zeichnet sich vor allem durch die Bildung von gefäßreichem Granulationsgewebe und die Apposition von Kollagen aus (6). Auf zellularer Ebene spielen hierbei insbesondere Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und Keratinozyten eine entscheidende Rolle (7). Einige Stunden nach der Verletzung werden die Keratinozyten des Gewebes durch diverse

Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder mechanischen Druck, aktiviert (37). Dadurch ändert sich ihre vertikale Polarisierung zu einer horizontalen; die randständigen Keratinozyten, auch als aktivierte Keratinozyten bezeichnet, migrieren in die Wunde und leiten so den Prozess der Reepithelialisierung ein (38). Die Migration endet, wenn sich die Zellen der beiden gegenüberliegenden Wundränder treffen und damit eine dünne Epithelschicht vorliegt (7). Anschließend beginnen die Keratinozyten mit der darunterliegenden Matrix zu interagieren – die Basalmembran wird gebildet (36).

Sowohl ortsständige als auch Fibroblasten mesenchymaler Herkunft sind hauptverantwortlich für die Umwandlung des initial gebildeten fibrinreichen Granulationsgewebes (7). Ihre Aufgaben sind dabei vielschichtig. Als Myofibroblasten sorgen sie für eine Kontraktion der Wunde; sie produzieren extrazelluläre Matrixproteine und unterstützen die Reepithelialisation (7, 39, 40).

Um den wachsenden metabolischen Ansprüchen des Wundgebietes gerecht zu werden, induziert die im Gewebe anwachsende Hypoxie die Angiogenese (41). Über die Expression von Hypoxie induzierenden Faktoren (HIF) und die folgende Ausschüttung verschiedener an der Angiogenese beteiligten Faktoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), werden Endothelzellen angeregt, die in der Folge beginnen zu proliferieren und tubuläre Netzwerke auszubilden, die sich dann endgültig zu Gefäßen ausformen (5, 41, 42). Makrophagen haben in diesem Prozess einen wesentlichen Einfluss auf die Migration der Endothelzellen sowie die Regulation der Gefäßneubildung (4, 5, 43-45).

Die Remodellierung zeichnet sich im Wesentlichen durch einen Umbau der Extrazellulärmatrix (EZM) aus und ist zeitlich nicht strikt am Ende der Wundheilung einzuordnen, sondern findet, wie alle Phasen, parallel mit diesen statt und endet mit der Ausbildung einer reifen Narbe (7). Fibroblasten nehmen zusammen mit Makrophagen und Keratinozyten durch die Produktion von Proteasen wie Matrix-Metalloproteasen (MMPs) eine zentrale Rolle im Rahmen des Umbauprozesses ein (6, 7). MMPs sind Zink-abhängige Enzyme, die an dem Abbau und der Umwandlung der EZM beteiligt sind (6). Die Fibroblasten produzieren Hyaluronan, Proteoglykane sowie Fibronectin und ersetzen damit das Fibrinkoagel; es kommt nachfolgend zur Ausbildung von Kollagenfibrillen (46). Das entstehende Narbengewebe ist jedoch in seiner Integrität und EZM-Architektur nicht mit der unverletzter Haut vergleichbar und erreicht nur etwa 80 Prozent der vor der Verletzung vorhandenen Stabilität (47, 48).



**Abbildung 1: Phasen der Wundheilung.**

Die schematische Abbildung zeigt vereinfacht die vier sich zeitlich überlagernden Phasen der Wundheilung einschließlich der jeweils wichtigsten beteiligten zellulären Akteure. In der Hämostase entsteht ein Blutkoagel, wodurch die Wunde verschlossen wird und Thrombozyten aus nahegelegenen Blutgefäßen einwandern können (7, 28). Die Phase der Inflammation ist initial durch die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten geprägt, die unter anderem durch die Histaminausschüttung der ortsständigen Mastzellen in die Wunde migrieren (7, 31). Später wandern vermehrt Monozyten ein, differenzieren zu Makrophagen und lösen die Granulozyten als hauptverantwortliche Mediatoren der Wundheilung ab (36). Die proliferative Phase wird geprägt durch die Ausbildung von gefäßreichem Granulationsgewebe sowie der Apposition von Kollagen durch Fibroblasten (6). Makrophagen sind supportiv in diesem Prozess tätig (6, 7). Gleichzeitig leiten aktivierte Keratinozyten durch ihre Migration in das Wundzentrum die Reepithelialisierung des Defektes ein (38). Myofibroblasten sorgen in der Phase der Remodellierung für eine Kontraktion der Wunde (39, 40). Parallel dazu sorgen die Fibroblasten, Keratinozyten und Makrophagen für einen weiteren Umbau der EZM und die zuvor benötigten Blutgefäße bilden sich nach und nach zurück (6, 7).

Modifiziert nach Wilkinson et al. 2020 (7).

## 2.2 Makrophagen

Makrophagen werden zu dem angeborenen Immunsystem gezählt und besitzen essenzielle Aufgaben im Rahmen entzündlicher Prozesse, der Homöostase, der Wundheilung sowie der Abwehr von Infekten (49, 50). Ihr Ursprung lässt sich auf zwei Quellen zurückführen. Einerseits stammen sie von im Blut zirkulierenden Monozyten ab, andererseits von erythro-myeloischen Vorläuferzellen des embryonalen Dottersacks (6). Beide Monozytenarten sind dazu in der Lage zu proliferieren (51). Letztere kolonialisieren die sich entwickelnden betreffenden Organe und differenzieren zu residualen Makrophagen – wie Langerhanszellen in der Haut, Kupferzellen in der Leber oder alveoläre Makrophagen in der Lunge (52).

Die im Blut zirkulierenden Makrophagen entstammen gemeinsam mit Erythrozyten und Granulozyten den *Haematopoietic Stem Cells* (HSC) (53). In der fetalen Periode übernimmt die Leber die Aufgabe der Hämatopoese, während die adulten HSC ihren Ursprung im Knochenmark haben (53, 54). Nach der Geburt wird ein Teil, der von den erythro-myeloischen Vorläuferzellen abstammenden Makrophagen durch von HSC abstammenden Makrophagen ersetzt (52, 55, 56). Bei erwachsenen Menschen liegen demnach sowohl aus dem Knochenmark als auch aus der Embryonalphase entstammende Makrophagen vor (51).

In der Literatur werden Makrophagen nicht nur entsprechend ihrer Herkunft, sondern insbesondere nach ihrer Funktion und ihrem Phänotyp unterteilt. Dafür werden sie in drei Kategorien eingeteilt: naive, unstimulierte M0-Makrophagen, pro-inflammatorische, antimikrobielle M1-Makrophagen und anti-inflammatorische, die Wundheilung stimulierende M2-Makrophagen (6, 8, 9). Diese vereinfachte Darstellung kann weiter unterteilt werden: entsprechend ihrer Funktion werden M2-Makrophagen in die Subtypen M2a, M2b, M2c und M2d unterteilt (49, 57-59). Eine exakte Abgrenzung der einzelnen Subtypen ist jedoch nicht immer sinnvoll, da der Übergang zwischen den beschriebenen Phänotypen fließend und als Spektrum zu betrachten ist. Daher stellt die Einteilung der Makrophagen lediglich eine Vereinfachung dar und kann die Inhomogenität innerhalb einer Gruppe sowie die funktionelle Flexibilität der Zellen nicht exakt abbilden (6).

### 2.2.1 Polarisierung der Makrophagen

Die beschriebenen funktionalen Phänotypen entwickeln die Makrophagen als Reaktion auf Stimuli und Signale in ihrer unmittelbaren Mikroumgebung; dieser Prozess wird als Polarisation bezeichnet (59). Er kann dabei durch Kommunikation der Makrophagen mit anderen Zellen über Zytokine oder Chemokine sowie durch eine Veränderung des pH-Wertes im Gewebe induziert werden (60-62). Charakterisiert werden die polarisierten Phänotypen

durch die exprimierten Oberflächenproteine, produzierten Zytokine und ihre biologische Funktion (59).

LPS sowie die Marker- beziehungsweise Effektorzytokine der Typ1-T-Helfer-Zellen Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) und TNF- $\alpha$  bewirken eine Polarisation der Makrophagen zum M1-Phänotyp (59, 63). Sie können durch die Oberflächenproteine *Toll Like Rezeptor-2* (TLR-2), TLR-4, *Cluster of Differentiation 80* (CD80), CD86, *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS), HLA-DR und *Major Histocompatibility Complex II* (MHC-II) charakterisiert werden (59). M1-Makrophagen wirken durch die Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1, Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6), *Chemokine Ligand 9* (CXCL9), CXCL10, sowie die Produktion von iNOS in ihrer Funktion antimikrobiell und pro-inflammatorisch (51, 59, 64, 65). *Nuclear Factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) und *Signal Transducer And Activator Of Transcription 1* scheinen als wichtigste Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle in der Polarisation zu M1-Makrophagen zu spielen (51, 64, 65). Weiterhin wird eine antimikrobielle sowie antitumorale Wirkung der M1-Makrophagen beschrieben (59, 66).

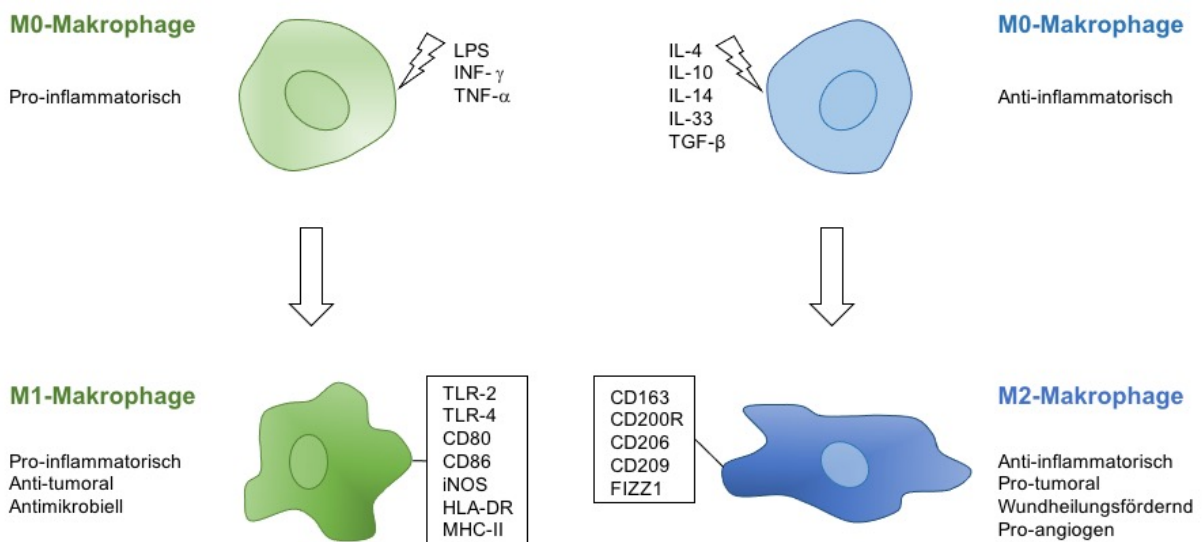
Dem gegenüber steht die Polarisation zu M2-Makrophagen durch die anti-inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10, IL-13, IL-33 und den *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) (2, 63-65). Jedoch sind lediglich IL-4 und IL-13 dazu in der Lage die Aktivierung zu M2-Makrophagen zu induzieren (59). Andere beteiligte Zytokine verstärken diesen Effekt (67). Typische Oberflächenmoleküle, anhand derer M2-Makrophagen charakterisiert werden können, sind CD163, CD200-Rezeptor (CD200R), CD206, CD209 und *Found In Inflammatory Zones 1* (FIZZ1) (59, 68). M2-Makrophagen sind über die Hochregulation und Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie IL-10, TGF- $\beta$ , CCL1, CCL17, CCL18, CCL22 sowie CCL24, in der Lage, eine Aktivierung weiterer Makrophagen zu M2-Makrophagen zu bewirken (64, 69). Zudem kann dadurch ihre anti-inflammatorische und immunregulatorische Funktion sowie deren Beteiligung an der Geweberegeneration erklärt werden (8, 70, 71). Speziell M2d-Makrophagen setzen IL-10 sowie VEGF frei und fördern damit die Angiogenese und das Tumorwachstum (72). In der Literatur wird für M2-Makrophagen zudem ein positiver Einfluss auf die Parasitenbekämpfung sowie immunregulatorische Funktionen beschrieben (73).

Durch die Zugabe von *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) können naive M0-Makrophagen zu M1-ähnlichen Makrophagen oder durch Zugabe von *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) zu M2-ähnlichen Makrophagen polarisieren (74). Dabei handelt es sich um Vorstufen zu M1-/M2-Makrophagen, die lediglich einen Bruchteil von deren Eigenschaften besitzen (75).

Ursprünglich wurde die beschriebene Polarisierung für die *in vitro* Beobachtungen an Makrophagen entwickelt (76). *In vivo* konnten jedoch ähnliche Polarisierungsstadien sowohl

unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen beobachtet werden (73). So konnten beispielsweise in verschiedenen Tumortypen vornehmlich M2- oder M2-ähnliche Makrophagen nachgewiesen werden (77). Gleichzeitig ist der Organismus als komplexes System mit vielen verschiedenen Zelltypen und äußeren Einflüssen zu verstehen, die auf die Makrophagen und deren Polarisierung einwirken (73). Daher sind *in vivo* immer sowohl M1- als auch M2-Makrophagen gleichzeitig vorhanden; die Einteilung in strikte Subtypen entspricht damit einer Momentaufnahme in einem weiten Spektrum an funktionellen Phänotypen (73, 78, 79).

Die Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die Polarisierung der Makrophagen zu M1- beziehungsweise M2-Makrophagen. Dargestellt sind die auslösenden Polarisierungsfaktoren, deren Funktionen und die typischen Oberflächenproteine der jeweiligen Makrophagenpopulation. Aus Gründen der Vereinfachung wurde in dieser Darstellung keine Unterteilung der M2-Makrophagen in die bekannten Subpopulationen vorgenommen.



**Abbildung 2: Polarisierung der Makrophagen.**

Dargestellt sind die Polarisierungszustände von Makrophagen mit ihren jeweiligen Funktionen. Die Polarisierungsfaktoren sind mittig neben den M0-Makrophagen dargestellt. Typische ausgebildete Oberflächenproteine der jeweiligen M1-/M2-Makrophagenpopulationen sind neben den Zellen aufgeführt.

Abbildung verändert nach Mohammadi et al. 2019 (79)

## 2.2.2 Bedeutung von Makrophagen für die Wundheilung

Makrophagen spielen eine zentrale Rolle in der Wundheilung, eine Tatsache, die in der Literatur umfassend dokumentiert ist. Ihre Funktion erstreckt sich über verschiedene Phasen der Wundheilung und beeinflusst sowohl die Entzündungsreaktion als auch die

Geweberegeneration. Lucas et al. konnten in einem Mausmodell zeigen, dass die Erschöpfung von Makrophagen in der inflammatorischen Phase der Wundheilung zu einer verminderten Vaskularisation, einer verzögerten Epithelialisierung und einer unzureichenden Granulationsgewebbildung führt (80). Im weiteren Verlauf der Wundheilung resultierte eine Makrophagen-Erschöpfung in schweren Blutungen und einer unreifen Granulationsgewebbildung (80). Diese Ergebnisse werden durch Mirza et al. bestätigt, die ebenfalls eine beeinträchtigte Wundheilung sowie eine verstärkte Entzündungsreaktion nach Makrophagen-Depletion nachweisen konnten (81).

Sowohl residuale Makrophagen als auch dem Knochenmark entstammende Makrophagen sind für die Wundheilung entscheidend (6, 49). Jedoch ist das genaue Ausmaß der Beteiligung dieser beiden Subpopulationen bisher nicht vollständig geklärt (6). Nach der Einleitung der Wundheilung migrieren im Blut zirkulierende Monozyten zeitverzögert in das Wundgebiet, wo sie am siebten Tag ihre maximale Konzentration erreichen (7, 10). Bis zum dritten Tag dominieren M1-Makrophagen die Population (2), während im weiteren Verlauf ein Übergang zu M2-Makrophagen erfolgt, der sowohl durch Umpolarisierung von M1-Makrophagen als auch durch die Differenzierung unpolarisierter Monozyten geschieht (7, 10). Kompromittierte Wundheilungsprozesse, wie bei diabetischen Wunden, zeigen jedoch eine veränderte Dynamik. Hier bleibt der Anteil von M1-Makrophagen über die gesamte Heilungsdauer erhöht, was mit einer chronischen Entzündung assoziiert wird (2, 82). In der frühen Phase der Wundheilung übernehmen Makrophagen mit M1-Phänotyp die Rolle der Neutrophilen als zentrale Mediatoren der Entzündungsreaktion (3).

Neben ihrer Rolle in der Immunantwort tragen Makrophagen maßgeblich zur Angiogenese bei. Sie fördern durch die Produktion von MMPs die Schaffung von Platz für neu entstehendes Gewebe (6, 7). Zusätzlich produzieren sie chemotaktische Faktoren wie TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und VEGF, welche die Migration von Endothelzellen stimulieren (4). Fantin et al. zeigten, dass Makrophagen die Fusion von Gefäßspitzen unterstützen und so die Bildung neuer Gefäßstrukturen fördern (5). Gleichzeitig verhindern sie eine überschießende Vaskularisation, indem sie überflüssige Gefäßstrukturen phagozytieren (43-45).

## **2.3 Extrakorporale Stoßwellentherapie**

### **2.3.1 Physikalische Grundlagen**

Bei Extrakorporalen Stoßwellen handelt es sich um transiente, biphasische Wellen, die sich dreidimensional in einem Raum ausbreiten (19, 83). Sie entstehen durch eine Übertragung von akustischer in mechanische Energie durch die Vibrationen enthaltener Partikel in einem

elastischen Medium. Die hieraus resultierende Wellenfront bedingt durch den positiven Druckanstieg den sogenannten *Shock Effect* (13). Dieser beschreibt eine abwechselnde Dehnung und Kompression eines Mediums (13).

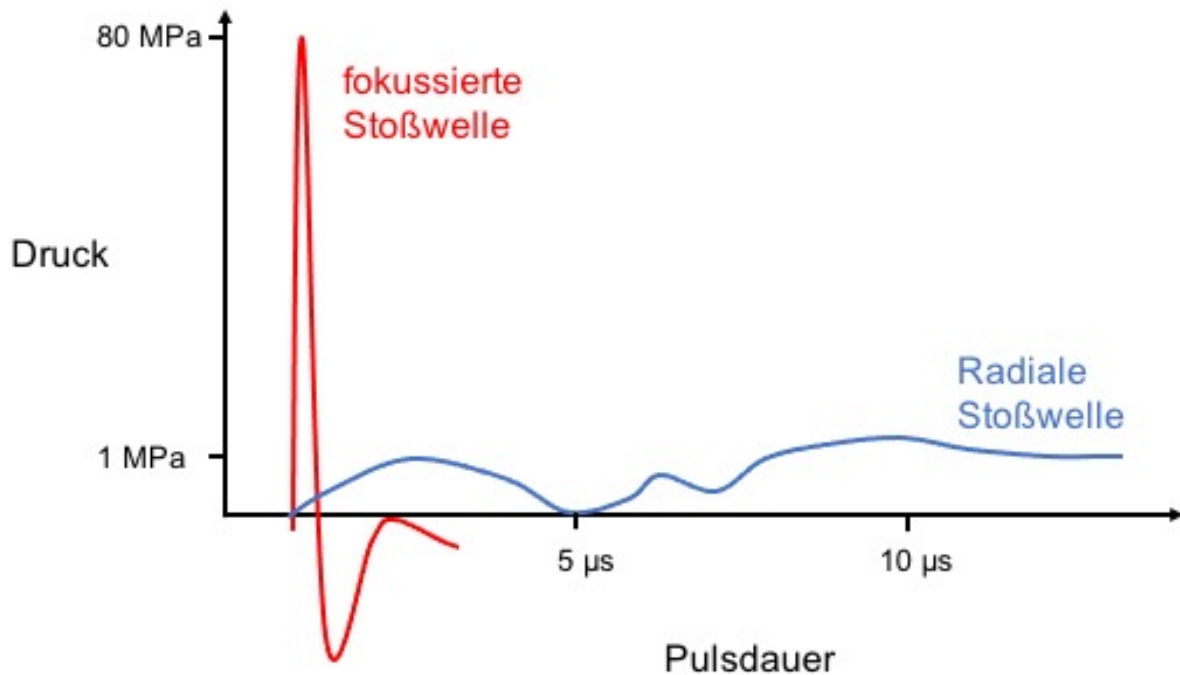
Die durch Stoßwellen entstehenden Druckimpulse können mittels Hydrophonen gemessen werden. Die entstehenden Graphen zeichnen sich durch definierte Charakteristika aus: Es kommt zu einem schnellen positiven Druckanstieg mit einem Druckmaximum von bis zu 80 MPa. Diese positive Phase dauert zwischen 1–100  $\mu\text{s}$  an (13). Anschließend folgt eine längere negative Phase (circa 3  $\mu\text{s}$ ) mit einem Druckabfall bis zu einem negativen Spitzendruck. Dieser hat einen fünf bis zehnfach geringeren Wert als der positive Spitzendruck (19, 83, 84).

Es gibt verschiedene Methoden zur Erzeugung extrakorporaler Stoßwellen. Dabei wird in der Medizin zwischen fokussierter ESWT (fESWT) und radialer ESWT (rESWT) unterschieden.

Die folgenden drei Methoden zur Erzeugung von fokussierten Stoßwellen haben sich etabliert: piezoelektrisch, elektromagnetisch oder elektrohydraulisch. Allen Methoden liegt ein gemeinsames Prinzip zugrunde: Ein Druckimpuls wird durch die Umwandlung von elektrischer in schnelle physikalische Energie generiert und auf einen Fokuspunkt ausgerichtet (83, 85). Dieser dreidimensionale, länglich-ovale Fokus ist je nach Bauart des erzeugenden Gerätes unterschiedlich und für die jeweilige Entstehungsmethode in Form und Größe charakteristisch. Alle drei Methoden sind in der Lage, hochenergetische Stoßwellen zu erzeugen. Der Hauptunterschied besteht in der Beschaffenheit des Fokus bezüglich Form, Größe und Energieflussdichte (EFD) der verschiedenen Stoßwellengeräte (83, 84, 86).

Die rESWT, die in dieser Arbeit Anwendung fand, folgt dem ballistischen Prinzip. Ein Projektil wird durch Druckluft oder elektromagnetische Kräfte beschleunigt und trifft auf einen Applikator auf. Dort gibt das Projektil bei dem Aufprall seine Energie an den Applikator, der auf der Haut des Patienten platziert wird, ab. An dessen Spitze entsteht der Fokus. Von diesem Punkt breitet sich die Druckwelle radiär und nicht-invasiv in das Gewebe aus. Die Energie der Welle ist im Bereich des Fokus am höchsten und nimmt mit zunehmender Entfernung ab. (20, 83, 84, 86).

Stellt man den gemessenen Druck der entstehenden Welle im Verhältnis zu der Pulsdauer in einem Diagramm dar, so zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Graphen der fokussierten und radialen ESWT, wie in Abbildung 3 verdeutlicht. Durch rESWT werden Drücke von bis zu 1 MPa mit Pulsdauern von 1–5  $\mu\text{s}$  erzeugt (86). Verglichen mit fokussierten Stoßwellen sind die erreichten Drücke bis zu hundertmal geringer und die Pulsdauern bis zu tausendmal länger (86).



**Abbildung 3: Graphische Darstellung der fokussierten und radialen Stoßwelle.**

Dargestellt sind beispielhafte Graphen einer fokussierten sowie einer radialen Stoßwelle. Dabei wird der biphasische Charakter der fokussierten Stoßwelle deutlich: Es bildet sich eine positive Phase mit steilem Druckanstieg bis zu einem Druckmaximum von bis zu 80 MPa, welches von einer negativen elongierten Phase mit zehnmal geringerem Druck im Vergleich zur positiven Phase gefolgt wird (19). Der Graph einer radialen Stoßwelle unterscheidet sich davon deutlich; es werden Drücke bis zu 1 MPa und Pulsdauern von 1–5 µs angegeben (86).

Modifiziert nach McClure et al. 2003 (86).

Die akustische Impedanz des Mediums spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung der Stoßwellen und ist damit von entscheidender Bedeutung für dessen Wirksamkeit (13). Die Impedanz beschreibt dabei den Schalleitungswiderstand und ist für jedes Gewebe sowie Medium spezifisch definiert (Tabelle 1) (83). Sie ist direkt proportional zur Dichte des Mediums und indirekt proportional zur Schallgeschwindigkeit.

Stößt eine Stoßwelle auf eine Grenzfläche zweier Medien, beispielsweise Luft und Haut, findet eine Transformation der akustischen Energie in mechanische Energie statt (87). Dabei kommt es auch zur Beugung und Reflexion der Welle (87, 88). Diese Phänomene führen zu einem Energieverlust; es wird nicht die gesamte Energie in das nachfolgende Medium übertragen (87, 88). Derjenige Anteil, der in mechanische Energie transformierten akustischen Energie, wird demnach durch den Auftreffwinkel – damit durch Reflexion, Absorption und Beugung – sowie durch die Größe der Impedanzdifferenz maßgeblich beeinflusst (83). Ein steiler Winkel resultiert dabei in einem hohen Energieverlust durch die physikalischen Wechselwirkungen (86). Weiterhin führt eine geringe Differenz der Impedanz an der Grenzfläche zu einem

niedrigen Verlust der Energie durch Reflektion und Absorption (86). Um diese Differenz in der klinischen Anwendung gering zu halten und damit eine echofreie Übertragung der Stoßwellen auf das Zielgewebe zu ermöglichen, werden diese in einem wässrigen Medium (z. B. Gel) erzeugt (86). Dies sorgt für eine Angleichung der akustischen Eigenschaften an das menschliche Gewebe (83), wodurch weniger Energie an den Grenzflächen verloren geht. Dennoch werden lediglich zehn Prozent der generierten Energie in das Gewebe übertragen (13, 89).

Der geläufigste Parameter zur Beschreibung der Stoßwelle stellt die EFD dar. Sie ist definiert als Energie pro Fläche ( $\text{mm}^2$ ) des Fokuspunktes und wird in  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  angegeben. Dabei werden in der praktischen Anwendung der rESWT EFD-Werte zwischen 0,004 bis 0,8  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  verwendet (13, 88). Weiterhin kann die applizierte Stoßwellenenergie in drei Energieklassen unterteilt werden: niedrig (0–0,1  $\text{mJ}/\text{mm}^2$ ), mittel (0,1–0,3  $\text{mJ}/\text{mm}^2$ ) und hoch (0,3–0,8  $\text{mJ}/\text{mm}^2$ ) (13).

Die akustischen Impedanzen verschiedener Medien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1: Akustische Impedanz verschiedener Medien.**

Nach McClure et al. (86), Ji et al. (90).

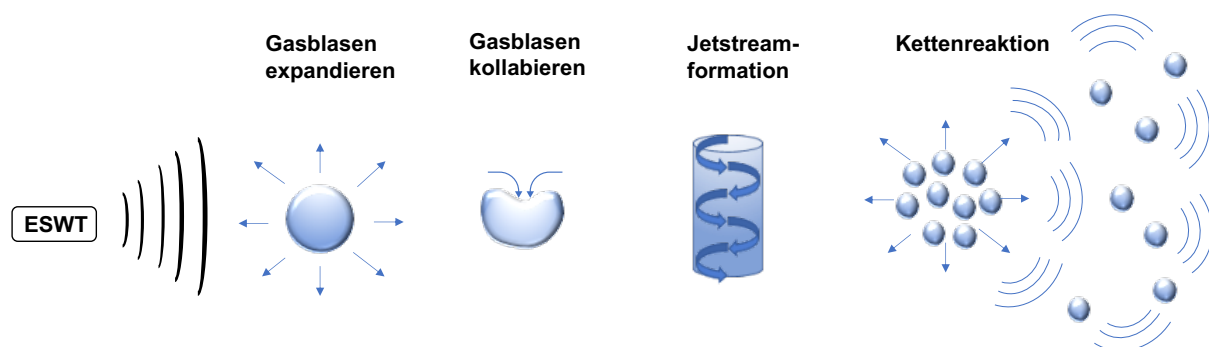
| <b>Medium</b> | <b>Akustische Impedanz [<math>\text{kg}/\text{s} \times \text{m}^2</math>] <math>\times 10^{-6}</math></b> |
|---------------|--|
| Luft          | 0,000429 – 0,000446  |
| Fett          | 1,370  |
| Wasser        | 1,489  |
| Lunge         | 0,260 – 0,464  |
| Muskel        | 1,638 – 1,728  |
| Knochen       | 4,860 – 7,380  |
| Nierenstein   | 7,600 – 14,400   |
| Polystyrol    | 2,340  |

### 2.3.2 Effekte der Stoßwelle auf das Gewebe

Eine visuelle Darstellung der Wirkung von Stoßwellen auf ein biologisches Gewebe ist nur möglich, wenn ein Medium gewählt wird, das unterschiedliche akustische Impedanzen aufweist. Nur so wird an den vorhandenen Grenzflächen akustische in mechanische Energie übertragen (19, 83). Analog hierzu ist die Impedanzdifferenz direkt proportional zur biologischen Wirkung der Stoßwelle (14, 83, 88, 91).

Ein in diesem Zusammenhang beschriebener Wirkmechanismus ist die Induktion von Kavitation (20). Dieser beschreibt die Entstehung von gasgefüllten Blasen im Gewebe infolge des schnellen Druckabfalls während der negativen Phase der Stoßwelle (19). Haben diese eine kritische Größe erreicht, kollabieren und platzen sie, wodurch weitere Schockwellen generiert werden (13). In der Folge entstehen weitere Gasblasen – es kommt zu einer Kettenreaktion (Abbildung 4) (13). Werden die Blasen zu groß, kollabieren diese asymmetrisch. Dadurch entstehen Jetstreams mit einer Strömungsgeschwindigkeit von über 800 m/s (21). Diesen Strömungen wird bei zu hohen Geschwindigkeiten ein lokal destrukturierender Effekt zugeschrieben (92, 93). Kavitation kann jedoch auch durch den positiven Druckanstieg der Stoßwelle verursacht werden (86). Trifft diese auf eine stationäre Gasblase, wird die Gasblasenwand verformt und es kommt zu der Bildung eines Jetstreams in Richtung der Stoßwellenquelle (94). Diese weisen höhere Geschwindigkeiten auf und sind damit destruktiver als die durch kollabierende Gasblasen verursachten Jetstreams (95).

Zudem wird vermutet, dass auf Knochen applizierte Stoßwellen die Bildung freier Radikale sowie eine Membranhyperpolarisation bewirkt, die für den beobachteten biologischen Effekt ursächlich sein sollen (96). Die Bildung von freien Radikalen sowie Sauerstoffradikalen konnten in Tierversuchen ebenfalls nachgewiesen werden (97).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Effekte einer Stoßwelle in Gewebe.**

Die Abbildung zeigt die beteiligten Effekte infolge einer Behandlung von Gewebe mit extrakorporalen Stoßwellen. Die Stoßwelle führt zu Kavitation und dadurch zu der Bildung von Jetstreams; es entsteht eine Kettenreaktion, wodurch weitere Kavitation im Gewebe erzeugt wird (13).

Modifiziert nach Sawicki et al. 2022 (13).

### 2.3.3 Biologische Wirkung

Der positive Effekt der ESWT auf Gewebe wird auf eine verbesserte Geweberegeneration, Angiogenese und Zellproliferation zurückgeführt (14, 25, 98, 99). Wie oben beschrieben, wird dabei die biologische Wirkung durch die Übertragung von physikalischer Energie in eine biologische Reaktion erklärt. Dieser Prozess wird in der Literatur als Mechanotransduktion beschrieben und kann mit einer Kaskade verglichen werden (84, 100). Zunächst werden die Zellen durch die Stoßwelle aktiviert. Dadurch wird die mRNA-Expression in den Zellkernen angeregt, was eine Aktivierung weiterer Organellen der Zelle – wie der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums oder der Zellvesikel – zur Folge hat. Im Anschluss werden spezifische Proteine mit geweberegenerativen Effekten produziert (84). Darunter VEGF und eNOS (101), die eine wichtige Rolle im Rahmen der Angiogenese einnehmen.

In Tierversuchen und klinischen Studien konnte eine verbesserte Angiogenese des Gewebes nach Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen nachgewiesen werden (102-104). Zurückgeführt wird dieser Effekt unter anderem auf eine verbesserte Migration von endothelialen Vorläuferzellen (99, 105). Erklärt wird dies durch eine direkte Hochregulation der Konzentration von *Stromal Cell-Derived Factor-1* (SDF-1) und VEGF sowie durch eine indirekte Erhöhung der beiden Faktoren aufgrund einer zuvor erhöhten Konzentration an HIF-1 $\alpha$  (97, 99, 106). Weiterführend wird in der Literatur der Einfluss der ESWT auf die Angiogenese durch die Aktivierung eines mechanosensorischen Komplexes diskutiert (105). Dieser beinhaltet *Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-2*, *Vascular Endothelial-Cadherin* und *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* und vermittelt die Phosphorylierung von Akt, eNOS und *Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2* (ERK 1/2), die weiterführend zu einer Migration von endothelialen Vorläuferzellen beitragen (101, 105).

Der Prozess der Neovaskularisation ist eng verbunden mit der Anwesenheit von MMPs. Sie sind essentiell für die Zersetzung der Extrazellulärmatrize, um Platz zu schaffen für die Entstehung neuer Gefäßformationen (105). Besonders MMP-9 spielt bei der Angiogenese eine entscheidende Rolle, da es zusätzlich Zytokine wie VEGF aktiviert (107). Ein Anstieg an MMP-9 nach der Behandlung mit ESWT konnte bereits *in ovo* beobachtet werden (14).

Zahlreiche Studien befassen sich mit der Beeinflussung der Wundheilung durch die ESWT. So konnte ein anti-inflammatorischer Effekt nach der Behandlung von Pferden *in vivo* beobachtet werden (108). Auf molekularer Ebene ist dieser Effekt jedoch noch nicht eindeutig erklärbar. Es konnte *in vitro* eine Verminderung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie NF- $\kappa$ B abhängigen Genaktivierung mit der Folge der reduzierten Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, wie iNOS und TNF- $\alpha$ , durch Behandlung mit ESWT nachgewiesen werden (109). Außerdem wurde eine Modulation der Entzündungsreaktion im Gewebe durch eine Stimulation

des TLR3 Signalwegs (110) sowie eine herunterregulierte Leukozyteninfiltration nach Behandlung mit ESWT beschrieben (111). Eine Aktivierung von ruhenden Makrophagen konnte zwar nicht nachgewiesen werden, jedoch konnten Sukubo et al. *in vitro* die Verminderung der pro-inflammatorischen Charakteristika von M1-Makrophagen sowie die Unterstützung der anti-inflammatorischen Charakteristika von M2-Makrophagen durch die Behandlung einer Zellkultur mit ESWT beobachten (24). Dies legt die Möglichkeit einer Modulation der makrophagenassoziierten Immunantwort durch die Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen nahe.

### 2.3.4 Problemstellungen im Versuchsaufbau

Um die molekularen Mechanismen der ESWT *in vitro* untersuchen zu können, ist ein Versuchsmodell erforderlich, das die Energieübertragung und die vermuteten Effekte auf zellulärer Ebene möglichst realitätsgetreu abbildet. Herkömmliche Ansätze zeigen in diesem Zusammenhang deutliche Limitationen, wie die bislang einzige vergleichbare Studie von Sukubo et al. verdeutlicht (24).

Sukubo et al. untersuchten die Wirkung der ESWT auf die Polarisierung von M0-beziehungsweise M1-/M2-Makrophagen, wobei unfokussierte Stoßwellen mittels eines elektrohydraulischen Stoßwellenapplikators erzeugt wurden (24). Um Kavitation zu vermeiden, verwendeten die Autoren einen mit entgastem Wasser gefüllten Behälter und richteten die Stoßwellen aus einem Abstand von 5 cm auf eine Zellkulturflasche aus Kunststoff (Polystyrol), die sich im Wasserbad befand und in der die Zellen adhären auf der Oberfläche kultiviert wurden. Eine EFD von 0,1 beziehungsweise 0,03 mJ/mm<sup>2</sup> wurde eingesetzt und die Flaschen vollständig mit Medium gefüllt, um eine Weiterleitung der Stoßwellen durch Luft zu vermeiden. Nach der Behandlung erfolgte die Analyse der M1- und M2-Markergene mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) (24). Die Ergebnisse zeigten, dass die Stoßwellenbehandlung keine Wirkung auf die Aktivierung von M0-Makrophagen hatte (24). Jedoch wurden signifikant erniedrigte Werte von M1-Markergenen (CD80, COX2, CCL5) sowie ein signifikanter Anstieg von M2-Markergenen (ALOX15, MRC1, CCL18) beschrieben (24). Trotz dieser Erkenntnisse weist der beschriebene Versuchsaufbau erhebliche methodische Limitationen auf, die die Validität der Ergebnisse einschränken. Ein zentrales Problem stellt die akustische Impedanz dar: Die Differenz der Impedanzwerte zwischen dem Polystyrol der Zellkulturflasche und dem Wasser beträgt 0,851 (Tabelle 1), was gemäß den physikalischen Eigenschaften von Stoßwellen zu einer maßgeblichen Reflexion und somit einem Verlust der übertragenen Energie an der Grenzfläche führt (90). Dadurch geht ein wesentlicher Teil der Stoßwellenenergie bereits an der Oberfläche verloren, bevor die Zellen erreicht werden.

Ein weiterer methodischer Kritikpunkt liegt in der adhärennten Kultivierung der Zellen auf der Grenzfläche der Zellkulturflasche. Die Effekte der Stoßwellen werden jedoch in einem dreidimensionalen Raum erwartet, wie er in einem Gewebe vorliegt. Da die untersuchten Zellen in solchen Modellen nur zweidimensional verteilt sind, können die Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf den Organismus übertragen werden. Auch Untersuchungen an freischwimmenden Zellen in Suspension führen zu weiteren Einschränkungen: Hier kommt es durch die Stoßwellen lediglich zu einer Bewegung der Zellen im Medium, während zentrale physikalische Phänomene der ESWT wie Kavitation und Flüssigkeitsströme in Interzellularräumen in solchen Modellen nicht nachgebildet werden können.

Zusammenfassend ist die Validität solcher Studien durch die beschriebenen methodischen Limitationen infrage zu stellen. Für eine belastbare Untersuchung der molekularen und zellulären Effekte der ESWT ist daher die Entwicklung eines dreidimensionalen Modells unabdingbar, das die physiologischen Bedingungen des Gewebes besser simuliert und die komplexen Mechanismen der Stoßwellenwirkung realitätsgetreuer abbilden kann.

## **2.4 3D-Modelle in der Zellkultur**

Die Informationen, die aus Untersuchungen an Zellen in zweidimensionaler (2D) Zellkultur gewonnen werden können, sind, wie oben beschrieben, begrenzt. Dahingegen bieten 3D-Zellkulturmodelle die Möglichkeit, die komplexen, dynamischen Abläufe der Zell-Zell Kommunikation und Zell-Zell- beziehungsweise Zell-Matrix-Interaktion untereinander sowie deren Beeinflussung durch äußere Stimuli besser wiederzugeben (112-115). In der Literatur wird Zellen eine Wahrnehmung der sie umgebenden EZM zugeschrieben; abhängig von deren Beschaffenheit können sich die Zellen in ihrer Morphologie, Funktion und Organisation ihres Zytoskeletts an das vorherrschende Mikromilieu anpassen (113, 116). Eine Kommunikation der Zellen mit der EZM kann jedoch in einer 2D-Kultur nicht stattfinden (115). Daher haben Zellen, die in einer solchen Umgebung kultiviert werden, komplexe Vorgänge, wie die Regulation der Transkription, Apoptose, Expression von Rezeptoren oder Zellproliferation an ihre Kultivierungsumgebung angepasst (117-120). Remuzzi et. al beschreiben beispielsweise die morphologische Adaptation von mesenchymalen Stammzellen in unterschiedlichen Kultivierungsformen (121). In einer 2D-Kultur zeigen sich die Zellen spindelförmig, mit einem großen Zellkern und ausgedehntem Zytoplasma, wohingegen in einem 3D-Modell kultivierte mesenchymale Stammzellen als sternförmig mit kleinen, sphärischen Zellkernen beschrieben werden (121).

Zusammenfassend wird angenommen, dass zur Untersuchung der *in vivo* beobachteten Effekte der ESWT *in vitro* ein 3D-Modell einer 2D-Zellkultur vorzuziehen ist.

Verschiedene Methoden der 3D-Zellkultur werden zur Kultivierung von Zellen angewendet. Allgemein können die häufig verwendeten Systeme in zwei Kategorien unterteilt werden: Methoden, basierend auf einem *Scaffold* sowie Methoden ohne die Verwendung eines *Scaffolds*. Ein *Scaffold* bezeichnet dabei ein Trägermaterial, das das 3D-Konstrukt stabilisieren und im Verlauf funktionell unterstützen soll, um das Zellwachstum, den Aufbau der extrazellulären Matrix sowie die Zelldifferenzierung zu fördern (112). Kultivierungsmodelle, die ohne eine mit den Zellen interagierende Matrix auskommen, basieren in der Regel auf der eigenständigen Bildung von Zellaggregaten, die nicht-adhären 3D-Strukturen erzeugen, sogenannte Sphäroide (112, 122, 123). In der Literatur werden für eine solche Anwendung beispielsweise die *Hanging Drop* Methode oder die Verwendung von *Ultra-Low Attachment Coating* Kulturplatten beschrieben (124, 125). Beide Methoden zielen darauf ab, den Kontakt der Zellen mit der Unterlage zu minimieren und so die Ausbildung der Sphäroide zu begünstigen (114). Vor allem in der Tumorforschung finden solche Systeme Anwendung, da sie die Mikroumgebung in einem Tumor präziser als andere Systeme wiedergeben können (112, 114).

Eine Alternative bieten *Scaffold*-basierte 3D-Konstruktionen. Sie ermöglichen den Entwurf komplexer Modelle, die sowohl Interaktionen zwischen den Zellen untereinander als auch zwischen den Zellen und Komponenten der Mikroumgebung, wie löslichen Faktoren, EZM oder Endothelzellen, erlauben (114, 115). Die verwendeten *Scaffolds* können dabei je nach Versuchsanforderung variieren; es finden sowohl synthetische als auch natürliche Materialien Anwendung (112). Konstruktionen auf Basis von Membranen, Gelen oder Schwämmen werden am häufigsten angewendet (126). Die Zellen werden dabei entweder durch Inklusion in die Matrix aufgenommen oder direkt auf das 3D-Konstrukt mittels Pipette oder 3D-Biodrucker aufgebracht (112, 127). Das Aussäen von Zellen findet vor allem auf polymeren harten *Scaffolds*, wie natürlichen Kollagenmembranen oder Hydrogelen Anwendung (112, 115, 128, 129). Ein Vorteil der Verwendung von Kollagen-basierten 3D-Gerüsten besteht in der Möglichkeit, verschiedene Zelltypen in Bi- oder Trikultur zu kultivieren, um sie im Anschluss im Hinblick auf unterschiedliche Fragestellungen hin zu analysieren, wobei die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Matrices aufgebracht werden können (128, 129). Zudem fördert das Kollagen-Netzwerk Zell-Zell-Interaktionen und dessen Verwendung lässt Rückschlüsse auf Interaktionen zwischen den Zellen und der sie umgebenden Matrix zu (112, 114).

Im Gegensatz dazu wird die Aufnahme der Zellen direkt in die 3D-Kulturen durch die Verwendung von Hydrogelen ermöglicht (112, 115). Solche Systeme finden in der Literatur breite Anwendung, wobei sie entweder natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Natürliche Hydrogele bestehen häufig aus Fibrinogen oder Kollagen, wie das in dieser Arbeit

verwendete PureCol<sup>®</sup>, einer Mischung aus Proteinen der EZM, wie beispielsweise Matrigel<sup>®</sup>, Gelatine, Chitosan oder Alginat (112, 114, 130). Sie sind biokompatibel und bioaktiv, wodurch sie einen positiven Einfluss auf die Viabilität und Proliferation der Zellen haben (131, 132). Polymere aus Polylactiden, Polyethylenglykol oder Polyvinylacetat sind hingegen typische Bestandteile synthetischer Hydrogele (130). Allgemein werden Hydrogele als nicht quervernetzte, hydrophile Polymere definiert, die durch kovalente Bindungen, Ionenbindungen und physikalische Kräfte zusammengehalten werden (133-135). Ihr hydrophiler Charakter erlaubt es ihnen, große Mengen an Wasser beziehungsweise Medium aufzunehmen; sie imitieren so die Eigenschaften der EZM von Weichgewebe, erzeugen eine gewebeähnliche Struktur und sorgen für eine dauerhafte Verfügbarkeit von Stimulantien wie Wachstumsfaktoren oder Zytokinen (115, 136). Die Poren der Matrix erlauben zudem die Diffusion durch das Hydrogel, wodurch lösliche Inhaltsstoffe eines Nährmediums den Zellen ebenfalls zur Verfügung stehen (136). Ein weiterer Vorteil der Hydrogele liegt in ihrer Modulierbarkeit. Durch Anpassung der Kollagenkonzentration können die mechanischen Eigenschaften des 3D-Konstrukts präzise an die eigenen Anforderungen angepasst werden (137, 138). Durch die Möglichkeit der biologischen Abbaubarkeit der Hydrogel-Matrix lässt die Methodik eine Analyse der Zellen zu (115).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verwendete Zellen

**Tabelle 2: Primärzellen mit Angabe des Isolationsgewebes**

| <b>Primärzellen</b>                                      | <b>Isolationsgewebe</b>                |
|--|--|
| Makrophagen  | Buffycoat (BC) aus humanem Spenderblut |
| Fibroblasten   | Humane Mundschleimhaut                 |
| <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i><br>(HUVEC) | Venenendothel humaner Nabelschnur      |

##### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.**

| <b>Verbrauchsmaterial</b>  | <b>Hersteller</b>                              |
|--|--|
| <i>Biopsy Punch</i> (6 mm)   | Stiefel Laboratorium, Durham, NC, USA          |
| CELLSTAR® Zellkulturflasche<br>– 25 mm <sup>2</sup><br>– 75 mm <sup>2</sup><br>– 125 mm <sup>2</sup> | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Deckgläschen 24 x 50 mm  | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Desinfektionstücher  | Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland  |

Material und Methoden

|  |  |
|--|--|
| Einmalhandschuhe   | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland               |
| Eppendorf Tube®<br><ul style="list-style-type: none"> <li>– 2 ml</li> <li>– 500 µl</li> <li>– 200 µl</li> </ul>                                | Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland                           |
| Gummiwischer, spatenförmig   | Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland |
| Pipettenspitzen, PIPETMAN® DIAMOND Tips<br><ul style="list-style-type: none"> <li>– 10 µl</li> <li>– 200 µl</li> <li>– 1000 µl</li> </ul>      | Gilson Inc., Middleton, WI, USA                              |
| Röhrchen, Cellstar® Tubes<br><ul style="list-style-type: none"> <li>– 15 ml</li> <li>– 50 ml</li> </ul>  | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich               |
| Rollenpflaster, Leukosilk®   | BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland                       |
| Rundbodenröhrchen für das FACS (5 ml), Corning™ Falcon™  | Corning Inc., Glendale, AZ, USA                              |
| Serologische Pipetten, Cellstar®<br><ul style="list-style-type: none"> <li>– 2 ml</li> <li>– 5 ml</li> <li>– 10 ml</li> <li>– 25 ml</li> </ul> | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich               |
| Silk 2/0 SH-1 Plus Nahtmaterial  | Ethicon, Inc., Raritan, NJ, USA                              |
| Ultraschallbezug, FLEXASOFT®   | Udo Heising GmbH, Putzbrunn, Deutschland                     |
| Ultraschallgel, SONOSID®   | Asid Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland                      |

|   |   |
|---|---|
| Vasofix Braunüle (G18)                                | B. Braun SE, Melsungen, Deutschland             |
| Zellkulturplatte 6 Well, Nunc™ mit UpCell™ Oberfläche | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Zellkulturplatte 6 Well, Cellstar®                    | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich  |
| Zellkulturplatte 12 Well, Cellstar®                   | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich  |
| Zellkulturplatte 96 Well, U-Form, Cellstar®           | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich  |
| Zellkulturschale (145 / 20 mm), Cellstar®             | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich  |

### 3.1.3 Zusätze der Zellkulturmedien

**Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze mit Herstellerangaben.**

| <b>Substanz</b>                                  | <b>Hersteller</b>                                     |
|--|---|
| <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) | Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Endopan 3 <i>Ready-To-Use</i>                    | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland              |
| Fötales Kälberserum (FCS)                        | Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| GlutaMAX™  | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA       |
| Penicillin-Streptomycin (P/S)                    | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                     |

|   |   |
|---|---|
| <i>recombinant human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i> (rh GM-CSF) | ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland       |
| <i>recombinant human Macrophage-Colony Stimulating Factor</i> (rh M-CSF)              | ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland       |
| <i>recombinant human Interferon Gamma</i> (rh INF- $\gamma$ )                         | ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland       |
| <i>recombinant human Interleukin-4</i> (rh IL-4)                                      | R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA       |
| <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium 1x konzentriert             | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| RPMI 1640 Medium 10x konzentriert   | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA               |

### 3.1.4 Antikörper und Farbstoffe

**Tabelle 5: Verwendete Antikörper und Todfarbstoff mit Angabe von Anwendung, Artikelnummer und Hersteller.**

Angewendet wurden die Antikörper in der in der Immun-Fluoreszenzfärbung (IF), in der Durchflusszytomtrie (DZ) und in der immunohistochemischen Färbung (IHC). Die Fluoreszenzmarkierung der für die Durchflusszytomtrie verwendeten Antikörper ist in Klammern angegeben.

| <b>Antikörper</b>  | <b>Anwendung</b> | <b>Artikelnummer</b> | <b>Hersteller</b>              |
|--|------------------|----------------------|--------------------------------|
| Alexa Fluor® 647 <i>Anti-Human CD31 Antibody, Clone WM59, Monoclonal Mouse</i> | IF (1:50)        | 303111               | BioLegend®, San Diego, CA, USA |
| <i>Anti-Human CD45, PerCP</i>  | DZ               | 304026               | BioLegend®, San Diego, CA, USA |

Material und Methoden

|  |               |            |  |
|--|---------------|------------|--|
| <i>Anti-Human CD163, Brilliant Violet 605</i>  | DZ            | 333616     | BioLegend®,<br>San Diego, CA,<br>USA                     |
| <i>Anti-Human CD200R, PE/Cyanine7</i>  | DZ            | 329312     | BioLegend®,<br>San Diego, CA,<br>USA                     |
| <i>Anti-Human CD209, FITC</i>  | DZ            | 330104     | BioLegend®,<br>San Diego, CA,<br>USA                     |
| <i>Anti-Tenascin Antibody, Clone BC-24, Monoclonal Mouse</i>   | IHC (1:50000) | T2551      | Sigma-Aldrich,<br>St. Louis, MO,<br>USA                  |
| <i>CD31, Endothelial Cell (Concentrate), Clone JC70A, Monoclonal Mouse</i>   | IHC (1:50)    | M0823      | Dako, Santa<br>Clara, CA, USA                            |
| <i>CD45, Leucocyte Common Antigen, Clones 2B11 + PD7/26, Anti-Human, Monoclonal Mouse</i>                                | IHC (1:50)    | M0701      | Dako, Santa<br>Clara, CA, USA                            |
| <i>F(ab')<sub>2</sub>-Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488, Polyclonal Goat</i> | IF (1:200)    | A-11007    | Thermo Fisher<br>Scientific Inc.,<br>Waltham, MA,<br>USA |
| <i>Monoclonal CD86 (B7-2), PE</i>  | DZ            | 12-0869-42 | Thermo Fisher<br>Scientific Inc.,<br>Waltham, MA,<br>USA |
| <i>SYTOX® Blue Dead Cell Stain</i>   | DZ (450/50-A) | S34857     | Thermo Fisher<br>Scientific Inc.,<br>Waltham, MA,<br>USA |

### 3.1.5 Chemikalien

**Tabelle 6: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.**

| <b>Chemikalie</b>   | <b>Hersteller</b>                                     |
|---|---|
| Ampuwa <sup>®</sup> , Sterilwasser  | Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland |
| Bovines Serumalbumin  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                     |
| Dako REAL <sup>™</sup> <i>Antibody Diluent</i>  | Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA            |
| Dako REAL <sup>™</sup> EnVision <sup>™</sup> <i>Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit / Mouse</i> | Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA            |
| Desinfektionslösung, Terralin <sup>®</sup> Liquid   | Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland         |
| <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS), steril filtriert                                  | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA       |
| Eosin 1 %, wässrig  | Morphisto GmbH, Offenbach, Deutschland                |
| Ethanol 70 %  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland       |
| Ethanol 96 % vergällt mit IPA, MEK und Bitrex reinst  | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland                |
| Ethanol 99,8 % vergällt mit IPA, MEK und Bitrex reinst  | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland                |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)   | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                     |
| Hämalaunlösung sauer nach Mayer   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland       |
| <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (HBSS), steril filtriert   | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA       |
| HEPES <i>solution</i> 1 M   | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                     |

Material und Methoden

|   |   |
|---|---|
| Mikroskopier-Einschlussmittel Hico-Mic                        | Hico, Köln, Deutschland                                   |
| Humanes Immunglobulin, Privigen®                              | CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland                    |
| Kaliumchlorid (KCl)   | Merck, Darmstadt, Deutschland                             |
| Kalziumchlorid Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                         |
| Kollagenase Typ I, steril filtriert,<br>125 U/mg              | Worthington Biochemical Corporation,<br>Lakewood, NJ, USA |
| Kollagenase Typ II, steril filtriert,<br>125 U/mg             | Worthington Biochemical Corporation,<br>Lakewood, NJ, USA |
| Kollagenase Typ CLSII   | Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland                        |
| Kollagen-Lösung, PureCol® 3 mg/ml (bovin)                     | Advanced BioMatrix Inc., Carlsbad, CA, USA                |
| Kollagenmembran, Bio-Gide®                                    | Geistlich, Pharma AG, Wolhusen, Schweiz                   |
| Natriumchlorid (NaCl) p.a.                                    | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,<br>Deutschland        |
| Natriumhydroxid (NaOH), 0,1 M, steril filtriert               | Advanced BioMatrix Inc., Carlsbad, CA, USA                |
| ROTI®Histofix   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,<br>Deutschland        |
| <i>Target Retrieval Solution</i> , pH 9 (10X)                 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland                    |
| Trennlösung, BioColl®<br>(Dichte: 1,077 g/ml)                 | Bio&SELL GmbH, Feucht bei Nürnberg,<br>Deutschland        |
| Triton™ X-100   | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                         |
| Trypanblaulösung (0,4 %)                                      | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                         |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )           | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,<br>Deutschland        |
| Xylene, <i>mixture of isomers</i>                             | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland                    |

|                                  |                                   |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Zelldetachment-Lösung, Accutase® | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
|----------------------------------|-----------------------------------|

### 3.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

**Tabelle 7: Verwendete Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen mit ihren Zusammensetzungen.**

| Zellkulturmedium, Puffer, Lösung                                | Zusammensetzung   |
|---|---|
| Adhärenzlösung  | <ul style="list-style-type: none"> <li>– RPMI 1640</li> <li>– GlutaMAX™ (1 %)</li> </ul>  |
| 1 % BSA-DPBS-Lösung   | <ul style="list-style-type: none"> <li>– 1 % BSA in DPBS</li> </ul>   |
| Differenzierungsmedium M1-ähnliche Makrophagen (M1-ähnliche-DM) | <ul style="list-style-type: none"> <li>– RPMI 1640</li> <li>– GlutaMAX™ (1 %)</li> <li>– humanes Plasma (1 %)</li> <li>– 50 ng/µl rh GM-CSF</li> </ul>                              |
| Differenzierungsmedium M1-Makrophagen (M1-DM)                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>– RPMI 1640</li> <li>– GlutaMAX™ (1 %)</li> <li>– humanes Plasma (1 %)</li> <li>– 50 ng/µl rh GM-CSF</li> <li>– 20 ng/µl rh INF-γ</li> </ul> |
| Differenzierungsmedium M2-Makrophagen (M2-DM)                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>– RPMI 1640</li> <li>– GlutaMAX™ (1 %)</li> <li>– humanes Plasma (1 %)</li> <li>– 50 ng/µl rh M-CSF</li> <li>– 20 ng/µl rh IL-4</li> </ul>   |
| DPBS + EDTA (steril filtriert)                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>– DPBS</li> <li>– 1 mM EDTA</li> </ul>   |
| Fibroblasten-Medium   | <ul style="list-style-type: none"> <li>– DMEM</li> <li>– 10 % FCS</li> </ul>  |

Material und Methoden

|   |  |
|---|--|
|   | <ul style="list-style-type: none"> <li>– 1 % P/S</li> </ul>  |
| <p><i>Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)</i><br/>-Puffer (FP)</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>– DPBS</li> <li>– 1 mM EDTA</li> <li>– Humanes Albumin (0,5 %)</li> <li>– 10 µg/ml Privigen®</li> </ul>   |
| HUVEC-Medium  | <ul style="list-style-type: none"> <li>– Endopan 3 <i>Ready-To-Use</i></li> </ul>  |
| Kollagengel-Ansatz  | <ul style="list-style-type: none"> <li>– 4000 µl PureCol®</li> <li>– 500 µl RPMI 1640 (10x konzentriert)</li> <li>– 1070 µl NaOH</li> <li>– 50 ng/µl rh GM-CSF</li> </ul>  |
| Kollagengel-Ansatz Positivkontrolle                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>– 4000 µl PureCol®</li> <li>– 500 µl RPMI 1640 (10x konzentriert)</li> <li>– 1070 µl NaOH</li> <li>– 50 ng/µl rh M-CSF</li> <li>– 20 ng/µl rh IL-4</li> </ul>   |
| Kollagenase II-Lösung   | <ul style="list-style-type: none"> <li>– 1 µg Kollagenase Typ CLSII in 1 ml Kollagenase II-Puffer</li> </ul>   |
| Kollagenase II-Puffer   | <ul style="list-style-type: none"> <li>– 3,9 g NaCL</li> <li>– 0,5 g KCl</li> <li>– 2,4 g HEPES (1M)</li> <li>– 0,7 g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O</li> <li>– pH 7,2 einstellen und auf 1 L mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) auffüllen</li> </ul> |
| Kollagenase Typ I-Lösung  | <ul style="list-style-type: none"> <li>– 100 mg Kollagenase Typ I, 125 U/mg</li> <li>– 10 ml HBSS</li> </ul>   |
| Kollagenase Typ II-Lösung   | <ul style="list-style-type: none"> <li>– 100 mg Kollagenase Typ II, 125 U/mg</li> <li>– 10 ml HBSS</li> </ul>  |

|   |  |
|---|--|
| Kollagen-Verdauungslösung   | <ul style="list-style-type: none"> <li>– 1 ml Kollagenase Typ I-Lösung</li> <li>– 1 ml Kollagenase Typ II-Lösung</li> <li>– 8 ml DPBS</li> </ul> |
| Waschlösung für <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (PBMCs) | <ul style="list-style-type: none"> <li>– 500 ml DPBS</li> <li>– 1 ml 0,5 M EDTA</li> </ul>   |

### 3.1.7 Gebrauchsgegenstände und Geräte

**Tabelle 8: Verwendete Gebrauchsgegenstände und Geräte mit Herstellerangabe.**

| Gerät                                    | Hersteller  |
|--|---|
| Autoklav, Varioclav Classic 3000 EP-Z RL | HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland                |
| Chirurgische Schere                      | Pluradent GmbH & Co.KG, Frankfurt am Main, Deutschland              |
| Dampfgarer                               | Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland                              |
| Durchflusszytometer, BD FACSCanto™ II    | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA              |
| Eismaschine                              | Interkontinentale ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland |
| Elektronische Pipette, Accu-Jet® pro     | Brand GmbH + Co.KG, Wertheim, Deutschland                           |
| Feuchtkammer                             | Eigene Anfertigung  |
| Fettstift                                | Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA                          |
| Fluoreszenzmikroskop TCS SP8             | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland                       |

Material und Methoden

|   |  |
|---|--|
| Gefrierschrank (-20 °C)   | Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland |
| Inkubator, Heraeus BB16   | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland            |
| Kühlschrank (4 °C)  | Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland |
| Laborflasche, Duran®  | Schott AG, Mainz, Deutschland                      |
| Mikroliterpipette PIPETMAN®<br><ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,5 – 10 µl</li> <li>- 2 – 20 µl</li> <li>- 20 – 200 µl</li> <li>- 100 – 1000 µl</li> </ul> | Gilson Inc., Madison, WI, USA                      |
| Mikroskop, Leica DM2000   | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland      |
| Mikroskop, Leica DMI1   | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland      |
| Mikroskopkamera, Leica Flexcam C1   | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland      |
| Mini-Zentrifuge, Spectrafuge™   | Labnet International Inc., NC, USA                 |
| pH-Meter CG 840   | Schott AG, Mainz, Deutschland                      |
| Schlittenmikrotom SM200R  | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland      |
| Schüttler VF2   | IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland        |
| Sicherheitswerkbank, Heraeus HS 12  | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland            |
| Stativ, Jenway™   | Cole-Parmer Instrument Company Ltd, St. Neots, UK  |

|  |   |
|--|---|
| Stoßwellengerät, Swiss DolorClast® Classic | EMS, Nyon, Schweiz                              |
| Thermoschüttler pro                        | Cellmedia, Zeitz, Deutschland                   |
| Wasserbad, beheizbar                       | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland  |
| Zählkammer, Neubauer-Improved              | Laboroptik Ltd., Lancing, UK                    |
| Zentrifuge, Megafuge™ 16                   | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Zentrifuge, Megafuge™ 16R                  | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |

### 3.1.8 Software

**Tabelle 9: Verwendete Software mit Angabe der Version.**

| <b>Software</b>      | <b>Version</b>    |
|----------------------|-------------------|
| BD FACSDiva          | 8.0.1             |
| ImageJ               | 2.0.0-rc-59/1.51n |
| Leica Flexcam C1     | 1.12a             |
| Microsoft PowerPoint | 16.43             |
| Microsoft Word       | 16.43             |
| SPSS                 | 27                |

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Steriles Arbeiten**

Während der Laborarbeit wurden Einmalhandschuhe getragen. Die Durchführung aller Versuchsbestandteile mit lebenden Zellen erfolgte in einem sterilen Umfeld unter der Sicherheitswerkbank. Dabei wurden alle verwendeten Materialien, die mit den Zellen in Berührung getreten sind, erst innerhalb der Sicherheitswerkbank aus ihren sterilen Verpackungen entnommen. Unsterile Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert mit Ausnahme des Gummiwischers, dessen Reinigung vor der Verwendung in 70 %igem Ethanol für 5 Minuten stattfand. Alle Gegenstände, die keinen direkten Kontakt mit den lebenden Zellen hatten, wie Halterungen und die Gefäße von Zellkulturmedien oder -zusätzen, wurden vor der Benutzung unter der Sicherheitswerkbank mit einem in Terralin<sup>®</sup> getränkten Tuch von außen desinfiziert.

### **3.2.2 Isolation der Primärzellen**

Die Isolation der Primärzellen erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und wurde anonym ohne die Aufzeichnung patientenbezogener Daten durchgeführt. Genehmigt wurde dies durch die örtliche Ethikkommission für die Isolation der Fibroblasten und HUVEC (Landesärztekammer Rheinland-Pfalz, Nr. 2021-15794\_1) sowie für die Isolation der PBMCs (Landesärztekammer Rheinland-Pfalz, Nr. 2021-16270).

#### **3.2.2.1 Isolation HUVECs**

Mittels Kollagenase II-Lösung (Tabelle 7) erfolgte die Isolation der HUVECs aus dem Venenendothel einer Nabelschnurspende. Jeweils 10 ml der Kollagenase II-Lösung wurde über eine Braunüle in die zuvor mit seidenem Nahtmaterial abgeschnürte Nabelschnurvene eingebracht und bei 37 °C für 12 Minuten in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenase II-Lösung in ein Röhrchen überführt und die Nabelschnurvene zweimal mit 20 ml DPBS gespült, wobei die Spül-Lösung ebenfalls in das Röhrchen gegeben wurde. Danach erfolgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 900 *Revolutions Per Minute* (rpm) und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml HUVEC-Medium (Tabelle 7) resuspendiert. Nach der Überführung der Suspension in eine 25 mm<sup>2</sup> Zellkulturflasche erfolgte die Inkubation in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Am nächsten Tag wurden die Zellen mittels DPBS einmal gespült und 5 ml HUVEC-Medium hinzugegeben. Nach drei Tagen oder 90 %iger Konfluenz der Zellen unter dem Lichtmikroskop wurden diese mit Accutase<sup>®</sup> für 5 Minuten in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit gelöst und in

eine große Zellkulturflasche überführt. Es erfolgte ein regelmäßiger Wechsel des Mediums alle 48 bis 72 Stunden.

Erreichte die Konfluenz der HUVECs in der Zellkulturflasche unter dem Lichtmikroskop 90 %, wurden sie mit Accutase® für 5 Minuten in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit gelöst. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 900 rpm und Raumtemperatur.

### **3.2.2.2 Isolation Fibroblasten**

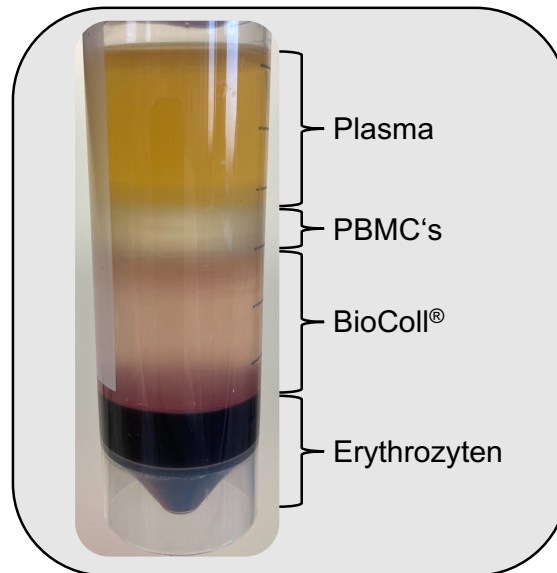
Zu Beginn der Isolation der Fibroblasten aus oraler Schleimhaut wurde das Spendergewebe zweimal in 70 %iger Ethanol-Lösung desinfiziert und anschließend dreimal mit DPBS gespült. In der Folge wurde das Epithel der Proben mit Hilfe eines Skalpells von dem restlichen Gewebe getrennt und in 2 mm große Teile geschnitten. Je vier dieser Teilstücke wurden in ein Well einer 6 Well Zellkulturplatte gegeben und für 15 Minuten in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluss wurde zu jedem Well 1,5 ml Fibroblasten-Medium hinzugegeben. Die Zellkulturplatte wurde so lange in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, bis eine 90 %ige Konfluenz unter dem Lichtmikroskop erreicht war; ein Wechsel des Mediums fand alle 48 Stunden statt. Daraufhin wurden die Gewebeteilstücke entfernt, die Zellen einmalig mit DPBS gewaschen und anschließend mit Accutase® für 5 Minuten in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit gelöst. Die Zellsuspensionen eines Spenders wurden in einem Röhrchen zusammengeführt und für 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml Fibroblasten-Medium resuspendiert und in eine große Zellkulturflasche überführt, die in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubierte. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 48 bis 72 Stunden. Die Passagierung der Zellen fand bei Erreichen einer Konfluenz von 90 % statt.

### **3.2.2.3 Isolation primärer mononukleärer Zellen**

Die PBMCs wurden aus einem BC von Spenderblut isoliert. Bei einem BC handelt es sich um ein Nebenprodukt der Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentratherstellung, das vorwiegend Leukozyten enthält. An dem jeweiligen Vortag der Versuchsdurchführung wurde der BC durch die Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz aus 460 ml humanem Spenderblut isoliert und bei Raumtemperatur gelagert. Er umfasste ein durchschnittliches Volumen von 55 – 65 ml.

Die Isolation der PBMCs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dafür wurden zunächst jeweils 15 ml der BioColl® Trennlösung in drei 50 ml Röhrchen gegeben; und anschließend 20 ml Spenderblut langsam zu der Trennlösung pipettiert, ohne dass sich die

beiden Medien vermischen. Die Zentrifugation erfolgte für 30 Minuten bei 21 °C, 800 x g und ohne Bremse. Durch die Zentrifugation entstanden im Röhrchen 4 Schichten: die oberste Schicht bestand aus Plasma, darunter befand sich eine weißliche, aus PBMCs bestehende, Schicht. Unterhalb dieser folgte die Schicht der Trennlösung. Basal kamen die Erythrozyten zu liegen (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Buffycoat nach Dichtegradientenzentrifugation.**

Die Abbildung zeigt den Buffycoat in einem 50 ml Röhrchen nach der Dichtegradientenzentrifugation. Dargestellt sind die voneinander abgegrenzten Schichten. Von oben nach unten zu sehen sind: das Plasma, die Schicht mit den PBMCs, die BioColl® Trennlösung und die Erythrozytenschicht.

Mit einer 5 ml Pipette erfolgten anschließend die Entnahme der PBMC-Schicht und die Überführung in eine zuvor angesetzte, gekühlte (4 °C) Waschlösung für PBMCs (Tabelle 7). Danach wurden die Röhrchen für 6 Minuten bei 400 x g, 6 °C zentrifugiert. Unter Erhalt des noch nicht vollständig festen Zellpellets wurden 90 Prozent des Überstandes entnommen und das Zellpellet in 50 ml der Waschlösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Entnahme des Überstands folgte die Resuspendierung der pelletierten Zellen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis das Zellpellet fest und der Überstand nach Zentrifugation vollständig klar war. Danach wurde der Überstand vollständig entfernt und die Zellen in 40 ml Waschlösung resuspendiert.

Abschließend erfolgte, unter Verdünnung in einem Verhältnis von 1:20 der Zellsuspension zu 0,4 %iger Trypanblaulösung, die Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Leica DM2000-Mikroskop. Der Farbstoff dringt hierbei in tote Zellen ein und färbt diese blau. Daher wurden nur die nicht angefärbten Zellen in mindestens zwei gegenüberliegenden Quadranten gezählt. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Summe gezählter Zellen}}{\text{Anzahl gezählter Quadrate}} \times \text{Verdünnung (20)} \times \text{Volumen (40 ml)} \times \text{Kammerkonstante (10.000)} \quad (1)$$

Durchschnittlich wurden dabei 400.000.000 PBMCs gezählt.

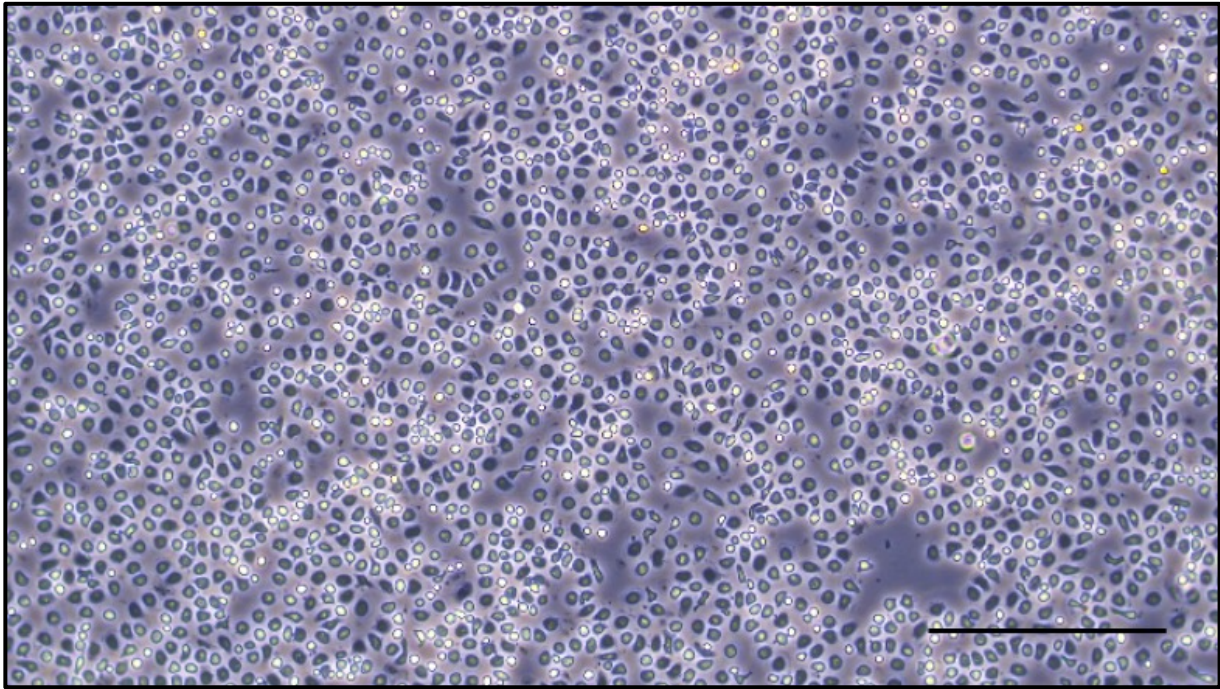
#### **3.2.2.4 Plasmaaufbereitung**

Jeweils 5 ml aus drei 50 ml Röhren des nach der Dichtegradientenzentrifugation (3.2.2.3) oben aufschwimmenden Plasmas wurden in ein 15 ml-Röhren überführt. Dieses wurde zwecks Hitzeinaktivierung der enthaltenen Proteine in einem Wasserbad bei 56 °C über eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation des Plasmas über 10 Minuten bei 1000 x g und 6 °C; der Überstand wurde abgezogen und in ein neues 15 ml-Röhren überführt. Das gewonnene Plasma diente als Zusatz zu dem Zellkulturmedium (Tabelle 7).

#### **3.2.2.5 Adhärenzen der Monozyten**

Zunächst wurde eine Adhärenzlösung (Tabelle 7) angesetzt. Hierzu wurde RPMI 1640 Medium in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt und anschließend 1 % GlutaMAX™ hinzugegeben. In einem CO<sub>2</sub>-Inkubator erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit die Inkubation des Mediums bis zum Gebrauch.

Aus der unter 3.2.2.3 gezählten Gesamtzellzahl wurde die für die weitere Kultivierung benötigte Menge an Zellsuspension errechnet und daraufhin in ein neues 50 ml-Röhren überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 6 Minuten bei 400 x g bei 6 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in der entsprechenden Menge Adhärenzlösung resuspendiert. Zum Adhärenzen der Zellen erfolgte die Aussaat auf eine Zellkulturschale. Dazu wurden mindestens 200.000.000 Zellen in 25 ml Medium resuspendiert und auf die Zellkulturschale überführt. Maximal fand eine Aussaat der gesamten PBMCs eines Spenders auf zwei Zellkulturschalen statt, sodass keine Zellen verworfen wurden. Daraufhin erfolgte die Inkubation für 40 Minuten in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Während dieser Zeit adhärenzten vornehmlich Monozyten auf der Zellkulturschale. Die übrigen nicht adhärenzten PBMCs wurden durch 5-faches, vorsichtiges, kreisförmiges Spülen mit der Adhärenzlösung und anschließenden Entnahme der Lösung entfernt. Daraufhin erfolgte die Gabe von 12,5 ml des auf 37 °C erwärmtem RPMI 1640 Mediums auf die Zellkulturschale und diese wurde erneut 5 Mal gespült. Dieser Schritt wiederholte sich so oft, bis optisch mehr adhärenzte Monozyten als übrige PMBCs unter dem Leica DMI1-Mikroskop zu erkennen waren (Abbildung 6).



**Abbildung 6: PBMCs nach Adhärenz der Monozyten auf einer gewaschenen Zellkulturschale.**

Dargestellt sind PBMCs nach 40-minütiger Adhärenz der Monozyten auf einer anschließend mit RPMI 1640 gewaschenen Zellkulturschale. Die dunklen Zellen stellen adhärenente Monozyten dar, wohingegen die übrigen PBMCs als helle, runde Zellen zu erkennen sind. Die Aufnahme erfolgte mit einer 10-fachen Vergrößerung. Der abgebildete Referenzbalken entspricht einer Länge von 200  $\mu\text{m}$ .

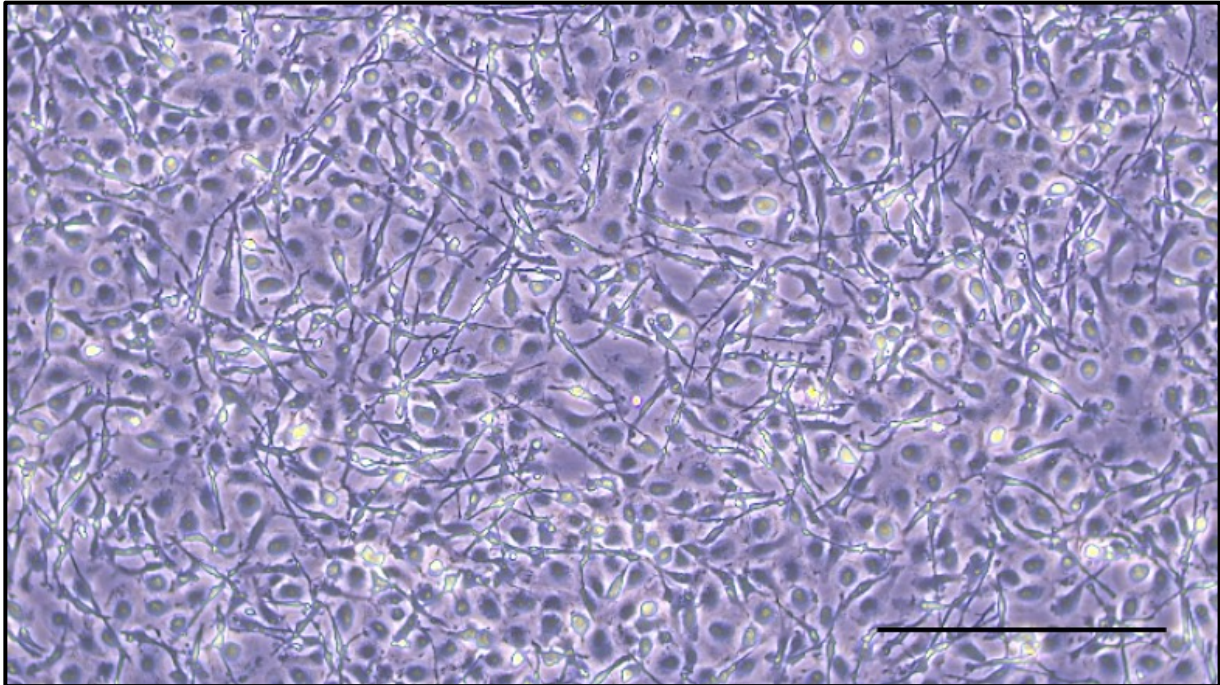
Anschließend wurde das RPMI 1640 Medium wieder entnommen. Die Differenzierung zu M1-ähnlichen Makrophagen erfolgte durch Zugabe von GM-CSF in das Differenzierungsmedium für M1-ähnliche Makrophagen (M1-ähnliche-DM, Tabelle 7). Davon wurden jeweils 35 ml in eine Zellkulturschale gegeben und folgend in einem  $\text{CO}_2$ -Inkubator bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit für 5 Tage inkubiert.

### **3.2.2.6 Differenzierung der M1-ähnlichen Makrophagen zu M1-Makrophagen**

Nach 5 Tagen der Inkubation erfolgte der Wechsel des Zellkulturmediums (Abbildung 8). Dafür wurde das Differenzierungsmedium für M1-ähnliche Makrophagen entnommen und gleichzeitig das Differenzierungsmedium für M1-Makrophagen wie in Tabelle 7 dargestellt angesetzt. Anschließend erfolgte die Pipettierung von jeweils 25 ml des Mediums in die Zellkulturschalen, welche daraufhin in einen  $\text{CO}_2$ -Inkubator überführt und bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit für 24 Stunden inkubiert wurden.

### 3.2.2.7 Entnahme der Makrophagen

Nach einer Gesamtinkubationszeit von 6 Tagen wurden die Zellkulturschalen (Abbildung 7) vorsichtig mittels einer 5 ml Pipette gespült und das Medium entnommen.



**Abbildung 7: Auf der Zellkulturschale adhärenente Makrophagen unmittelbar vor der Entnahme.**

Abgebildet sind auf einer Zellkulturplatte mit UpCell™ Oberfläche adhärenente Makrophagen 24 Stunden nach Aussaat. Die Aufnahme erfolgte mit einer 10-fachen Vergrößerung. Der dargestellte Referenzbalken entspricht einer Länge von 200 µm.

Anschließend erfolgte nach Hinzugabe von 20 ml Accutase® je Zellkulturschale die Inkubation über eine Stunde bei 4 °C. Nach Ablauf dieser Zeit wurden jeweils 10 ml RPMI 1640 hinzugegeben und die Zellen mit Hilfe eines spatenförmigen Gummischers vorsichtig von dem Boden der Zellkulturschalen abgelöst. Mit der vorhandenen Zellsuspension erfolgte die mehrfache Spülung der Zellkulturschale. Anschließend wurde die Suspension in ein 50 ml Rörchen überführt. Die Zellkulturschalen erhielten 12,5 ml des auf 4 °C gekühlten RPMI 1640. Danach erfolgte eine Kontrolle auf verbliebene Zellen mit Hilfe des Leica DMI1-Mikroskops. Wurden adhärenente Zellen beobachtet, fand ein weiterer Spülvorgang statt. Dieser Ablauf wurde so lange wiederholt, bis sich keine adhärenenten Zellen mehr auf den Zellkulturschalen befanden. Die Rörchen wurden schließlich mit RPMI 1640 auf 50 ml aufgefüllt und für 6 Minuten bei 400 x g und 6 °C zentrifugiert. Nach Entfernung der Überstände erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 5 ml RPMI 1640.

Die Zellzählung erfolgte mit 10 µl der Zellsuspension unter Hinzugabe von 10 µl Trypanblau-Lösung. Die nicht angefärbten Zellen wurden in mindestens zwei der vier Quadrate einer Neubauer-Zählkammer unter dem Leica DM2000-Mikroskop mit Hilfe folgender Formel gezählt:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Summe gezählter Zellen}}{\text{Anzahl gezählter Quadrate}} \times \text{Verdünnung (2)} \times \text{Volumen (15 ml)} \times \text{Kammerkonstante (10.000)} \quad (2)$$

### 3.2.3 3D-Hautmodell auf Basis einer Kollagenmembran

Für die Besiedlung der Kollagenmembranen wurde eine Konfluenz von 90 % sowohl für die HUVECs als auch für die Fibroblasten angestrebt. War diese gegeben, erfolgte die Ablösung der jeweiligen Zellen mit Hilfe von Accutase® für 5 Minuten in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Jeweils 10 ml HUVEC-Medium wurden anschließend den Zellkulturflaschen hinzugegeben. Nach der Überführung der Zellsuspensionen in Röhrchen wurde die HUVEC-Suspension für 5 Minuten bei 900 rpm und Raumtemperatur und die Fibroblasten-Suspension für 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets in 10 ml HUVEC-Medium resuspendiert. Je 10 µl der entsprechenden Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau-Lösung gemischt und im Anschluss mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe der folgenden Formel gezählt:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Summe gezählter Zellen}}{\text{Anzahl gezählter Quadrate}} \times \text{Verdünnung (2)} \times \text{Volumen (15 ml)} \times \text{Kammerkonstante (10.000)} \quad (3)$$

Es fand eine Auszählung von mindestens zwei gegenüberliegenden Quadraten statt.

#### 3.2.3.1 Besiedlung der Kollagenmatrices

Die Besiedlung der Kollagenmatrices erfolgte in Monokultur mit Makrophagen, in Bi-Kultur mit Fibroblasten und HUVECs und in Tri-Kultur mit Fibroblasten, HUVECs und Makrophagen. Mit Hilfe einer Hautstanze wurde die verwendete Bio-Gide® Kollagenmatrix in runde Teilstücke mit einem Durchmesser von 6 mm zerteilt, für 20 Minuten in HUVEC-Medium hydriert und in eine 96 Well Zellkulturplatte überführt. Die Fibroblasten wurden 24 Stunden vor der Besiedlung auf HUVEC-Medium umgestellt.

Mit folgenden Zellzahlen der drei Primärzellpopulationen wurden die Kollagenmatrices besiedelt:

- Fibroblasten:  $5,6 \times 10^4$
- HUVECs:  $1,2 \times 10^5$
- Makrophagen:  $1,2 \times 10^5$

### **Besiedlung mit Makrophagen in Monokultur**

Um Makrophagen – ohne den Einfluss anderer Zellen – in der Kollagenmatrix nachweisen zu können, erfolgte die Kultivierung auf Kollagenmembranen in Monokultur. Dafür wurden M1-Makrophagen nach der Differenzierung auf Zellkulturschalen geerntet, gezählt (3.2.2.7) und die errechnete Menge an Zellsuspension für 6 Minuten bei  $400 \times g$  und  $6 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Nach anschließender Entfernung des Überstandes, erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets in der entsprechend benötigten Menge an HUVEC-Medium resuspendiert. Jeweils  $200 \mu\text{l}$  der Zellsuspension wurde auf die poröse Seite einer Kollagenmatrix gegeben, die sich in einem Well einer 96-Well Zellkulturplatte befand. Daraufhin folgte die Inkubation der Zellkulturplatte in einem  $\text{CO}_2$ -Inkubator bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$  und  $95 \text{ } \%$  Luftfeuchtigkeit. Zwei Tage nach Besiedlung wurden die Kollagenmembranen mit DPBS gewaschen und anschließend in  $4 \text{ } \%$  ROTI<sup>®</sup>Histofix für 1 Stunde bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  fixiert. Bis zu der folgenden Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wurden die Proben in DPBS bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **Besiedlung mit Bi- / Trikultur**

Die 24 Stunden zuvor auf HUVEC-Medium umgestellten Fibroblasten wurden an Kulturtag 1 in  $200 \mu\text{l}$  HUVEC-Medium auf die poröse Seite einer Kollagenmembran ausgesät. An Kulturtag 2 wurden die Proben in ein anderes Well der 96 Well Zellkulturplatte überführt und anschließend HUVECs in  $200 \mu\text{l}$  HUVEC-Medium auf die poröse Seite der Kollagenmembran gegeben. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Überführung der Kollagenmatrices in eine 12-Well Zellkulturplatte. Je Well wurde  $1 \text{ ml}$  HUVEC-Medium hinzugegeben. Die verwendeten M1-Makrophagen wurden wie oben beschrieben (3.2.2.7) an Kulturtag 20 von ihren Kulturschalen gelöst, gezählt und in HUVEC-Medium resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Überführung von  $200 \mu\text{l}$  der Makrophagen-Zellsuspension auf die poröse Seite der Kollagenmembranen. Die Zellkulturplatten wurden zwischen den Behandlungen in einem  $\text{CO}_2$ -Inkubator bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$  und  $95 \text{ } \%$  Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Wechsel des Mediums fand, gerechnet ab Kulturtag 1, alle 48 Stunden statt.

Die mit einer Tri-Kultur besiedelten Kollagenmatrices wurden an Kulturtag 24 in  $4 \text{ } \%$  ROTI<sup>®</sup>Histofix für 1 Stunde bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  fixiert und bis zur immunhistochemischen Färbung in DPBS bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Für die Kultivierung der Bi-Kultur aus Fibroblasten und HUVECs fand

keine Besiedlung mit Makrophagen statt. Die entsprechenden Kollagenmembranen wurden an Kulturtag 14 beziehungsweise 21 in 4 % ROTI®Histofix für 1 Stunde bei 4 °C fixiert und anschließend in DPBS bei 4 °C gelagert.

### **3.2.4 Histologische Analyse**

Für die HE-Färbung sowie die immunhistochemischen Färbungen wurden die fixierten Kollagenmembranen senkrecht in Paraffin eingebettet und mit einer Schichtstärke von 4 µm transversal geschnitten, sodass sowohl die poröse als auch die okklusive Seite der Membran auf jedem Schnitt erkennbar war. Anschließend erfolgte die Anfärbung konsekutiver Schnitte mit den jeweiligen Farbstoffen. Die Analyse der mikroskopischen Präparate fand unter einem Lichtmikroskop statt.

#### **3.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Einzig die Schnitte der Kollagenmatrices der Versuchsreihe mit Makrophagen in Monokultur wurden mit HE angefärbt. Dafür erfolgte zunächst die Entfernung des Paraffins durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %, 50 %). Anschließend wurden die Schnitte für 20 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und mittels Mayers Hämalaun für 5 Minuten angefärbt. Danach erfolgte eine Spülung unter fließendem Leitungswasser und eine Färbung mit Eosin für 2 Minuten. Nach einer weiteren Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) dehydriert, gefolgt von einer Inkubation in Xylol. Abschließend fand das Eindecken der Schnitte mit Mikroskopier-Einschlussmittel statt.

#### **3.2.4.2 Immunhistochemische Färbung**

Die Schnitte der mit einer Bi-Kultur aus Fibroblasten und HUVECs besiedelten Kollagenmembranen wurden mit einem CD31 sowie zur Untersuchung der Fibroblastenaktivität mit einem Tenascin Antikörper angefärbt. Tenascin, ein von aktiven Fibroblasten sezerniertes Glykoprotein der extrazellulären Matrix (EZM), dient als Indikator für deren Zellaktivität (139). Die Anfärbung der mit einer Tri-Kultur aus Fibroblasten, HUVECs und Makrophagen besiedelten Matrices erfolgte mit einem CD45 Antikörper.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %) gewaschen. Daraufhin erfolgte die Hitzedemaskierung der Proben mittels 1x *High Buffer* (pH 9) in VE-Wasser für 10 Minuten in einem Dampfgarer. Anschließend wurden die Schnitte entnommen und in eine Feuchtkammer überführt. Dort inkubierten sie für 10 Minuten, um die endogene Peroxidase durch eine mit VE-Wasser hergestellte 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zu blockieren. Daran schloss sich eine weitere Spülung

der Schnitte an: zweimal mit VE-Wasser und einmal mit DPBS. Die primären Antikörper (Tabelle 5) wurde mit der *Envision Antibody Solution* verdünnt: CD31 (1:50 verdünnt, Anfärbung der HUVECs), CD45 (1:50 verdünnt, Anfärben der Makrophagen), Tenascin (1:50.000 verdünnt, Nachweis der Fibroblastenaktivität). Die jeweiligen Färbelösungen wurde daraufhin auf die entsprechenden Schnitte gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Am nächsten Morgen wurden die Proben 2 Minuten mit DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Sekundärantikörperfärbung mittels *DAKO REAL ENVISION* (gebrauchsfertig) in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Nach einer erneuten dreimaligen Waschung mit DPBS für je 2 Minuten wurden die Schnitte mit einer DAB-Lösung (DAB 1:50 in DAB-Puffer) in der Feuchtkammer inkubiert bis eine braune Färbung eintrat. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal mit destilliertem Wasser für 2 Minuten gespült. Danach erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mittels Mayers Hämalaun für 10 Minuten. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten unter fließendes Wasser gestellt und danach mit VE-Wasser abgespült. Zuletzt erfolgte eine Dehydrierung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) gefolgt von Xylol sowie dem Eindecken der Schnitte mit Hico-Mic.

### **3.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung**

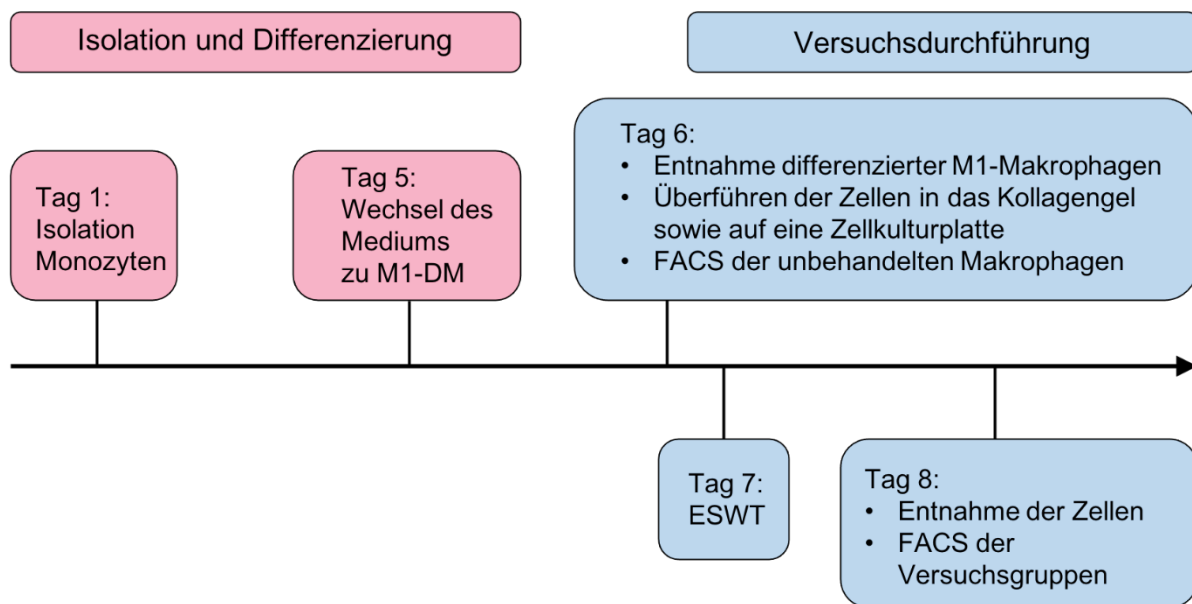
Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die mit einer Bi-Kultur aus Fibroblasten und HUVECs besiedelten Kollagenmatrices an den Kulturtagen 14 und 21 in 4 % ROTI®Histofix fixiert und nachfolgend für 20 Minuten in 0,2 % Triton-X-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte dreimal eine Waschung der Proben mit DPBS für 10 Minuten auf einem Thermoschüttler bei 300 rpm. Für die Inkubation mit dem Primärantikörper fand eine Verdünnung des verwendeten anti-CD31 Antikörpers (*Monoclonal Mouse*) im Verhältnis 1:50 in einer 1 % BSA-DPBS-Lösung statt. Auf jede Membran wurden je 200 µl dieser Antikörper-Lösung gegeben. Die Proben inkubierten zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler und folgend über Nacht auf einem Thermoschüttler bei 4 °C und 300 rpm. Nach 24 Stunden erfolgte eine dreimalige Waschung der Membranen für 10 Minuten mit DPBS. Daraufhin wurde der Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 (*Polyclonal Goat*) in einer 1 % BSA-DPBS-Lösung 1:200 verdünnt und 200 µl dieser Antikörper-Lösung auf je eine Membran gegeben. Nach der anschließenden Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf dem Schüttler erfolgte erneut eine dreimalige Waschung mit DPBS. Die Membranen wurden bis zur Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop dunkel und kühl in DPBS gelagert. Die abschließende Bearbeitung der Aufnahmen fand mit der Software ImageJ statt.

### 3.2.5 3D-Modell auf Basis des Kollagengels

In dem zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Etablierung eines 3D-Modells zur Untersuchung der Wirkung der ESWT auf die Polarisierung der Makrophagen auf Basis eines bovinen Kollagengels. Dafür wurden 4 Vergleichsgruppen definiert:

1. Mit ESWT: von Kulturtag 6 bis 8 in Kollagengel kultivierte Zellen mit einmaliger Applikation von Stoßwellen an Tag 7.
2. Ohne ESWT: von Kulturtag 6 bis 8 in Kollagengel kultivierte Zellen ohne Applikation von Stoßwellen.
3. Positivkontrolle Gel: von Kulturtag 6 bis 8 in Kollagengel kultivierte Zellen unter Zugabe von 20 ng/µl IL-4 zu dem Gel-Ansatz und dem Nährmedium.
4. Positivkontrolle Zellkulturplatte: von Kulturtag 6 bis 8 auf einer 6 Well Zellkulturplatte mit Upcell™ Oberfläche kultivierte Zellen unter Zugabe von 20 ng/µl IL-4 zu dem Nährmedium.

Der zeitliche Ablauf der Versuchsdurchführung ist in Abbildung 8 skizziert.



**Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf des Kollagengel-Versuchsaufbaus.**

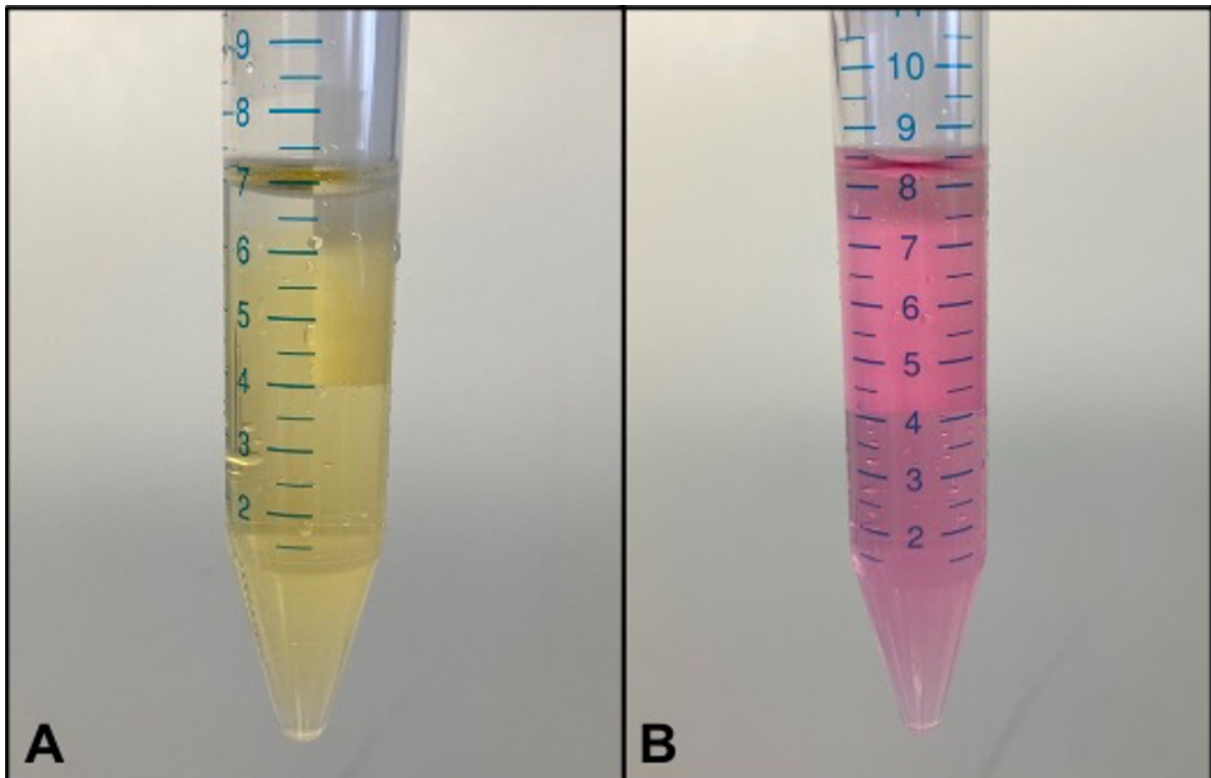
Die Grafik zeigt den zeitlichen Ablauf des Versuchsaufbaus. Dieser wurde in zwei separate Phasen unterteilt: I) die Isolation und Differenzierung der Makrophagen sowie II) die Durchführung des Versuchs selbst. In I) wurden die Monozyten an Tag 1 isoliert und anschließend in Differenzierungsmedium M1-ähnliche Makrophagen kultiviert. An Tag 5 erfolgte die Umstellung des Mediums auf das Differenzierungsmedium M1-Makrophagen. Nach 6 Tagen der Kultivierung wurden die differenzierten M1-Makrophagen von den Zellkulturschalen gelöst und anschließend sowohl suspendiert in dem Kollagengel auf 12-Well Zellkulturplatten als auch auf 6-Well Zellkulturplatten mit UpCell™ Oberfläche ausgesät. Gleichzeitig wurde ein Teil der initial abgelösten unbehandelten M1-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) analysiert. Die Behandlung

mit extrakorporalen Stoßwellen erfolgte an Tag 7. An Tag 8 wurden die Makrophagen von der 6-Well Zellkulturplatte mit UpCell™ Oberfläche gelöst sowie die Zellen aus dem Kollagengel isoliert. Die Versuchssgruppen der so erhaltenen Makrophagen wurden abschließend mittels FACS analysiert.

### 3.2.5.1 Ansetzen des Kollagengels

Verwendet wurde ein bovines Kollagengel, welches in einem unbehandelten Zustand einen pH-Wert von 2,18 und bei einer Temperatur von 4 °C eine niedrige Viskosität aufweist. Bei steigender Temperatur sowie einem pH-Wert von 7,2 bis 7,4 beginnt es sich zu vernetzen. Dabei härtet es bei einer Umgebungstemperatur von ca. 37 °C optimal aus. Daher wurde das Kollagengel bis zu dem gewollten Aushärten auf Eis bearbeitet.

Für den Kollagengel-Ansatz (Tabelle 7) wurden in einem 15 ml Röhrchen 4 ml Kollagenlösung, 500 µl RPMI 1640 (zehnfach konzentriert) sowie 50 ng/ml rh GM-CSF blasenfrei mit einer 1 ml Pipette vermischt. Da sich das Gel bei einem pH-Wert von 7,2 bis 7,4 ideal vernetzt, wurde der zunächst saure pH-Wert von 2,18 durch NaOH (0,1 M, steril filtriert) bis zu einem pH-Wert von 7,34 ausgeglichen. Bei erstmaligem Ansetzen fand diese Analyse unter einem pH-Meter statt. Das Gel zeigte in saurem Milieu eine blassgelbe Farbe und färbte sich unter einem neutralen pH-Wert (7,2–7,4) stark rosa (Abbildung 9). Danach wurde die verwendete Menge an NaOH (1280 µl) notiert und für die weiteren Versuche unter alleiniger Verwendung der optischen Kontrolle der Farbe genutzt.



**Abbildung 9: Kollagengel-Ansatz.**

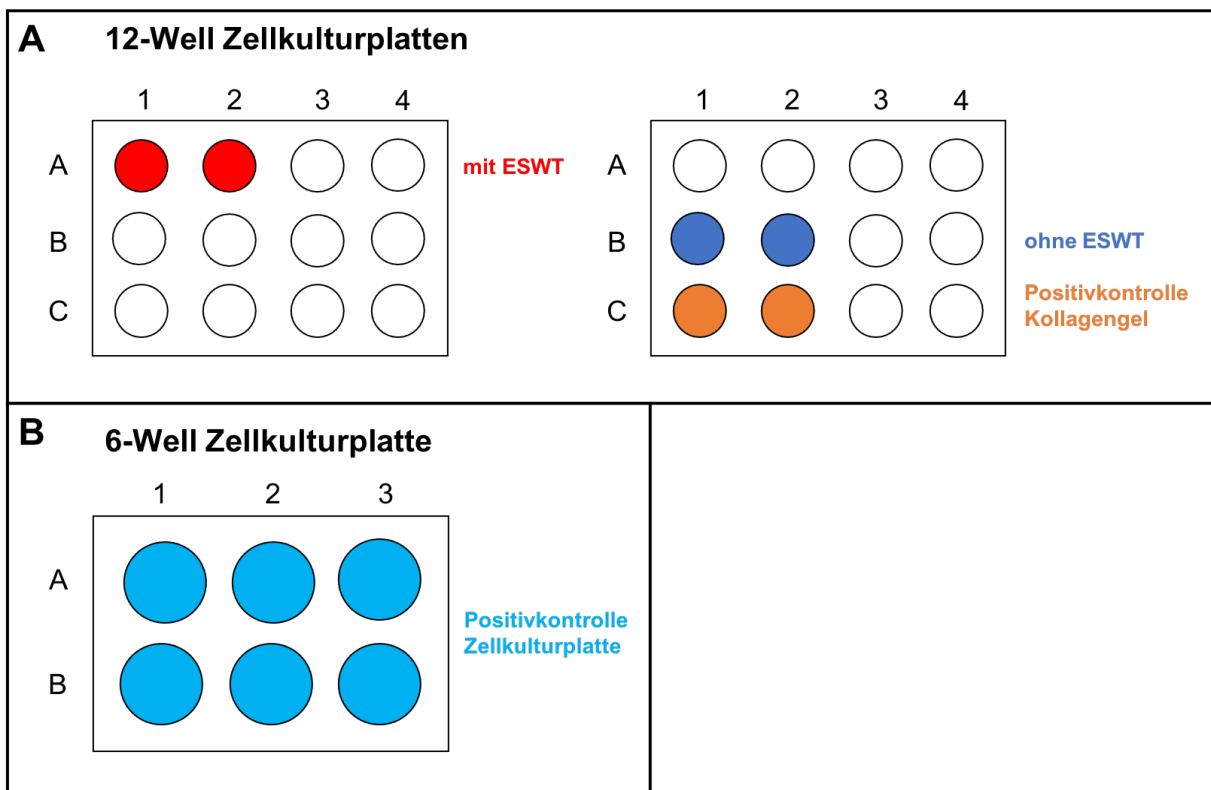
Dargestellt ist der Kollagengel-Ansatz zu zwei Zeitpunkten. (A) Vor der Zugabe des NaOH (0,1 M, steril filtriert) besitzt der Ansatz bei einem pH von 2,18 eine blassgelbe Farbe. (B) Durch Zugabe von 1280 µl NaOH stieg der pH-Wert auf 7,34. Hierbei erfolgte der Farbumschlag zu Rosa.

**Ansetzen des Kollagengels für die Positivkontrollen**

Um zu untersuchen, ob die Makrophagen in dem bovinen Kollagengel in der Lage sind, ihre Polarisierung als Reaktion auf einen adäquaten Stimulus hin zu verändern, wurde sowohl dem Gel-Ansatz als auch dem Nährmedium 20 ng/µl IL-4 hinzugegeben. Im Anschluss sollte der Einfluss des IL-4 auf die Makrophagen mit dem Effekt der ESWT verglichen werden.

Der Kollagengel-Ansatz für die Positivkontrollen wurde wie unter 3.2.5.1 mit der in Tabelle 7 ersichtlichen Zusammensetzung angesetzt.

**3.2.5.2 Überführen der Makrophagen in das Kollagengel**



**Abbildung 10: Belegung der verwendeten Zellkulturplatten.**

Die Abbildung zeigt schematisch die Belegung der drei verwendeten Zellkulturplatten. (A) Zwei 12-Well Zellkulturplatten wurden verwendet. Auf der ersten wurden zwei Wells je 1 ml Kollagengel-Zellsuspension hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Behandlung der Proben mit ESWT (Frequenz von 5 Hz, Intensität von 3 Bar, 500 Impulsen, EFD von 0,12 mJ/mm<sup>2</sup>). Auf der zweiten Zellkulturplatte wurden in vier Wells jeweils 1 ml Kollagengel-Zellsuspension gegeben. Die Wells B1 sowie B2 galten als Negativkontrolle und erhielten keine Therapie. Als Positivkontrolle dienten die Wells C1 und C2, in denen das Kollagengel für Positivkontrollen

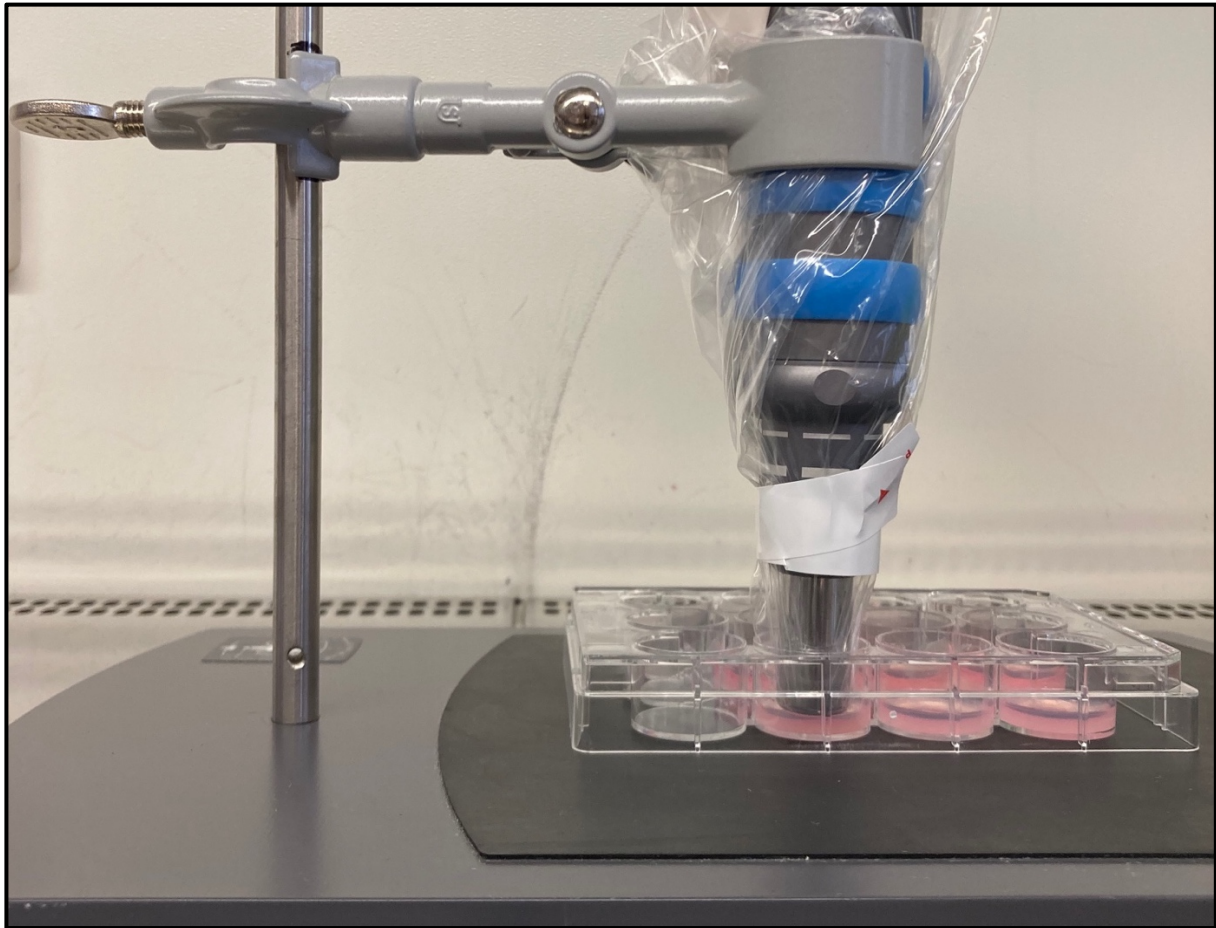
zusammen mit dem M2-DM als Nährmedium verwendet wurde. (B) In den sechs Wells einer 6 Well Zellkulturplatte mit UpCell™ Oberfläche wurden je Well 400.000 Zellen in 2 ml M2-DM kultiviert.

Abbildung 10, A und B zeigen die Aufteilung der jeweiligen Proben auf die entsprechenden Versuchsgruppen. In jedem Well wurde 1 ml Kollagengel-Ansatz mit einer Million darin suspendierten M1-Makrophagen kultiviert (Abbildung 12, A). Die dafür benötigte Menge der Zellsuspension der von der Zellkulturplatte gelösten Makrophagen (3.2.2.7) wurde für 6 Minuten bei 400 x g und 6 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension der pelletierten Zellen in 4 ml des Kollagengel-Ansatzes. Das Zellpellet für die „Positivkontrolle Kollagengel“ wurde mit 2 ml des Kollagengel-Ansatzes resuspendiert und je 1 ml der Zell-Gel-Suspension in ein entsprechendes Well pipettiert. Die übrigen Wells erhielten je 1 ml DPBS. Anschließend erfolgte die Aushärtung des Gels über eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. In Folgendem wurde jeweils 1 ml des M1-ähnlichen-DM auf das Gel der Gruppen A und B appliziert. Die Positivkontrolle erhielt 1 ml des M2-DM.

### **3.2.5.3 Stoßwellentherapie**

Vor der Behandlung wurde das Medium auf dem Kollagengel entnommen. Die Durchführung der ESWT erfolgte mit Hilfe des Swiss DolorClast® Classic Geräts unter einer Sicherheitswerkbank. Zunächst wurde die Spitze des Applikatorkopfes mit Ultraschallgel benetzt. Anschließend erfolgte die sterile Abdeckung von Handstück und Applikatorkopf mit einem sterilen Ultraschallüberzug. Das Handstück wurde schließlich so in das Stativ eingespannt, dass der Applikatorkopf in direkten Kontakt zum Kollagengel kam (Abbildung 11). Dadurch konnten ungewollte Bewegungen während der Versuchsdurchführung vermieden werden. Zudem wurde die Zellkulturplatte auf einer gummierten Unterlage positioniert, die eine Reflektion der Stoßwellen verhinderte (Abbildung 11). Die ESWT wurde mit einer Frequenz von 5 Hz und einer Intensität von 3 Bar in insgesamt 500 Impulsen (EFD von 0,12 mJ/mm<sup>2</sup>) auf das Gel gebracht.

Nach der Behandlung der Versuchsgruppen (Abbildung 10, A) wurde den behandelten Wells jeweils 1 ml M1-ähnliches-DM hinzugegeben und die Kulturplatte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit für 24 Stunden inkubiert.



**Abbildung 11: Durchführung der ESWT.**

Dargestellt ist der Versuchsaufbau zur Applikation der ESWT auf das Kollagengel. Hierzu sind der Applikatorkopf und das Handstück mit einem sterilen Einmalüberzug abgedeckt. Das Handstück wurde so in ein Stativ eingespannt, dass der Applikatorkopf in direkten Kontakt zum Gel trat.

#### **3.2.5.4 Isolation der Makrophagen aus dem Kollagengel**

Um die Makrophagen anschließend analysieren zu können, wurden sie aus dem Kollagengel isoliert. Dies erfolgte mit Hilfe einer angesetzten Lösung aus Kollagenase Typ I und II. Zwecks Reduktion der Zellaktivität fand die Lagerung der Zellen zwischen den Versuchsschritten stets auf Eis statt.

#### **Kollagenase-Lösung**

Für die Kollagenase Typ II-Lösung wurden je 100 mg Kollagenase Typ I (125 U/mg) oder Kollagenase Typ II (125 U/mg) in 10 ml HBSS gelöst, sodass eine Lösung mit 1250 U/ml in 10 ml der jeweiligen Kollagenase entstand. Diese wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **Verdauungslösung**

Die Lösung für das Herauslösen der Makrophagen aus dem Gel bestand aus jeweils 1 ml Kollagenase Typ I-Lösung, 1 ml Kollagenase Typ II-Lösung sowie 8 ml DPBS.

### **Auflösen der Kollagenmatrix**

Das Gel eines Wells wurde mittels Pipette vorsichtig in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit 5 ml DPBS versetzt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C und 300 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig unter Zuhilfenahme einer Pipette verworfen und erneut 5 ml DPBS hinzugegeben. Die Zentrifugation fand unter den gleichen Parametern statt. Daraufhin wurde 1 ml der Verdauungslösung zu dem Gel pipettiert und vorsichtig vermischt. Die Überführung der Suspension erfolgte in sterile 2 ml Eppendorfgefäße, welche in dem folgenden Schritt in einem Thermomixer bei 37 °C und 400 rpm für 40 Minuten inkubierten. Nach jeweils 10, 20 und 30 Minuten wurden die Gefäße per Hand vorsichtig geschwenkt. Anschließend erfolgte der Transfer der Lösung in ein 50 ml Röhrchen, das bei 4 °C und 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Gleich behandelte Proben wurden dabei zusammengeführt. Nach Entfernung des Überstandes wurden die pelletierten Zellen mit 1 ml DPBS resuspendiert und erneut bei 4 °C und 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nun erfolgten die Entfernung des Überstandes und eine Resuspension des Zellpellet in 500 µl FP (Tabelle 7). Die Zellzählung wurde wie in Kapitel 3.2.2.7 beschrieben unter Verwendung von 500 µl Lösung durchgeführt.

### **3.2.6 Kultivieren der Zellen auf einer Zellkulturplatte**

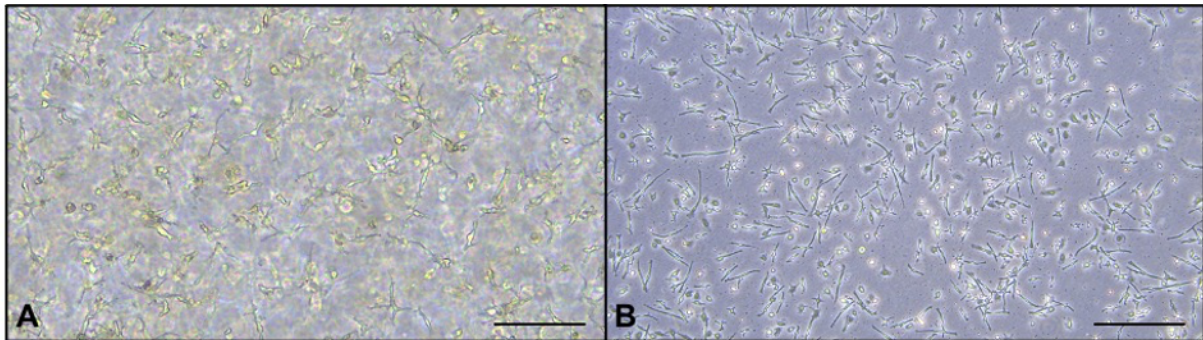
Für die Positivkontrolle wurden die Zellen des jeweils gleichen Spenders nach Isolation und Differenzierung zu M1-Makrophagen auf einer Nunc™ 6 Well Zellkulturplatte mit UpCell™ Oberfläche für zwei Tage unter Hinzugabe von 50 ng/µl M-CSF und 20 ng/µl IL-4 (M2-DM) kultiviert (Abbildung 10, B). Dies sollte die Möglichkeit schaffen, das Potential der Reaktionen der Makrophagen auf die unterschiedlichen Stimuli im Kollagengel mit dem der konventionellen Kultivierung auf Zellkulturplatten zu vergleichen.

Die Zellen wurden unmittelbar nach der Entnahme von der Zellkulturplatte (3.2.2.7) in zuvor auf 37 °C erwärmtes M2-DM resuspendiert. Jedes Well erhielt insgesamt 500.000 Zellen in 2 ml Medium (Abbildung 12, B). Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen über zwei Tage in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

#### **3.2.6.1 Ablösen der Zellen von der Zellkulturplatte**

Nach zweitägiger Inkubation der 6 Well Zellkulturplatte wurde diese für 30 Minuten unter eine Sicherheitsbank gestellt. Der Abfall der Temperatur bedingte eine Veränderung der Struktur der Oberfläche der Zellkulturschale; die Oberfläche erhielt einen hydrophilen Charakter und

nahm Wasser auf. Die enthaltenen Oberflächenmoleküle schwollen an. Es bildete sich eine Trennschicht, weshalb die Makrophagen nicht mehr adhären konnten (140). Durch die anschließende Spülung der Wells mit einer 1 ml Pipette lösten sich die Zellen von der Zellkulturplatte und konnten daraufhin in ein 50 ml Röhrchen überführt werden. Danach wurde je Well 1 ml RPMI 1640 hinzugegeben und die Zellkulturplatte auf Zellrückstände unter dem Leica DMi1-Mikroskop überprüft. Konnten verbliebene Zellen ausgemacht werden, fand eine 5- bis 10-fache Spülung mit dem vorhandenen Medium statt. Danach wurde die Zellsuspension ebenfalls in das Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte eine erneute Kontrolle der Zellkulturplatte auf Zellrückstände und gegebenenfalls eine Wiederholung des Spülvorganges. Das Röhrchen wurde anschließend für 6 Minuten bei 400 x g und 6 °C zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand entfernt; das Zellpellet in 500 µl FP resuspendiert und die Zellen, wie in 3.2.2.7 beschrieben, unter Berücksichtigung des verwendeten Volumens gezählt.

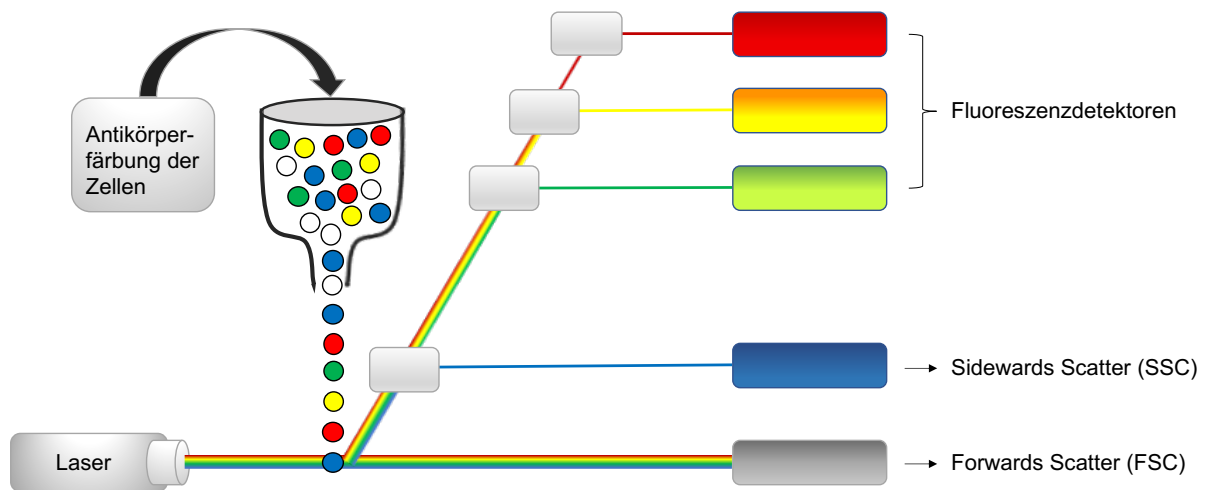


**Abbildung 12: Makrophagen in Zellkultur.**

(A) Die Abbildung zeigt M1-Makrophagen 24 Stunden nach Überführung in das Kollagengel. (B) Dargestellt sind Makrophagen 24 Stunden nach der Aussaat auf eine 6 Well Zellkulturplatte mit UpCell™ Oberfläche. Aufgenommen wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops und einer 10-fachen Vergrößerung. Die dargestellten Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200 µm.

### 3.2.7 Durchflusszytometrie

Die Bestimmung des Differenzierungsstadiums der Makrophagen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS). Hierfür wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper angefärbt und anschließend mit dem FACS Canto™ II Zytometer die Fluoreszenzintensität gemessen. Abbildung 13 zeigt schematisch die Funktionsweise der Durchflusszytometrie:



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Durchflusszytometrie.**

Nach der Färbung der Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper werden sie in Suspension genommen und folgend mittels hydrodynamischer Fokussierung einzeln an verschiedenen Laserstrahlen vorbeigeführt. Das Licht wird an den Zellen gebrochen und kann mittels *Side Scatter* (SSC) und *Forward Scatter* (FSC) detektiert werden. Der SSC misst dabei die Granularität und der FSC die Größe der Zellen. Somit findet die initiale Sortierung der Zellen nach diesen beiden Kriterien statt. Zusätzlich werden die Fluoreszenzsignale der verwendeten Farbstoffe mittels Fluoreszenzdetektoren gemessen. Jeder Farbstoff wird dabei von einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Daher finden verschiedene Laser in einem FACS-Gerät Anwendung. Durch die Kopplung des Farbstoffs an einen spezifischen Antikörper lassen sich Rückschlüsse über die vorhandenen Oberflächenproteine der untersuchten Zellen ziehen; die einzelnen Zellpopulationen können so voneinander getrennt werden.

Modifiziert nach Proserpio et al. 2022 (141).

### 3.2.7.1 FACS-Färbung der Zellen

Zeitgleich mit der Überführung der Makrophagen in das Gel und auf die Zellkulturplatte mit UpCell™ Oberfläche wurden die von der Zellkulturschale entnommenen M1-Makrophagen angefärbt und mittels FACS untersucht. Dazu wurden drei Messungen durchgeführt: eine Negativkontrolle, ein Mix aus den verwendeten Antikörpern und zusätzlich Einzelfärbungen jedes verwendeten Antikörpers (Tabelle 10). Für die Proben der Gelversuche beziehungsweise der Zellkulturplatte wurden einzig eine Negativkontrolle und ein Antikörpermix durchgeführt.

Die aus Zellkultur und dem Gel stammenden Zellen wurden zunächst auf Eis gelagert und anschließend bei 400 x g und 6 °C für 6 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets in FACS-Puffer (FP), sodass die Zellen in einer Konzentration von einer Million Zellen in 1 ml FP vorlagen. Jede FACS-Messung erfolgte im Durchschnitt mit 200.000 Zellen. Aus diesem Grund wurden je Messdurchlauf 200 µl der Zellsuspension in ein Well einer 96 Well Kulturplatte (U-Form) überführt und

anschließend bei 400 x g und 6 °C für 3 Minuten zentrifugiert. Danach erfolgte die Entfernung des Überstandes.

Je nach Messung wurden die Zellen anschließend in einer unterschiedlichen Menge an FP resuspendiert (Tabelle 10). Für die FACS-Analyse wurden jeweils 2,5 µl jedes Antikörpers (CD45, CD86, CD163, CD200-R, CD209) zu den Zellsuspensionen hinzugegeben. In Wells, in denen eine Einzelantikörperfärbung geplant war, wurden lediglich 2,5 µl eines Antikörpers pipettiert (Tabelle 10).

**Tabelle 10: FACS-Färbungen mit Inhalt der Färbelösung.**

| <b>FACS-Färbungen</b>   | <b>Inhalt Färbelösung</b>   |
|-------------------------|---|
| Negativkontrolle        | – 50 µl FP  |
| Antikörpermix           | – 37,5 µl FP<br>– Je 2,5 µl jedes Antikörpers:<br>CD45, CD86, CD163, CD200-R, CD209<br>– 1 µl SYTOX® Blue |
| Einzelantikörperfärbung | – 47,5 µl FP<br>– 2,5 µl eines Antikörpers:<br>CD45, CD86, CD163, CD200-R, CD209                          |

Daraufhin erfolgte die Inkubation für 20 Minuten bei 4 °C. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 400 x g und 6 °C für 3 Minuten nach der Hinzugabe von 150 µl des FP. Der Überstand wurde hiernach erneut entfernt und die pelletierten Zellen in 200 µl FP resuspendiert. Die Suspensionen wurden abschließend in je ein beschriftetes Rundbodenröhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Erst kurz vor der Messung erfolgte die Zugabe von 1 µl SYTOX® Blue zu dem Antikörpermix.

### 3.2.7.2 FACS-Messung

Die Messung fand mit dem FACS Canto™ II Zytometer sowie der Software FACSDiva statt. Aufgrund der Verwendung des Farbstoffs V 605 für den CD 163 Antikörper wurde der 510/550 Filter durch den 610/20 Filter ausgetauscht, um das angeregte Licht detektieren zu können. Weiterhin erfolgte die Homogenisierung jeder Probe vor der Messung auf dem Vortex.

Anschließend fand die Messung der Proben statt, in die jeweils 10.000 Zellen einbezogen wurden.

Mittels FCS und SSC wurden die Zellen bezüglich ihrer Größe und Granularität eingeordnet und das Fenster so eingestellt, dass nur CD45 positive Makrophagen in die weitere Auswertung eingingen. Nur die Zellen, die diese Anforderung erfüllten, wurden weiter analysiert. Mit Hilfe des SYTOX<sup>®</sup> Blue konnten die Zellen in zwei Populationen unterteilt werden: *alive* und *dead*. *Alive* steht dabei für lebende, SYTOX<sup>®</sup> Blue negative Zellen und *dead* für tote, SYTOX<sup>®</sup> Blue positive Zellen.

Um der Inhomogenität der Makrophagenpopulationen der unterschiedlichen Spenderindividuen Rechnung zu tragen, wurden im Rahmen der Messung der Makrophagen nach Ablösen von den Zellkulturschalen für die jeweiligen Zellpopulationen eine eigene Kompensation berechnet. Dies erfolgte mit Hilfe der automatischen Kompensationsfunktion der FACSDiva-Software.

### **3.2.7.3 FACS-Auswertung**

Für die Auswertung wurden einzig CD45 positive sowie SYTOX<sup>®</sup> Blue negative Zellen der *alive*-Populationen berücksichtigt. Dabei wurden die Mediane der detektierten Fluoreszenz der *alive*-Populationen der einzelnen Antikörper (CD86, CD163, CD200-R, CD209) der FACS-Daten ausgewertet.

### **3.2.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software SPSS (Version 27) durchgeführt. Dafür wurden die Daten zuerst auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik überprüft. War diese gegeben wurde je nach Anforderung entweder ein ungepaarter t-Test oder ein einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey Post-Hoc-Test durchgeführt. Lag jedoch keine Varianzhomogenität vor, wurde anstelle eines ungepaarten t-Tests ein Welch-Test angewandt. Ein p-Wert < 0,05 wurde in der gesamten Analyse als statistisch signifikant gewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Histologische Analyse der Bio-Gide® Kollagenmembranen

Die histologische Untersuchung der Bio-Guide® Kollagenmembranen erfolgte in erster Linie zum Nachweis der unterschiedlichen Zelltypen innerhalb der Matrices nach 2, 14, 21 beziehungsweise 24 Tagen der Kultivierung nach Besiedlung, abhängig von der verwendeten Zellkulturzusammensetzung:

#### a. Makrophagen in Monokultur

- Besiedlung auf der porösen Seite der Kollagenmembranen an Kulturtag 1 mit  $1,2 \times 10^5$  Makrophagen,
- Fixierung der Membranen an Kulturtag 3 in 4 % ROTI®Histofix und
- Auswertung durch HE-Färbung.

#### b. Bi-Kultur aus Fibroblasten und HUVECs

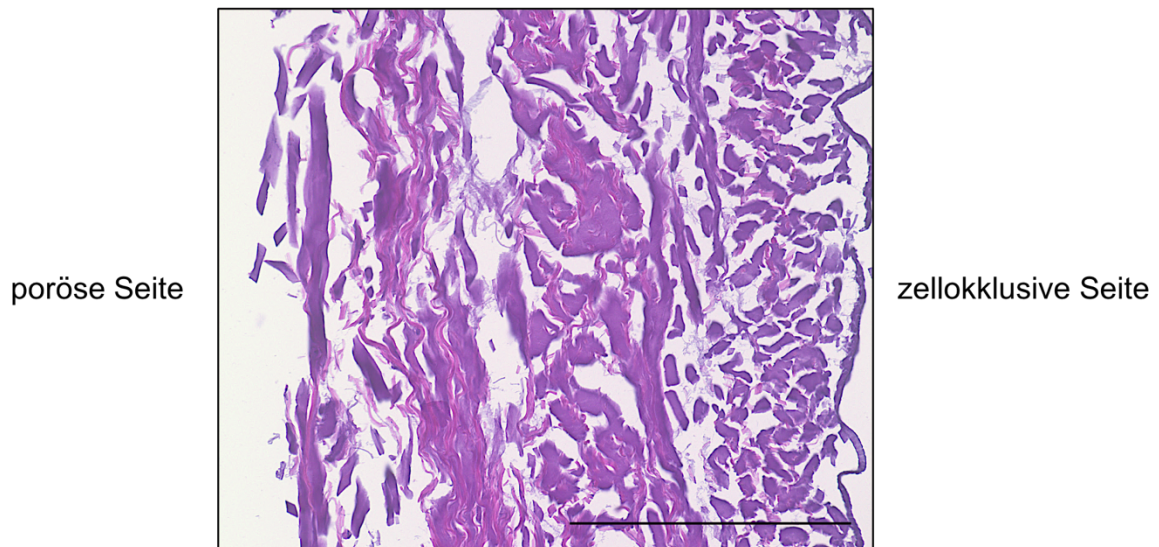
- Besiedlung auf der porösen Seite der Kollagenmembranen an Kulturtag 1 mit  $5,6 \times 10^4$  Fibroblasten und an Kulturtag 2 mit  $1,2 \times 10^5$  HUVECs,
- Fixierung der Membranen an Kulturtag 14 beziehungsweise 21 in 4 % ROTI®Histofix und
- Auswertung durch immunhistochemische Färbungen mit Hilfe der Farbstoffe Tenascin und CD31 sowie durch fluoreszenzmikroskopische Darstellung der HUVECs mittels eines CD31 Fluoreszenzfarbstoffes.

#### c. Tri-Kultur aus Fibroblasten, HUVECs und Makrophagen

- Besiedlung auf der porösen Seite der Kollagenmembranen an Kulturtag 1 mit  $5,6 \times 10^4$  Fibroblasten, an Kulturtag 2 mit  $1,2 \times 10^5$  HUVECs und an Kulturtag 20 mit  $1,2 \times 10^5$  Makrophagen,
- Fixierung der Membranen an Kulturtag 24 in 4 % ROTI®Histofix und
- Auswertung durch immunhistochemische Färbungen mit Hilfe einer CD45 Antikörperfärbung.

#### 4.1.1 Nachweis der Makrophagen in Monokultur

Im Anschluss an die Kultivierung der Makrophagen in Monokultur auf den Kollagenmembranen erfolgte die HE-Färbung, in deren Analyse der histologische Aufbau der Matrix mit den quer und längs angeschnittenen Kollagenfasern zu erkennen ist. Es konnten jedoch weder an der porösen Seite noch zentral in der Matrix Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 14).



**Abbildung 14: HE-Färbung der mit Makrophagen in Mono-Kultur besiedelten Kollagenmembran.**

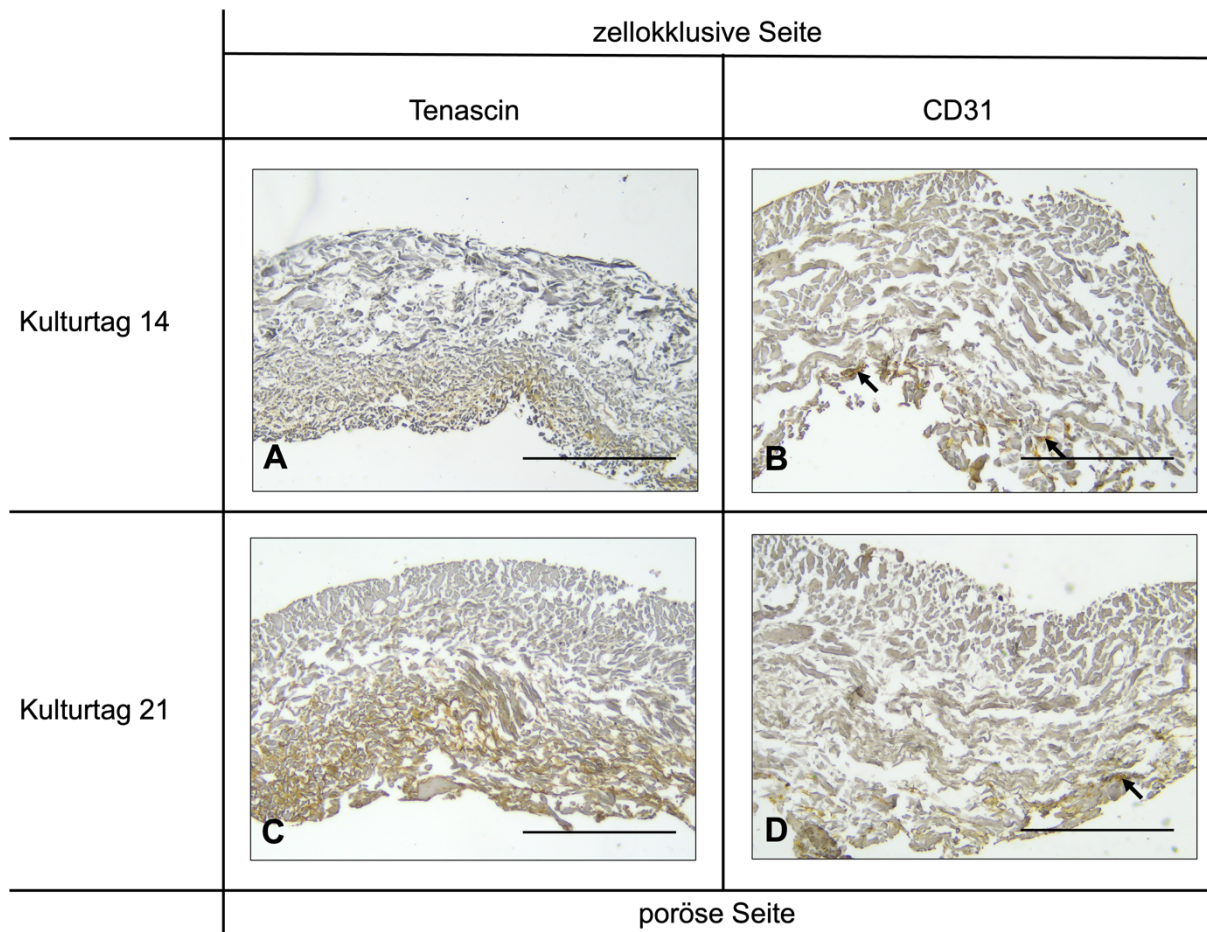
Zu sehen ist eine Aufnahme einer mit Makrophagen besiedelten Bio-Guide® Kollagenmembran, die mit dem Lichtmikroskop und einer 20-fachen Vergrößerung angefertigt wurde. Links im Bild befindet sich die poröse Seite der Kollagenmatrix, auf der die Zellen ausgesät wurden; rechts die zellokklusive glatte Seite. Der abgebildete Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 500 µm.

#### **4.1.2 Immunhistochemischer Nachweis zellulärer Aktivität innerhalb der besiedelten Kollagenmatrix**

Die mit einer Tri-Kultur aus Fibroblasten, HUVECs und Makrophagen besiedelten Bio-Guide® Kollagenmembranen wurden an Tag 24 in 4 % ROTI®Histofix fixiert. Anschließend wurden sie zum Zweck des Nachweises der in der Kollagenmembran vermuteten Makrophagen mittels eines CD45 Antikörpers gefärbt. In der mikroskopischen Analyse kamen jedoch keine Zellen zur Darstellung (Abbildung 16). Daher wurden keine weiteren Färbungen mit diesen Proben durchgeführt.

Eine indirekte Untersuchung der Fibroblasten und ihrer Aktivität erfolgte mittels Tenascin-Färbung nach 14 und 21 Tagen anhand der in 4 % ROTI®Histofix fixierten Kollagenmembranen. Diese wurden zuvor mit Fibroblasten und HUVECs in einer Bi-Kultur besiedelt. Der Farbstoff konnte an beiden Tagen nahe der porösen Seite der Membran nachgewiesen werden (Abbildung 15, A + C). Jedoch wurde im Vergleich der beiden Untersuchungszeitpunkte nach 21 Tagen eine ausgeprägtere Fibroblastenaktivität bis weit in Richtung zelloklusiver Seite festgestellt (Abbildung 15, A + C). Zum Nachweis der HUVECs wurden die Matrices beider Entnahmezeitpunkte mit Hilfe eines CD31 Antikörpers markiert. Im

Gegensatz zu den Fibroblasten kamen die HUVECs lediglich an der Oberfläche der porösen Seite zur Darstellung (Abbildung 15, B + D).



**Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung der Fibroblasten und HUVECs in der Kollagenmembran.**

Zum Nachweis der Fibroblasten und HUVECs in den mit der Bi-Kultur besiedelten Membranen wurden die Zellen mit unterschiedlichen immunhistochemischen Farbstoffen markiert. In den oberen Bildbereichen befindet sich die zellokklusive Seite der Kollagenmembranen und in den unteren Bereichen die poröse Seite, auf der die Zellen ausgesät wurden. Die Schnitte wurden zum indirekten Nachweis der Fibroblastenaktivität der an den Tagen 14 (A) und 21 (C) in 4 % ROTI®Histofix fixierten Kollagenmembranen mittels Tenascin angefärbt. Die Darstellung der Lokalisation der HUVECs (Pfeile) in den Kollagenmatrices erfolgte mittels CD31 Antikörperfärbung der an den Tagen 14 (B) und 21 (D) in 4 % ROTI®Histofix fixierten Matrices. Die dargestellten Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

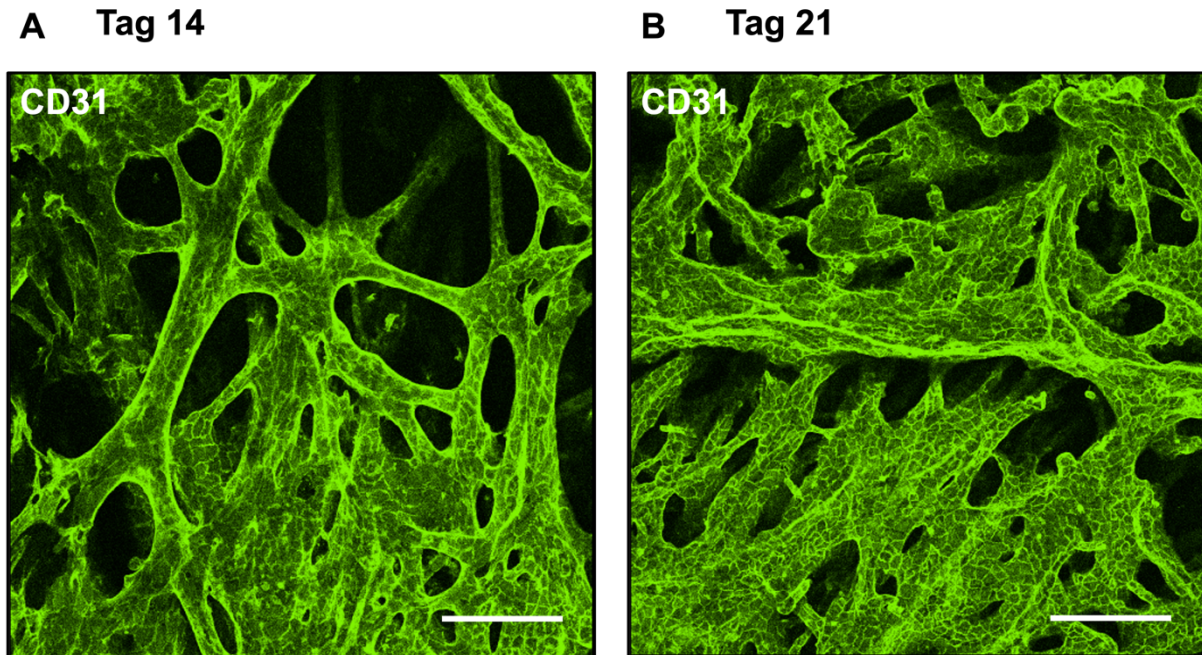


**Abbildung 16: Immunhistochemische CD45 Färbung der Tri-Kultur in der Kollagenmembran.**

Zum Nachweis von Makrophagen, die in einer Tri-Kultur mit Fibroblasten und HUVECs auf eine Kollagenmembran aufgebracht wurden, erfolgte eine Anfärbung der Proben mit einem CD45-Antikörper-Farbstoff. Es konnten jedoch keine Zellen detektiert werden. Die Makrophagen wurden auf der porösen Seite der Membran im unteren Bildbereich kultiviert, während sich die zellokklusive Seite im oberen Bildbereich befindet. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

#### **4.1.3 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der HUVECs**

Um das Verhalten der Endothelzellen sowie deren potentielle Ausbildung von Gefäßstrukturen in der Kollagenmatrix zu untersuchen, wurden die Matrices ab Kulturtag 2 mit einer Bi-Kultur aus Fibroblasten und HUVECs besiedelt und anschließend an den Tagen 14 (Abbildung 17, A) und 21 (Abbildung 17, B) mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Eine Ausbildung von gefäßähnlichen Strukturen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der HUVECs in der Kollagenmembran an Tag 14 und 21.**

Die abgebildeten Kollagenmembranen wurden mit einer Bi-Kultur aus Fibroblasten und HUVECs besiedelt. An den Tagen 14 (A) und 21 (B) wurden die Matrices entnommen, die Endothelzellen mit einem CD31 Antikörper markiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Länge der Maßstabsbalken entspricht 500  $\mu\text{m}$ . Die Aufnahme erfolgte mit dem TCS SP8 Fluoreszenzmikroskop.

## 4.2 Analyse der Kollagengel-Versuche

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Werte der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) für die verwendeten Antikörper (CD209, CD86, CD200R, CD163) gemessen. Folgende Vergleichsgruppen wurden für die Auswertung anhand der Behandlung der Zellen definiert und anschließend analysiert:

- Unbehandelt: von den Zellkulturschalen an Kulturtag 6 abgelöste, differenzierte M1-Makrophagen.

Danach erfolgte die Kultivierung der Makrophagen unter folgenden Bedingungen:

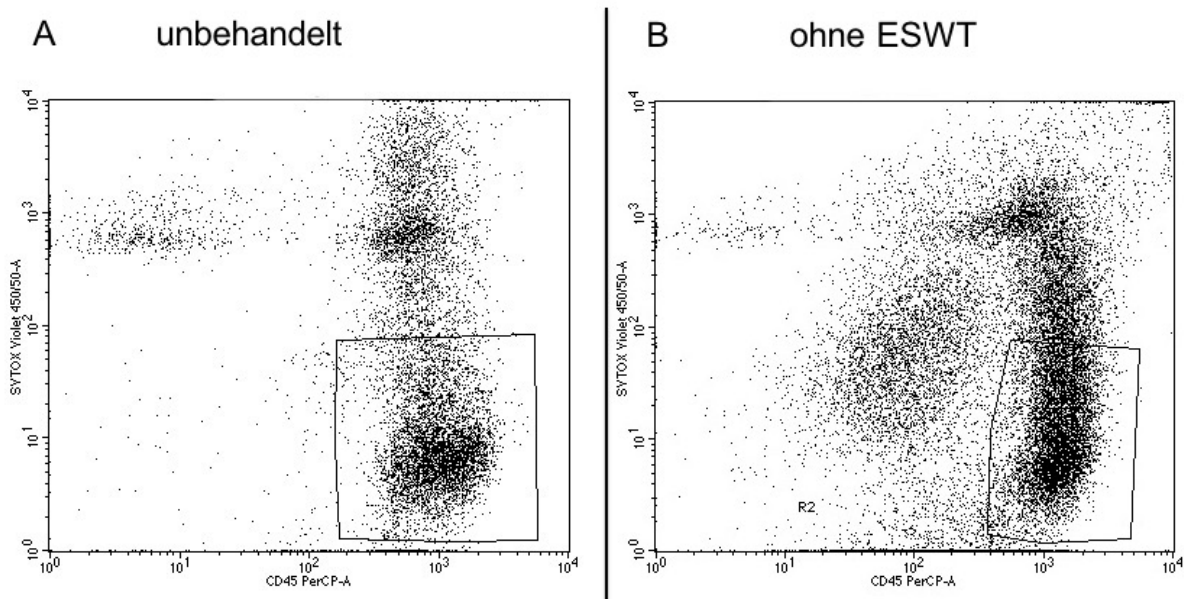
- Mit ESWT: von Kulturtag 6 bis 8 in Kollagengel kultivierte Zellen mit einmaliger Applikation von Stoßwellen an Tag 7.
- Ohne ESWT: von Kulturtag 6 bis 8 in Kollagengel kultivierte Zellen ohne Applikation von Stoßwellen.
- Positivkontrolle Gel: von Kulturtag 6 bis 8 in Kollagengel kultivierte Zellen unter Zugabe von 20 ng/ $\mu\text{l}$  IL-4 zu dem Gel-Ansatz und dem Nährmedium.

- Positivkontrolle Zellkulturplatte: von Kulturtag 6 bis 8 auf einer 6 Well Zellkulturplatte mit Upcell™ Oberfläche kultivierte Zellen unter Zugabe von 20 ng/μl IL-4 zu dem Nährmedium.

Weiterhin wurden die zu analysierenden Gruppen zur besseren Vergleichbarkeit in drei Konstellationen untersucht:

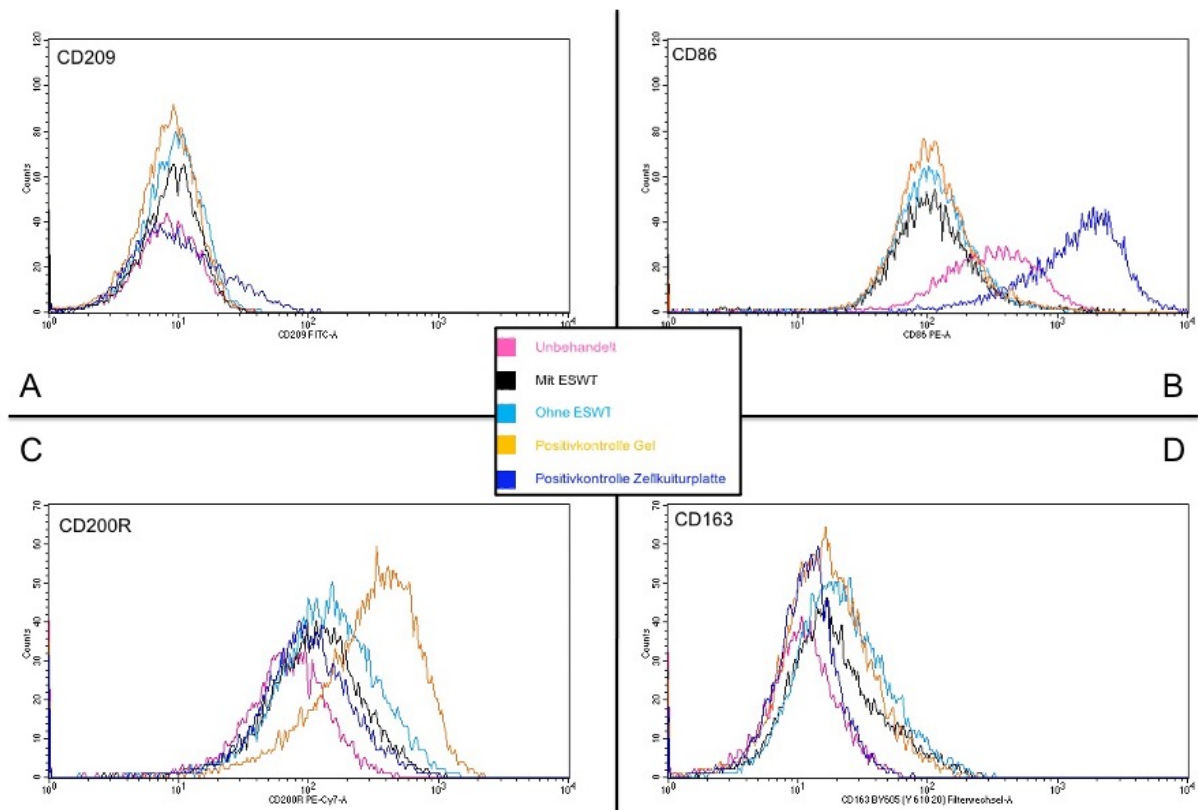
1. Gruppenvergleich Stoßwellentherapie: von Kulturtag 6 bis 8 in Kollagengel kultivierte Zellen mit und ohne ESWT.
2. Gruppenvergleich Positivkontrollen: von Kulturtag 6 bis 8 in Kollagengel und auf der Zellkulturplatte mit Upcell™ Oberfläche kultivierte Zellen, deren Nährmedium 20 ng/μl IL-4 hinzugegeben wurde.
3. Vergleich aller Gruppen.

Vor Durchführung der Durchflusszytometrie fand eine Eingrenzung der untersuchten Zellen mit Hilfe eines einzelnen Gates statt (Abbildung 18) um sicherzustellen, dass nur die CD45 positiven Sytox® Blue negativen Zellen in der weiteren Analyse berücksichtigt wurden. Dieser Vorgang wurde sowohl für die unbehandelten (Abbildung 18, A) als auch für die anderen Gruppen („mit ESWT“, „ohne ESWT“, „Positivkontrolle Gel“, „Positivkontrolle Zellkulturplatte“) durchgeführt (Abbildung 18, B).



**Abbildung 18: Gating der Makrophagen in der Durchflusszytometrie.**

Die Grafiken zeigen die gesetzten Gates zur Auswahl der CD45 positiven Sytox® Blue negativen Zellen einer Makrophagenpopulation, die zur weiteren Analyse ausgewählt wurden. (A) Die Grafik beschreibt die unbehandelten Zellen nach sechstägiger Differenzierung. In (B) ist die Grafik der Zellen der Gruppe „ohne ESWT“ am achten Tag nach der Isolation der Makrophagen aus dem Kollagengel dargestellt. Im Vergleich zu der unbehandelten Makrophagenpopulation färben sich mehr Zellen mit Sytox® Blue, insofern sind hier weniger Zellen der *alive*-Population zuzuordnen.



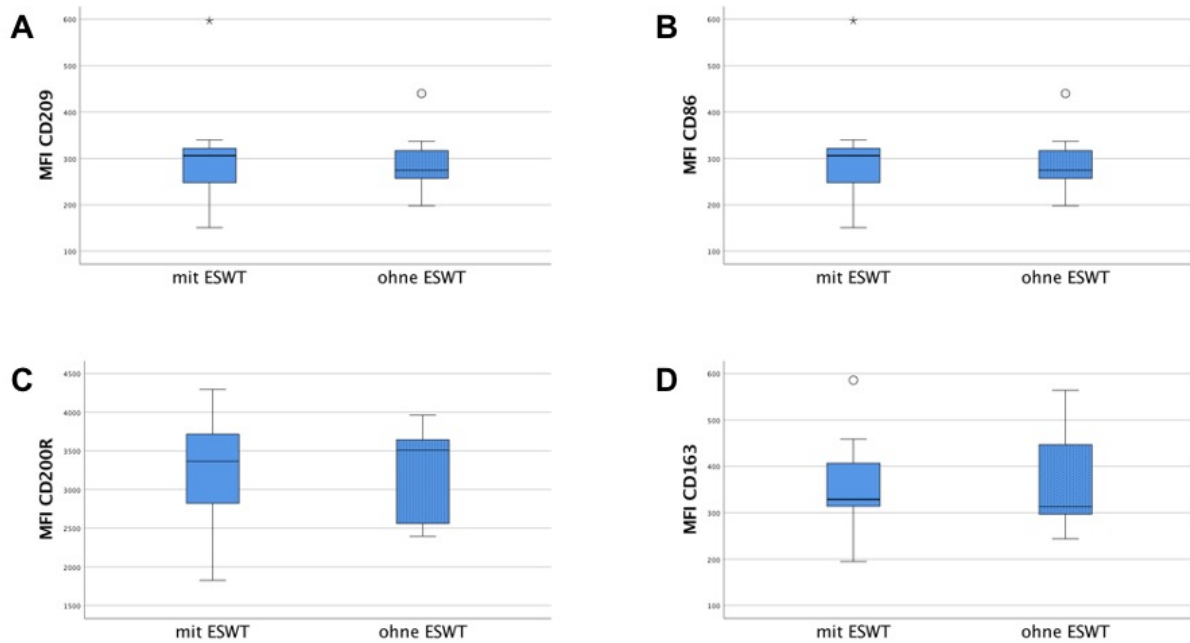
**Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse einer Makrophagenpopulation.**

Dargestellt ist die Analyse der untersuchten Vergleichsgruppen einer beispielhaften Makrophagenpopulation mittels Durchflusszytometrie: (A) Histogramm des Spektrums der CD209 Antikörper-Färbung CD45 positiver Zellen. (B) Histogramm des Spektrums der CD86 Antikörper-Färbung CD45 positiver Zellen. (C) Histogramm des Spektrums der CD200R Antikörper-Färbung CD45 positiver Zellen. (D) Histogramm des Spektrums der CD163 Antikörper-Färbung CD45 positiver Zellen.

#### 4.2.1 Gruppenvergleich Stoßwellentherapie

Der Vergleich von in dem Kollagengel kultivierten Zellen mit und ohne ESWT sollte darüber Aufschluss geben, ob die Behandlung von M1-Makrophagen mittels extrakorporaler Stoßwellen in einem dreidimensionalen Gewebeverbund einen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen in M2-Makrophagen besitzt.

In der Analyse zeigen beide Vergleichsgruppen ähnliche Messwerte der vier untersuchten Antikörper (Abbildung 20, Tabellen 11–14). Unter Verwendung eines ungepaarten t-Tests konnte bei keinem der untersuchten Antikörper ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit oder ohne Stoßwellentherapie festgestellt werden (CD209:  $t(18) = 0,388$ ;  $p = 0,703$ ; CD86:  $t(18) = -0,112$ ;  $p = 0,912$ ; CD200R:  $t(18) = 0,153$ ;  $p = 0,880$ ; CD163:  $t(16) = -0,104$ ;  $p = 0,919$ ).



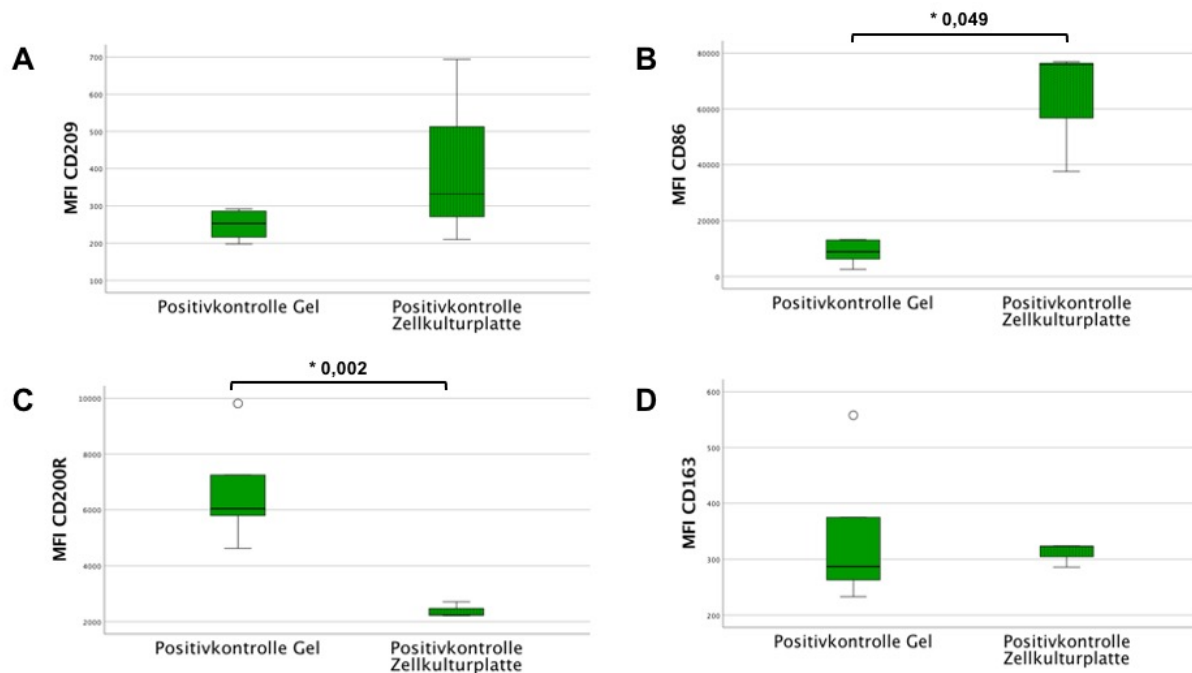
**Abbildung 20: Übersicht der MFI-Messwerte der Gruppen „mit ESWT“ und „ohne ESWT“.**

Abgebildet sind die Boxplots der Gruppen „mit ESWT“ und „ohne ESWT“. Die MFI-Messwerte des CD209 Antikörpers (A), des CD86 Antikörpers (B), des CD200R Antikörpers (C) und des CD163 Antikörpers (D) werden dargestellt. Die Mittelwerte der vier untersuchten Antikörper beider Vergleichsgruppen zeigen mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests keine signifikanten Unterschiede.

#### 4.2.2 Gruppenvergleich Positivkontrollen

Um den Einfluss der Kultivierung der Makrophagen in dem Kollagengel mit der konventionellen Kultivierung auf einer Zellkulturplatte mit Upcell™ Oberfläche zu vergleichen, wurden die Gruppen „Positivkontrolle Gel“ und „Positivkontrolle Zellkulturplatte“ vergleichend analysiert. In beiden Gruppen wurden die Zellen an Kulturtag 6 mit 20 ng/μl IL-4 stimuliert. Dies wurde sowohl dem Kulturmedium als auch der Kollagengel-Suspension zugefügt.

Mittels Welch-Test zeigten sich die MFI-Werte des CD86 Antikörpers der „Positivkontrolle Zellkulturplatte“ statistisch signifikant gegenüber der „Positivkontrolle Gel“ erhöht ( $t(2,071) = 4,189$ ;  $p = 0,049$ ); die des CD200R Antikörpers zeigten signifikant höhere Werte bei den in dem Kollagengel kultivierten Makrophagen ( $t(5,475) = 5,636$ ;  $p = 0,002$ ). In der Auswertung des CD209 sowie des CD163 Antikörpers zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (CD209:  $t(2,044) = 1,111$ ;  $p = 0,380$ ; CD163:  $t(5,617) = 0,453$ ;  $p = 0,668$ ). Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21: Übersicht der MFI-Messwerte der Gruppen „Positivkontrolle Gel“ und „Positivkontrolle Zellkulturplatte“.**

Dargestellt sind die Boxplots der Gruppen „Positivkontrolle Gel“ und „Positivkontrolle Zellkulturplatte“. Die Daten wurden mit Hilfe eines Welch-Tests analysiert. (A) Die MFI-Messwerte des CD209 Antikörpers zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p=0,380$ ). (B) Die MFI-Messwerte des CD89 Antikörpers war in der Gruppe „Positivkontrolle Zellkulturplatte“ gegenüber denen der Vergleichsgruppe signifikant erhöht ( $p=0,049$ ). (C) Die MFI-Messwerte des CD200R Antikörpers verhielten sich entgegengesetzt; die Messwerte der in Gel kultivierten Makrophagen waren verglichen mit denen der Zellkulturplatte signifikant höher ( $p=0,002$ ). (D) Die MFI-Messwerte des CD163 Antikörpers wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf ( $p=0,668$ ).

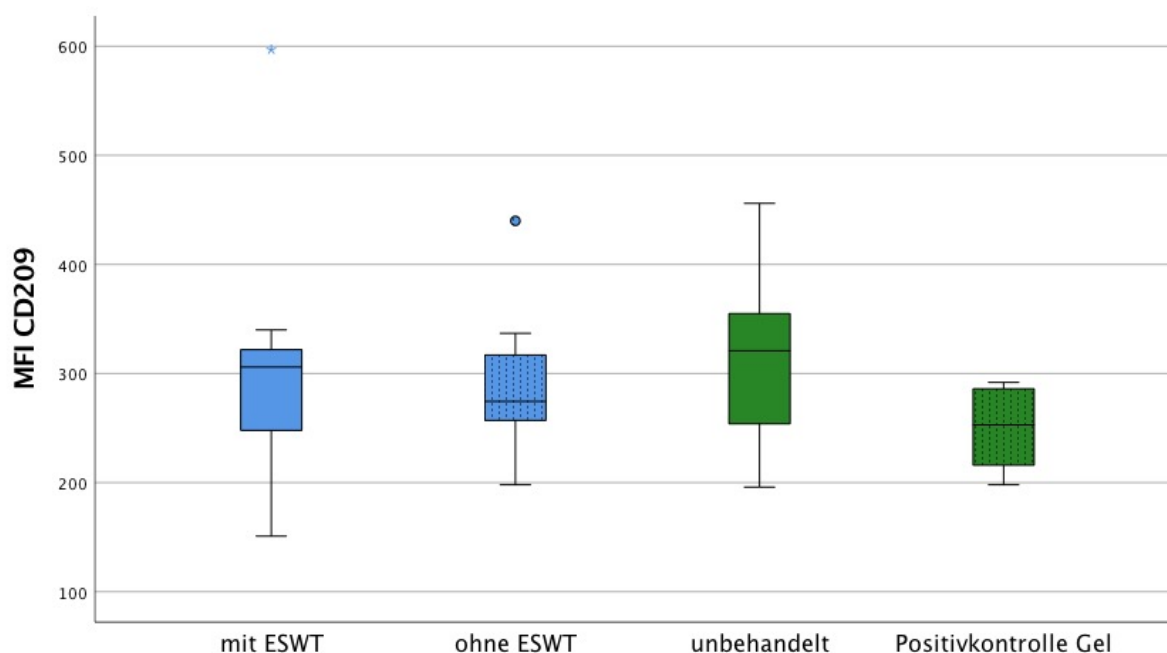
#### 4.2.3 Vergleich aller Gruppen

Additiv zu den Untergruppenvergleichen wurden zudem die Unterschiede zwischen den relevanten Gruppen „mit ESWT“, „ohne ESWT“, „Positivkontrolle Gel“ und „unbehandelt“ durchgeführt.

Unter Einbeziehung der oben genannten Vergleichsgruppen wurde die Varianzhomogenität mittels Levene-Tests überprüft, wonach eine Gleichheit der Varianzen in diesen Gruppen angenommen werden konnte (CD209:  $p = 0,558$ ; CD86:  $p = 0,736$ ; CD200R:  $p = 0,358$ ; CD163:  $p = 0,970$ ).

#### 4.2.3.1 CD209 Antikörper

In Abbildung 22 und Tabelle 11 sind die MFI-Werte der CD209 Expression in der Durchflusszytometrie dargestellt (entsprechend Abbildung 19, A). Dabei unterschieden sich die Daten der einzelnen Gruppen nur geringfügig voneinander. Die Population „unbehandelt“ ( $324,00 \pm 88,29$ ) wies die höchsten Messwerte auf, gefolgt von den Gruppen „mit ESWT“ ( $306,00 \pm 117,33$ ) und „ohne ESWT“ ( $289,40 \pm 67,65$ ). Die „Positivkontrolle Gel“ zeigte die niedrigsten Werte ( $252,13 \pm 45,76$ ). Mittels einfaktorieller ANOVA konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden ( $p = 0,432$ ).



**Abbildung 22: Übersicht der MFI-Messwerte des CD209 Antikörpers.**

Die MFI-Messwerte des CD209 Antikörpers in der Durchflusszytometrie sind als Boxplot dargestellt und nach Art der Behandlung in vier Untergruppen unterteilt: „mit ESWT“ (n=10), „ohne ESWT“ (n=10), „unbehandelt“ (n=9) und „Positivkontrolle Gel“ (n=6).

**Tabelle 11: MFI-Messwerte des CD209 Antikörpers.**

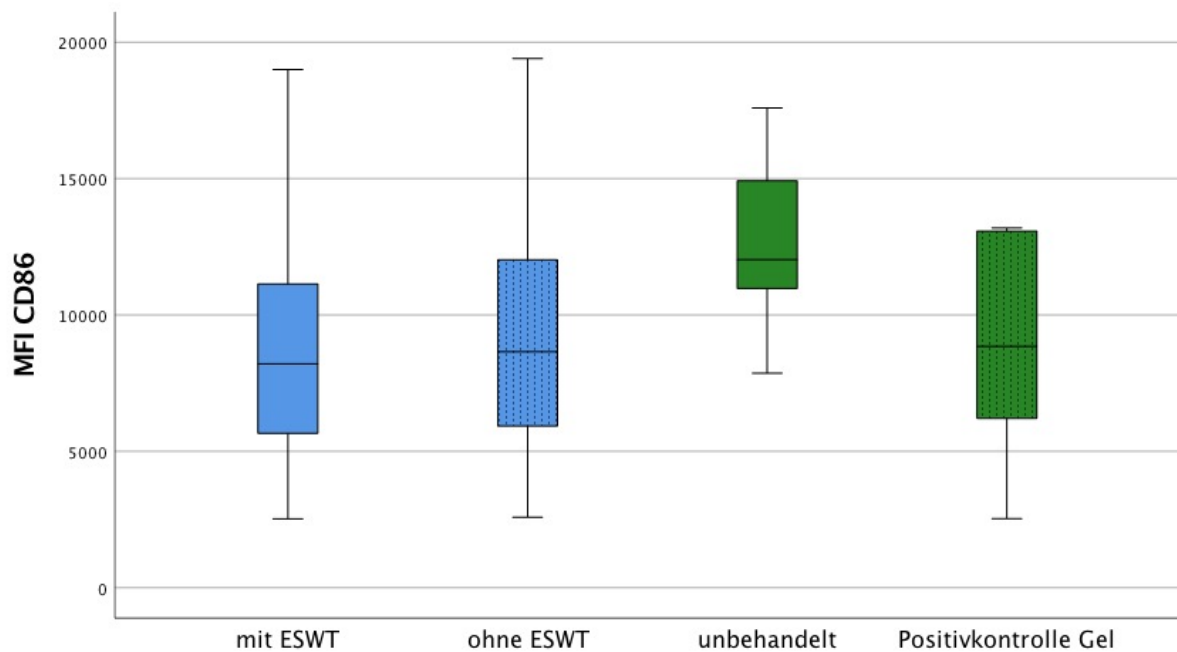
| Art der Behandlung | n  | MFI    | SD     |
|--------------------|----|--------|--------|
| Mit ESWT           | 10 | 306,00 | 117,33 |
| Ohne ESWT          | 10 | 289,40 | 67,65  |
| Unbehandelt        | 9  | 324,00 | 88,29  |

|                      |   |        |       |
|----------------------|---|--------|-------|
| Positivkontrolle Gel | 6 | 249,67 | 37,27 |
|----------------------|---|--------|-------|

Abkürzungen: n = Stichprobenzahl, SD = Standardabweichung

#### 4.2.3.2 CD86 Antikörper

In Abbildung 23 und Tabelle 12 sind die Messwerte der MFI der CD86 Expression in der Durchflusszytometrie dargestellt (entsprechend Abbildung 19, B). Für die Gruppen „unbehandelt“ ( $12660,89 \pm 3089,97$ ) wurden geringfügig höhere MFI-Werte gemessen als für die Gruppen „mit ESWT“ ( $9537,50 \pm 5548,96$ ), „ohne ESWT“ ( $9810,70 \pm 5330,32$ ) sowie „Positivkontrolle Gel“ ( $8785,83 \pm 4224,21$ ). Mittels einfaktorieller ANOVA konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden ( $p = 0,377$ ).



**Abbildung 23: Übersicht der MFI-Messwerte des CD86 Antikörpers.**

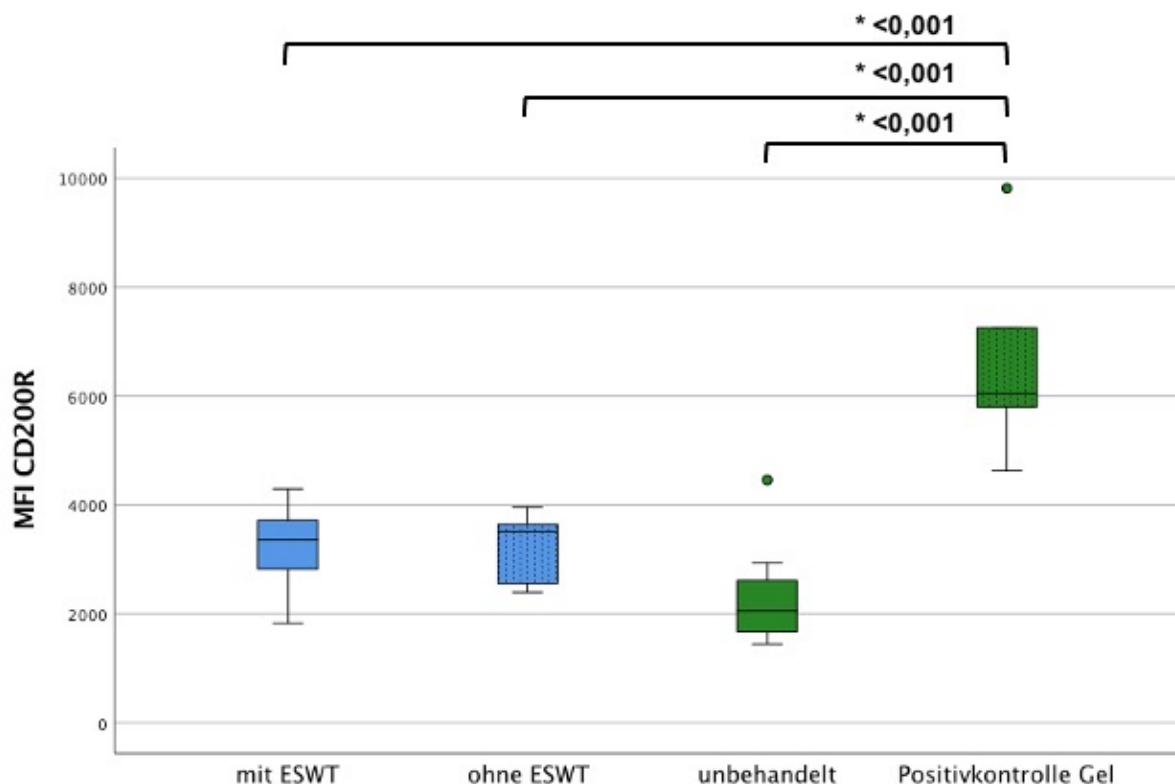
Die Messwerte der Zellzahl des CD86 Antikörpers in der Durchflusszytometrie sind als Boxplot dargestellt und nach Art der Behandlung in vier Untergruppen unterteilt: „mit ESWT“ (n=10), „ohne ESWT“ (n=10), „unbehandelt“ (n=9) und „Positivkontrolle Gel“ (n=6).

**Tabelle 12: MFI-Messwerte des CD86 Antikörpers.**

| Art der Behandlung   | n  | MFI      | SD      |
|----------------------|----|----------|---------|
| Mit ESWT             | 10 | 9537,50  | 5548,96 |
| Ohne ESWT            | 10 | 9810,70  | 5330,32 |
| Unbehandelt          | 9  | 12660,89 | 3089,97 |
| Positivkontrolle Gel | 6  | 8785,83  | 4224,21 |

Abkürzungen: n = Stichprobenzahl, SD = Standardabweichung

#### 4.2.3.3 CD200R Antikörper

**Abbildung 24: Übersicht der MFI-Messwerte des CD200R Antikörpers.**

Die MFI-Messwerte des CD200R Antikörpers in der Durchflusszytometrie sind als Boxplot dargestellt und nach Art der Behandlung in vier Untergruppen unterteilt: „mit ESWT“ (n=10), „ohne ESWT“ (n=10), „unbehandelt“ (n=9) und „Positivkontrolle Gel“ (n=6). Die Sterne markieren voneinander signifikant verschiedene Ergebnisse (einfaktorielle ANOVA und Tukey post-hoc Test; \*  $p < 0,001$ ).

In Abbildung 24 und Tabelle 13 sind die MFI-Messwerte der CD200R Expression in der Durchflusszytometrie dargestellt (entsprechend Abbildung 19, C). Die Gruppen „mit ESWT“ ( $3278,60 \pm 771,33$ ) und „ohne ESWT“ ( $3232,00 \pm 575,39$ ) zeigten ähnlich Ergebnisse. Die gemessenen Werte der unbehandelten Zellen ( $2347,67 \pm 944,23$ ) waren niedriger als die der Vergleichsgruppen. In der Analyse der Mittelwerte mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ). Der daran anschließende Tukey post-hoc Test zeigte in der „Positivkontrolle Gel“ statistisch signifikant erhöhte Messwerte der MFI ( $6595,67 \pm 1785,95$ ) im Vergleich zu den drei anderen Gruppen („mit ESWT“:  $p < 0,001$ ; „ohne ESWT“:  $p < 0,001$ ; „unbehandelt“:  $p < 0,001$ ).

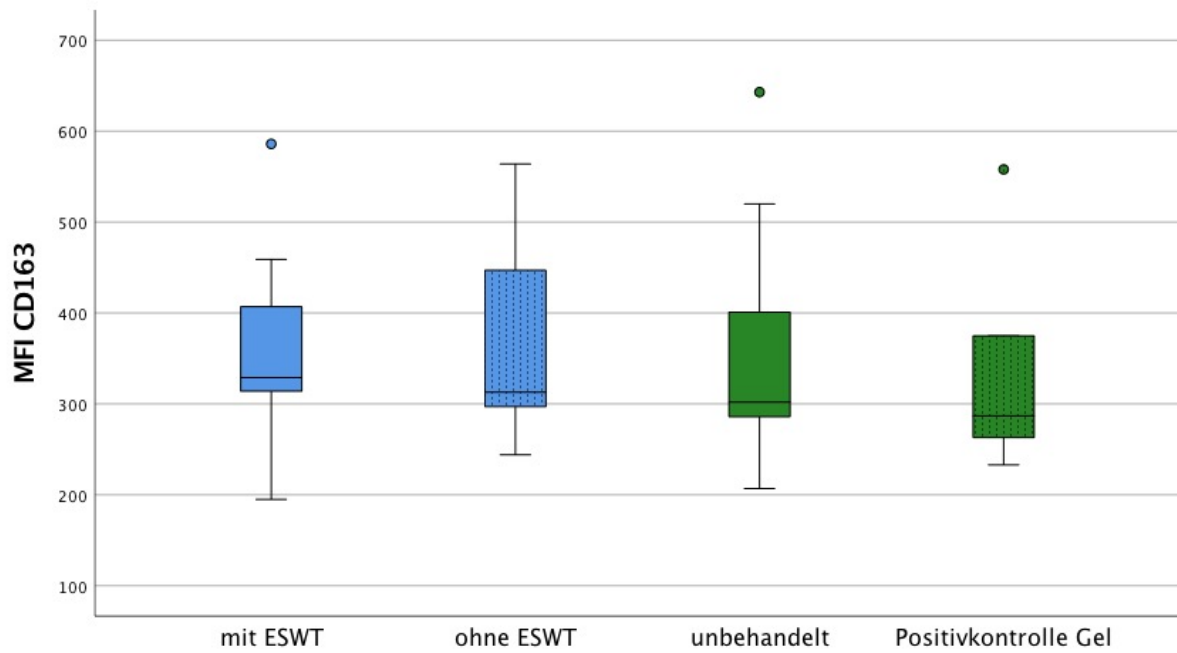
**Tabelle 13: MFI-Messwerte des CD200R Antikörpers.**

| <b>Art der Behandlung</b> | <b>n</b> | <b>MFI</b> | <b>SD</b> |
|---------------------------|----------|------------|-----------|
| Mit ESWT                  | 10       | 3278,60    | 771,33    |
| Ohne ESWT                 | 10       | 3232,00    | 575,39    |
| Unbehandelt               | 9        | 2347,67    | 944,23    |
| Positivkontrolle Gel      | 8        | 6595,67    | 1785,95   |

Abkürzungen: n = Stichprobenzahl, SD = Standardabweichung

#### **4.2.3.4 CD163 Antikörper**

In Abbildung 25 und Tabelle 14 sind die MFI-Messwerte des CD163 Antikörpers in der Durchflusszytometrie dargestellt (entsprechend Abbildung 19, D). Dabei unterscheiden sich die Daten der einzelnen Gruppen nur geringfügig voneinander. Die Gruppe „ohne ESWT“ ergab die höchsten Messwerte ( $395 \pm 111,43$ ) gefolgt von „mit ESWT“ ( $364,11 \pm 11,13$ ) und „Positivkontrolle Gel“ ( $333,83 \pm 119,62$ ). Die Gruppe der unbehandelten Zellen zeigte die niedrigsten Werte ( $323,86 \pm 139,89$ ). Mittels einfaktorieller ANOVA konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ( $p = 0,951$ ).



**Abbildung 25: Übersicht der MFI-Messwerte des CD163 Antikörpers.**

Die MFI-Messwerte der CD163 Expression in der Durchflusszytometrie sind als Boxplot dargestellt und nach Art der Behandlung in vier Untergruppen unterteilt: „mit ESWT“ (n=10), „ohne ESWT“ (n=10), „unbehandelt“ (n=9) und „Positivkontrolle Gel“ (n=6).

**Tabelle 14: MFI-Messwerte des CD163 Antikörpers.**

| Art der Behandlung   | n | MFI    | SD     |
|----------------------|---|--------|--------|
| Mit ESWT             | 9 | 364,11 | 11,13  |
| Ohne ESWT            | 9 | 395,00 | 111,43 |
| Unbehandelt          | 9 | 323,86 | 139,89 |
| Positivkontrolle Gel | 7 | 333,83 | 119,62 |

Abkürzungen: n = Stichprobenzahl, SD = Standardabweichung

## 5 Diskussion

Eine erfolgreiche Wundheilung wird durch zahlreiche, miteinander vernetzte Faktoren beeinflusst, wobei Makrophagen eine zentrale Rolle als Mediatoren der Entzündungsreaktion einnehmen (3-7). Sie werden in der Literatur in pro-inflammatorische M1- und anti-inflammatorische M2-Makrophagen unterteilt, wodurch das breite Spektrum der Einflussnahme dieser Zellen im Rahmen entzündlicher Reaktionen deutlich wird (6, 8, 9).

Klinische Studien zeigen, dass extrakorporale Stoßwellen als minimalinvasive mechanische Therapieform in der Lage sind, die Wundheilung positiv zu beeinflussen (14, 99, 106, 142). Die genauen zellulären Mechanismen hinter dieser Wirkung sind jedoch bislang unzureichend erforscht. Angesichts der Schlüsselrolle, die Makrophagen in den Prozessen der Wundheilung einnehmen, erscheint die Untersuchung eines möglichen Einflusses der ESWT auf die Makrophagenpopulationen als ein vielversprechender Forschungsansatz.

Ziel dieser Arbeit war es, zwei unterschiedliche Modelle hinsichtlich ihrer Eignung zur Untersuchung der Beeinflussung der Makrophagenaktivität durch die ESWT zu evaluieren. Die entwickelten *in-vitro*-Modelle sollten dabei die physikalischen Eigenschaften der menschlichen Haut so realitätsnah wie möglich nachbilden, um Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der ESWT *in vivo* ziehen zu können. Gleichzeitig mussten die Modelle die Kultivierung und Behandlung der zu untersuchenden Zellen ermöglichen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung einer möglichen Umpolarisierung der Makrophagen durch die Behandlung mit ESWT. Eine solche Umpolarisierung könnte die Grundlage für die klinisch beobachtete anti-inflammatorische Wirkung der Stoßwellentherapie darstellen. Die strategische Modulation der Makrophagenpolarisation könnte daher eine gezielte Förderung physiologischer immunologischer Prozesse der Wundheilung ermöglichen.

### 5.1 3D *in vitro* Hautmodelle

Zunächst soll an dieser Stelle kurz auf den grundsätzlichen Aufbau der Haut eingegangen werden. Diese besitzt eine wichtige Schutzfunktion des Körpers gegenüber äußeren Umwelteinflüssen und wird wesentlich durch zwei strukturelle Schichten gebildet: die Epidermis und die darunter liegende Dermis (143). Die Epidermis besteht aus einer Basalmembran, die epidermale Stammzellen enthält sowie einem darauf geschichteten Epithel, das aus spezialisierten Keratinozyten besteht und seinerseits in vier Schichten unterteilt werden kann (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum corneum) (144, 145). Von dem stratum basale ausgehend durchlaufen die Keratinozyten verschiedene Differenzierungsschritte bis sie schließlich terminal zu Korneozyten des stratum

corneum differenzieren (146). Diese Schicht besitzt lediglich eine Dicke von 10–20 µm, ist jedoch hauptverantwortlich für die Barrierefunktion der Haut (144). Die unter der Epidermis gelegene Dermis ist dagegen eine eher fibröse Schicht, die hauptsächlich aus Proteinen der EZM wie Proteoglykanen, Kollagen, Elastin und Fibronectin besteht (147). Diese interagieren mit der Epidermis sowie dem subkutanen Fettgewebe und sorgen so für Stabilität innerhalb des Organs (148). Eine zentrale Rolle innerhalb der Dermis übernehmen Fibroblasten, die unter anderem für die Synthese, den Erhalt und die Organisation der EZM verantwortlich sind (143).

In der Literatur sind viele verschiedene Ansätze für die Gestaltung eines 3D Hautäquivalents aufgeführt, die an die variierenden Fragestellungen der Versuche angepasst sind. Im Zentrum der Überlegungen steht in jedem Modell die Generierung eines möglichst physiologischen Modells. Dabei erlauben 3D-Konstrukte im Gegensatz zu 2D-Modellen einen Einblick in die komplexen, dynamischen Abläufe der Zell-Zell-Kommunikation sowie Zell-Zell-beziehungsweise Zell-Matrix-Interaktionen – mit und ohne Beeinflussung durch äußere Stimuli (112-115).

Dabei kommen verschiedene Modelle zum Einsatz, die zum Großteil entweder auf der Bildung von Zellaggregaten, sogenannter Sphäroide, basieren oder unter Verwendung eines Trägermaterials (*Scaffold*) als Grundlage beruhen (112). Sphäroide finden besonders in der Tumorforschung Anwendung, da sie die Mikroumgebung von Tumoren besser wiedergeben können als andere Systeme (112, 114). *Scaffold*-basierte 3D-Konstruktionen bieten hingegen die Möglichkeit, komplexe, individuelle Modelle zu entwerfen, die sowohl Interaktionen zwischen den Zellen untereinander als auch zwischen den Zellen und Komponenten der Mikroumgebung wie löslichen Wachstumsfaktoren oder EZM-Protein zulassen (114, 115). Verwendung finden dabei Trägermaterialien wie Membranen, Gele oder Schwämme, die sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprungs sein können (126), wobei das Aussäen von Zellen auf *Scaffolds* besonders in Kollagen-basierten Modellen Anwendung findet (112, 115, 128, 129). Dabei können sowohl auf Membranen als auch in Hydrogelen verschiedene Zelltypen je nach Fragestellung des Versuchsaufbaus zu unterschiedlichen Zeitpunkten in das Konstrukt integriert und anschließend analysiert werden (112, 128, 129, 149). Da Kollagen selbst ein Hauptbestandteil der EZM darstellt, ist eine Interaktion der verwendeten Zellen wie beispielsweise Fibroblasten mit der Kollagenmatrix möglich (112, 114, 150).

Einige komplexere Modelle verwenden eine Kombination aus dermalen und epidermalen Komponenten, um einer reelleren Imitation der Haut gerecht zu werden (151-153). Malheiro et al. verwendeten beispielsweise ein humanes Hautäquivalent zur Etablierung eines 3D-Hautmodells auf Basis eines kollagen- und fibrinreichen Hydrogels, welches durch Neurosphären innerviert wurde (149). Die Arbeitsgruppe kultivierte Fibroblasten in diesem Gel.

Anschließend erfolgte die Aussaat von Keratinozyten auf der Geloberfläche; eine adäquate epitheliale Differenzierung wurde durch ein Anheben der verwendeten Insert-Konstruktion auf die Flüssigkeit-Luft Schnittstelle erzielt (149). Jedoch erreichen Versuchsaufbauten, die eine möglichst naturgetreue Imitation der Haut anstreben, eine hohe Komplexität, wodurch eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwert wird.

Für die Anforderungen in dieser Arbeit war es wichtig ein 3D-Modell zu entwerfen, das ähnlich humaner Haut der mechanischen Beanspruchung, verursacht durch die ESWT, widerstehen kann. Haut verhält sich bei Verformung anisotrop; sie reagiert aufgrund ihrer komplexen biomechanischen Zusammensetzung je nach Richtung der angewandten Kraft unterschiedlich (154). Eine der relevanten physikalischen Größen, die in diesem Zusammenhang häufig untersucht wird, ist die Steifigkeit (155). Die Steifigkeit humaner Haut wird aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsmethoden sowie der Spendervariabilität der Proben in der Literatur inhomogen wiedergegeben. Sie wird durch das Elastizitätsmodul  $G'$  beschrieben und schwankt dabei zwischen 360 Pascal (Pa) und 160 MPa (154-156).

Auf Grundlage dieser Informationen sollen im Folgenden die zwei in dieser Arbeit vorgestellten 3D-Hautmodelle auf ihre Anwendbarkeit zur Analyse von Makrophagen und der Beeinflussung ihrer Polarisierung durch die Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen unter Betrachtung der aktuellen Literatur diskutiert werden.

## **5.2 Kollagenmembran als Basis eines 3D *in vitro* Hautmodells**

In dem ersten Teil dieser Arbeit wurde ein 3D-Hautmodell entwickelt, welches als Trägermaterial eine Kollagenmembran enthält. Solche Membranen werden besonders innerhalb des *Tissue Engineering* für die Deckung von Schleimhautdefekten genutzt, die für die Rekonstruktion von Hautdefekten als Goldstandard gelten (129, 157, 158). Zudem stellen *in vitro* hergestellte Schleimhaut-Äquivalente auf Basis von Kollagenmembranen eine valide Alternative zu autologen Transplantaten dar (159-161).

Der Vorteil dieser Modelle besteht in der Kombination aus zwei, für diesen Einsatzzweck essentiellen Eigenschaften. Zum einen behalten die Kollagenmembranen über den Zeitraum der Kultivierung ihre mechanische Integrität. Zum anderen lassen sich verschiedene Zelltypen gleichzeitig kultivieren, die ihrerseits innerhalb der Kollagenmatrix unterschiedliche Gewebeanteile ausbilden können (129, 162). Moharamzadeh et al. konnten in ihrer Arbeit anhand einer Bi-Kultur aus Keratinozyten und Fibroblasten die *in vitro* Ausbildung von geschichtetem Epithel auf verschiedenen Membranen nachweisen (162). Ebenso konnten Peters et al. ein mehrschichtiges Epithel auf einer Kollagenmembran *in vitro* generieren (129).

Die in diesem Modell verwendete BioGide® Membran fand auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung. Schwab et al. untersuchten vier verschiedene Kollagen-basierte Membranen auf ihre Fähigkeit, organotypische Gewebeäquivalente zu generieren (158). Dabei besiedelten sie die zu untersuchenden Matrices mit einer Bi-Kultur aus Epithelzellen und Fibroblasten. Anschließend analysierten sie die Zellviabilität und führten histologische Analysen durch, um die Funktionalität der Schleimhaut-Äquivalente beurteilen zu können (158). Die Bio-Gide® Kollagenmembran zeigte in dieser Hinsicht die besten Ergebnisse, wobei besonders die Proliferation, Migration und Tenascinsekretion der Fibroblasten innerhalb der Membranen verglichen mit den anderen Trägermaterialien erhöht war (158). Die Membran selbst ist porcinen Ursprungs und besteht aus nicht quervernetztem Typ I und III Kollagen.

Die Verwendung der BioGide® Kollagenmembran als Trägermaterial der Tri-Kultur aus Fibroblasten, Makrophagen und HUVECs erschien im Rahmen dieser Arbeit daher vielversprechend. Gleichzeitig wurde die in dieser Arbeit verwendete Kombination aus verschiedenen Zellen in der internationalen Literatur bislang nicht beschrieben, weshalb diesbezüglich nicht auf die Erfahrungswerte anderer Gruppen zurückgegriffen werden konnte.

### **5.2.1 Fibroblasten in der Kollagenmembran**

In der Literatur ist weitreichend beschrieben, dass Fibroblasten im Rahmen der Wundheilung eine entscheidende Rolle spielen, indem sie Kollagen und andere Bestandteile der EZM sowie Proteasen wie MMPs sezernieren (6, 7). Sie sind maßgeblich beteiligt an der Umwandlung des Fibrinkoagels zu reifem Narbengewebe. Gleichzeitig unterstützen sie durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF die Migration und Proliferation von Endothelzellen und somit grundsätzlich die Angiogenese (41, 42, 163). Zudem sind sie supportiv in der Re-Epithelialisierung des verletzten Gewebes tätig (163). Besonders das Zusammenspiel aus Makrophagen und Fibroblasten hat einen Einfluss auf die Prozesse der Wundheilung und deren Ablauf. Dabei sorgt unter anderem die Sekretion des TGF- $\beta$ 1 durch Makrophagen für eine Migration von Fibroblasten in das Wundgebiet (164). Zusätzlich fördert TGF- $\beta$ 1 die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten (165). Die Implementierung von Fibroblasten scheint daher für die Komplexität eines 3D-Hautmodells, das sich nah an den vielschichtigen Gegebenheiten humanen Gewebes orientiert, von großer Bedeutung.

Die Ergebnisse zeigten eine besonders ausgeprägte Aktivität der Fibroblasten in der Nähe der porösen Seite der Kollagenmembran, was mutmaßlich auf die initiale Besiedlung dieser Seite zurückzuführen ist. Gleichzeitig konnte eine Zellaktivität bis hin zur zelloklusiven Seite der Membran beobachtet werden. Demnach kann aufgrund der Verteilung der Fibroblasten über die gesamte Matrix nach 14 beziehungsweise 21 Tagen von einer hinreichenden Viabilität und Funktionalität der Zellen innerhalb der Membranen ausgegangen werden. Diese Ergebnisse

unterstreichen die Eignung des Modells zur Untersuchung zellulärer Prozesse im dreidimensionalen Kontext.

Andere Studien, die sich mit dem Verhalten von Fibroblasten in Kollagenmembranen auseinandersetzten, kamen zu ähnlichen Ergebnissen (166-168). Kriegebaum et al. untersuchten in diesem Zusammenhang das Verhalten von Fibroblasten und Keratinozyten in equinen Typ I Kollagenmembranen nach 14 beziehungsweise 21 Tagen der Fibroblastenkultivierung und anschließenden sieben beziehungsweise 14 Tagen nach Aufbringen von Keratinozyten (166). Nach einer Gesamtkultivierungszeit von 35 Tagen migrierten die Fibroblasten weiter in die Membran hinein als noch 14 Tage zuvor (166). Diese Erkenntnisse decken sich mit denen dieser Arbeit und legen nahe, dass Fibroblasten während der Kultivierung in Kollagenmembranen aktiv durch die Membran migrieren; eine Kultivierungszeit von mindestens 21 Tagen scheint dabei ideal, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, einen Großteil der Membranfläche zu besiedeln.

### **5.2.2 HUVECs in der Kollagenmembran**

Die aus humanen Nabelschnurvenen isolierten HUVECs finden in der Literatur breite Anwendung zur Untersuchung endothelialer Zellprozesse, wie der Angiogenese oder der Neubildung von Gefäßen (169-174). Entzündliche Prozesse sind immer eng verbunden mit der Angiogenese des betroffenen Wundgebietes; sie sichert eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und ermöglicht die Migration essentieller Zellen der Wundheilung wie Makrophagen oder neutrophile Granulozyten in die betroffenen Gewebeareale (35, 36, 175).

Weiterhin werden im Rahmen der Herstellung dreidimensionaler Hautäquivalente positive Effekte durch die Integration von HUVECs beschrieben. Miyazaki et al. erstellten ein 3D-Hautäquivalent, das Fibroblasten, Keratinozyten sowie HUVECs enthielt. Nach der Transplantation in einen erzeugten Hautdefekt in Mäusen zeigten die durch HUVECs vaskularisierten Hautäquivalente verglichen mit denen ohne HUVECs eine höhere Einheilungsrate sowie einen schnelleren Anschluss der Gefäße an das Gefäßsystem der Mäuse (176). Die Integration von HUVECs in das vorliegende 3D-Modell erschien daher sinnvoll, um ein komplexeres, physiologisch präziseres Hautmodell zu entwerfen, anhand dessen die Beeinflussung der Prozesse der Wundheilung analysiert werden können.

Im Zuge der Analyse der Kollagenmembranen, die mit einer Bi-Kultur aus Fibroblasten und HUVECs besiedelt wurden, zeigten die HUVECs im Vergleich zu den Fibroblasten keine Anzeichen der Migration innerhalb der Kollagenmatrix. In der immunhistochemischen Färbung der Endothelzellen an den Tagen 14 und 21 konnten einzig im Bereich der porösen, besiedelten Seite der Kollagenmembran HUVECs nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen von Peters et al., die ebenfalls eine Bio-Gide®

Kollagenmembran als Basis eines *in vitro* 3D-Schleimhaut-Äquivalents nutzten (129). Die Arbeitsgruppe untersuchte unter anderem den Einfluss der ESWT auf die Gefäßneubildung innerhalb einer mit einer Bi- beziehungsweise Tri-Kultur aus Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen besiedelten Kollagenmatrix. Dabei wurde die Membran für die Bi-Kultur am ersten Tag mit Fibroblasten und an Tag 12 mit Endothelzellen besiedelt. Für die Tri-Kultur wurden zusätzlich, vier Tage nach Kultivierungsbeginn, Epithelzellen auf die Matrices gegeben. An den Tagen 15, 19 sowie 26 fand die Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen mit einer EFD von  $0,12 \text{ mJ/mm}^2$ , einer Frequenz von 5 Hz, einem Luftdruck von 3 bar und 500 Impulsen statt. Dreiunddreißig Tage nach Kultivierungsbeginn wurden die Matrices zur Auswertung entnommen. Peters et al. beschrieben ebenfalls eine Ansammlung der Endothelzellen im Bereich der porösen Seite der Kollagenmembran, wobei die ESWT keinen Einfluss auf die Migration der Endothelzellen zeigte (129). Gleichzeitig konnte die Arbeitsgruppe durch die verwendeten *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells* ausgebildete mikrovaskuläre Gefäßstrukturen beobachten, deren Ausbildung durch die ESWT jedoch nicht beeinflusst wurde (129). Die im Rahmen unserer Arbeit verwendeten HUVECs zeigten im Vergleich zu den durch Peters et al. verwendeten Endothelzellen keine Tendenz zur Ausbildung mikrovaskulärer Gefäßstrukturen.

Das Verhalten von HUVECs in festen Kollagenmembranen wurde bislang wenig untersucht. Demgegenüber existieren zahlreiche Arbeiten, die sich mit der Ausbildung von primitiven Gefäßstrukturen in Hydrogelen befassen (177-180). In diesem Zusammenhang kultivierten Andrée et al. HUVECs gemeinsam mit *Human Adipose Tissue Derived Stromal Cells* in einem Hydrogel aus humanem Kollagen Typ I (177). Die Arbeitsgruppe konnte die Ausbildung endothelialer Zellnetzwerke nachweisen, wobei die Gefäßstrukturen der humanen Gelmatrix größere Lumina aufwies als die der murinen Vergleichsgruppe (177). Ebenso konnten Chen et al. die Ausbildung eines tubulären Gefäßnetzwerkes durch HUVECs beobachten, die zusammen mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Blut der Nabelschnur in Matrixgel kultiviert wurden (180).

### **5.2.3 Makrophagen in der Kollagenmembran**

Makrophagen entstehend entweder durch die Proliferation lokaler Gewebemakrophagen oder durch Differenzierung von im Blut zirkulierenden Monozyten, die ihren Ursprung im Knochenmark haben (53, 181, 182). Letztere differenzieren in dem Zielgewebe durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder mikrobielle Produkte der dort vorherrschenden Mikroumgebung (53, 183, 184). Anschließend sind sie in der Lage, unterschiedliche Funktionen, wie die Phagozytose, Antigenpräsentation und Produktion verschiedener pro- beziehungsweise anti-inflammatorischer Zytokine, wahrzunehmen, (182, 185, 186). Dadurch

sind sie in der Lage, die Wundheilung, Geweberegeneration, Angiogenese oder immunmodulatorische Prozesse zu beeinflussen (184, 187, 188). Makrophagen werden entsprechend ihres Wirkungsprofils in pro-inflammatorische M1-Makrophagen und anti-inflammatorische M2-Makrophagen eingeteilt (181, 185-187). Jedoch besitzen diese Zellen eine hohe Plastizität, weshalb sie innerhalb des Polarisierungsspektrums jederzeit durch sich verändernde äußere Stimuli in den jeweils anderen Polarisierungszustand übergehen können (184). Durch ihre Fähigkeit, im Rahmen der Wundheilung sowohl fördernd als auch hemmend aktiv zu sein, sollten sie eine zentrale Rolle in dieser Arbeit einnehmen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Makrophagen innerhalb eines 3D-Hautmodells auf Basis einer Kollagenmembran untersucht. In dem ersten Ansatz wurden die Makrophagen in Monokultur kultiviert. Dazu wurden die Kollagenmembranen am ersten Tag mit Makrophagen besiedelt und nach drei Tagen zur Färbung entnommen. Allerdings konnten hierbei bereits keinerlei Zellen innerhalb der Membranen nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der Wahl des Zellkulturmediums liegen. Um einheitliche Bedingungen für alle Kulturen zu gewährleisten, wurde ein HUVEC-Medium verwendet. Dieses Medium enthält jedoch keine Zytokine, die unter physiologischen Bedingungen als Stimulatoren für Makrophagen fungieren. Das Fehlen dieser Stimuli könnte die Abwesenheit von Zellen in der anschließenden Auswertung erklären.

Ein ähnliches Bild ergab sich in der Auswertung der Kollagenmembranen die mit einer Tri-Kultur aus Fibroblasten, HUVECs und M1-Makrophagen besiedelt wurden. Für die Analyse wurden die Kollagenmembranen an Tag 24 entnommen und immunhistochemisch mit Hilfe eines CD45 Antikörpers angefärbt. Auf den Schnitten dieser Membranen konnten jedoch ebenfalls keine Makrophagen innerhalb der Matrices nachgewiesen werden.

Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass das Fehlen eines inflammatorischen oder anti-inflammatorischen Reizes als ursächlich für das negative Versuchsergebnis erachtet werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen differenzierten unter physiologischen Bedingungen aus den im Blut des Spenders zirkulierenden Monozyten. Im Gegensatz zu residualen Makrophagen besitzen diese Monozyten allerdings nicht die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (189, 190). In der logischen Konsequenz findet mutmaßlich ohne dauerhaften inflammatorischen oder anti-inflammatorischen Stimulus die Apoptose/Nekrose der verwendeten Makrophagen monozytärer Herkunft statt (51).

Zu der Kultivierung von Makrophagen innerhalb von 3D-Hautäquivalenten basierend auf festen Kollagenmembranen liegen bislang wenige Daten vor. Für die Untersuchung dieser Zellen innerhalb von 3D-Modellen wurde in vorangegangenen Studien vermehrt auf ein Hydrogel als Trägermaterial zurückgegriffen (191-195). Sapudom et al. untersuchten die

Einflüsse von M2a- beziehungsweise M2c-Makrophagen auf Fibroblasten und Myofibroblasten innerhalb einer 3D-Kollagenmatrix, die mit 2 mg/ml eine ähnliche Dichte besaß, wie das Kollagengel, welches in dieser Arbeit verwendet wurde (193). Sie konnten nachweisen, dass innerhalb der Co-Kultur von M2a-Makrophagen und Fibroblasten innerhalb der Matrix vermehrt TGF- $\beta$ 1 durch die Makrophagen ausgeschüttet wird, wodurch die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten induziert wurde (193). Gleichzeitig konnte eine Dedifferenzierung der Myofibroblasten innerhalb der Co-Kultur aus M2c-Makrophagen und Myofibroblasten nachgewiesen werden (193). Auch andere Arbeiten beschäftigten sich mit dem Verhalten von Makrophagen in 3D-Kulturen. Ollington et al. beschreiben ein orales Schleimhautäquivalent, in dem unpolarisierte Makrophagen und orale Fibroblasten in einem aus Rattenschwänzen isolierten Typ I Kollagengel kultiviert wurden. Nach Aufbringen von Keratinozyten auf die Geloberfläche, entwickelte sich ein geschichtetes Epithel (192). Im Anschluss gaben die Autoren unterschiedliche Stimulantien zu dem Kultivierungsmedium hinzu. Es zeigte sich, dass die Makrophagen durch eine Stimulation mit LPS vermehrt TNF- $\alpha$  ausschütteten (192) – ein Verhalten, das sich mit den Erkenntnissen der pro-inflammatorischen Resonanz der Makrophagen auf die Stimulation mit LPS in der Literatur deckt (51, 59). Die Ergebnisse von Ollington et al. zeigen zudem, dass Makrophagen durchaus in der Lage sind, innerhalb von Kollagen-basierten 3D-Matrices ihr Verhalten und damit ihre Polarisierung durch gezielte Stimulation zu verändern. Die Daten untermauern zudem die Annahme, dass Makrophagen ohne einen geeigneten Stimulus nicht überlebensfähig sind.

Die in dieser Arbeit verwendete Co-Kultur aus Makrophagen, Fibroblasten und HUVECs wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Jedoch bietet die Studie von Isali et al. interessante Ansätze für die Kultivierung unterschiedlicher Zellen innerhalb einer Kollagenmembran (196). Die Arbeitsgruppe untersuchte innerhalb einer 2D-Zellkultur die Effekte der von den verschiedenen Subpopulationen der M2-Makrophagen in einer Bi-Kultur ausgeschütteten Zytokine auf einerseits Fibroblasten und andererseits HUVECs (196). Innerhalb der Co-Kultur der Fibroblasten mit durch IL-10 stimulierte Makrophagen konnten eine verstärkte Produktion von löslichem Kollagen in dem Medium sowie größere Mengen an Kollagen in der Extrazellulärmatrix nachgewiesen werden (196). Dahingegen wurde in der Co-Kultur von HUVECs mit durch IL-4, IL-13 sowie 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin stimulierte Makrophagen einerseits eine vermehrte Ausbildung von tubulären Gefäßstrukturen beobachtet und andererseits eine Erhöhung von intrazellulären Adhäsionsmolekülen und CD31 nachgewiesen (196). Dies deutet auf eine vermehrte endotheliale Zellaktivität in der Gruppe hin. Zudem weisen diese Erkenntnisse auf die Notwendigkeit der Auseinandersetzung mit den Subpopulationen der M2-Makrophagen bezüglich ihrer vielschichtigen Einflussnahme auf entzündliche Prozesse hin; die Auswahl der Makrophagenpopulation scheint einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse eines Versuchs zu haben. Weiterhin gibt die

beschriebene Studie Aufschluss über mögliche geeignetere Kultivierungsbedingungen für die Bi-Kulturen aus Makrophagen und Fibroblasten beziehungsweise HUVECs. Isali et al. verwendeten eine 1:1 Mischung aus dem Makrophagenmedium mit HUVEC- oder Fibroblastenmedium (196). Das Makrophagenmedium bestand dabei aus DMEM/F12 mit folgenden Zusätzen: 20 % L929-konditioniertem Medium, 10 % FCS und 1 % P/S (196). Für das L929-konditionierte Medium wurden zuvor L929 Fibroblasten für 3 Tage in eigenem Medium (DMEM/F12, 10 % FCS, 1 % P/S, 20 mM L-Glutamin) kultiviert, wodurch es mit M-CSF angereichert wurde (196). Demnach erhielten die verwendeten M2-Makrophagen nach ihrer Differenzierung lediglich M-CSF als stimulierenden Faktor der Zellen. Durch den Mix der beiden Medien konnten die jeweils beinhalteten Zellpopulationen die spezifischen benötigten Wachstumsfaktoren, Zytokine und Nährstoffe erhalten. Diese Vorgehensweise könnte ebenfalls auf das Modell der vorliegenden Arbeit angewendet werden, das Problem der fehlenden Stimulanzen beheben und damit einen potentiellen Ansatz für künftige Bi-Kulturen darstellen.

#### **5.2.4 Fazit 3D-Hautmodell auf Basis einer Kollagenmembran**

Die Untersuchung der Auswirkungen extrakorporaler Stoßwellen auf die Polarisierung von Makrophagen konnte aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit der Makrophagen in dem verwendeten 3D-Hautmodell auf Basis einer Kollagenmembran nicht weitergeführt werden. Die Kultivierung der Makrophagen sowohl in Monokultur als auch in Tri-Kultur zusammen mit Fibroblasten und HUVECs erwies sich als äußerst herausfordernd. Vorarbeiten an einer 2D-Zellkultur mit Co-Kulturen aus Makrophagen und HUVECs beziehungsweise Fibroblasten lieferten jedoch vielversprechende Ansätze für zukünftige Experimente, obwohl eine Tri-Kultur in der Literatur bislang nicht beschrieben wurde.

Angesichts der begrenzten Datenlage zu dem Verhalten von Makrophagen innerhalb einer Kollagenmembran wurde entschieden, einen alternativen Versuchsaufbau zu verfolgen. Basierend auf vielversprechenden Studien zur Kultivierung von Makrophagen in Hydrogelen (191, 193-195) wurde ein Kollagengel-basiertes 3D-Hautäquivalent etabliert. In diesem System wurden Makrophagen zunächst auf einer Zellkulturplatte zu M1-Makrophagen differenziert und anschließend in ein bovines Kollagengel eingebracht. Die Analyse erfolgte in drei Vergleichsgruppen, um neue Erkenntnisse über das Verhalten und die Polarisierung der Makrophagen unter diesen Bedingungen zu gewinnen.

### 5.3 Hydrogele als Basis von 3D *in vitro* Hautmodellen

Hydrogele finden aufgrund multipler Vorteile vermehrt Anwendung in der Erstellung von 3D-Hautmodellen. Zum einen sind sie biokompatibel und hydrophil, wodurch eine Verwendung in der Zellkultur möglich ist (197). Zum anderen ermöglichen sie eine realitätsnahe Simulation der EZM sowie eine Steuerung der Mikroumgebung durch eine kontrollierbare Freisetzung unterschiedlicher Zusätze wie beispielsweise Wachstumsfaktoren (197-200). Diese können wie in der vorliegenden Arbeit entweder direkt in das Gel integriert werden oder über Diffusion aus dem Medium in das Gel gelangen.

Eine der Eigenschaften von Hydrogelen, der in den letzten Jahren in der Literatur immer mehr Beachtung geschenkt wurde, ist ihre Steifigkeit. Meist besitzen die verwendeten Materialien zwecks einfacher Handhabung bei der Auslieferung durch den Hersteller eine geringe Steifigkeit. Durch eine kontrollierte Quervernetzung der enthaltenen Moleküle kommt es dann in Zuge der Kultivierung zu einer Erhöhung der Steifigkeit. Dabei können viele verschiedene Stimuli diese Vernetzung initiieren, wie beispielsweise eine Veränderung von Temperatur oder pH-Wert, spezielle Wellenlängen einer Lichtquelle sowie elektrische oder magnetische Reize (197, 201). Gleichzeitig lässt sich die Steifigkeit eines Hydrogels neben den genannten Initiationsstimuli durch eine Veränderung des Molekulargewichts der enthaltenen Moleküle oder das Einbringen von Nanomaterialien anpassen (202-206). Die so erreichten Steifigkeiten variieren je nach Material und Quervernetzungsgrad zwischen einigen Hundert Pa und 25 GPa, wobei sich kollagenhaltige Hydrogele eher im unteren Spektrum der Steifigkeit befinden (207).

Viele Studien befassen sich mit dem Einfluss der Steifigkeit auf das Verhalten von verschiedenen Zelltypen. Zhan et al. zeigten in ihrer Arbeit eine erhöhte Zellviabilität und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen (MSZ), die in einem Hydrogel mit erhöhter Steifigkeit kultiviert wurden (208). Ebenfalls konnten Liu et al. nachweisen, dass MSZ in einem Gel hoher Steifigkeit eine bessere Zellviabilität besitzen und eine erhöhte Zelladhäsion aufweisen (209). Gleichzeitig zeigen MSZ in Gelen hoher Steifigkeit die Tendenz zu einer Differenzierung zu Osteoblasten, wohingegen sie in Gelen mit niedrigen Steifigkeitswerten vermehrt zu Chondrozyten oder Adipozyten differenzieren (210-213). Auch andere Zellentypen wie Fibroblasten und Makrophagen werden durch eine veränderte Beschaffenheit der Gelstrukturen beeinflusst. Ibañez et al. zeigten in diesem Zusammenhang eine vermehrte Expression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) sowie der EZM-Proteine Kollagen-III und Fibronectin I durch Fibroblasten nach Erhöhung der Steifigkeit des verwendeten Gelatin Methacrylat Hydrogels (214). Eine solch vermehrte Expression ist charakteristisch für eine überschießende Myofibroblastenaktivität im Rahmen einer veränderten Wundheilung, die zu einer vermehrten Narbenbildung führen kann (214).

Für diese Arbeit ist die Beeinflussung der Makrophagen von besonderer Bedeutung. Verschiedene Studien beschreiben eine Umpolarisierung von anti-inflammatorischen M2- zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen durch eine Erhöhung der Steifigkeit des verwendeten Hydrogels (215-217). Gleichzeitig schildern Zhuang et al. eine vermehrte Expression von iNOS und TNF- $\alpha$  in härteren Hydrogelen (217). Weiterhin wird von Previtiera et al. bei der Untersuchung von durch LPS beziehungsweise TNF- $\alpha$  stimulierten Makrophagen eine vermehrte Expression von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und IL-6 in durch eine Erhöhung der Steifigkeit des verwendeten Gels beobachtet (218).

Zusammenfassend lässt sich ein deutlicher Einfluss der Steifigkeit der verwendeten Hydrogele auf Fibroblasten und Makrophagen feststellen und damit weiterführend ein Zusammenhang zwischen der Steifigkeit des Materials und den Prozessen der Wundheilung ableiten. Insofern erscheint die Wahl eines weniger steifen Hydrogels zur Prävention der Umpolarisierung der Makrophagen zu M1-Makrophagen sinnvoll. Potentiell durch die angewandte ESWT polarisierte M2-Makrophagen könnten ansonsten durch ein zu steifes Gel wieder in M1-Makrophagen umpolarisiert werden; der Effekt der Stoßwellentherapie auf die Zellen wäre demnach verfälscht.

In dieser Arbeit wurde ein bovines Typ I Kollagengel mit einer Konzentration von 3 mg/ml verwendet. Durch das Ansetzen der Gel-Lösung ergab sich eine Konzentration von 2,23 mg/ml. Der Hersteller gibt eine Steifigkeit des Hydrogels bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml von 290 Pa und eine Steifigkeit von 160 Pa bei einer Konzentration von 2 mg/ml an (219). Bei der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 2,23 mg/ml wird daher eine Steifigkeit von etwa 220 Pa erwartet. Dieser Wert liegt somit in der Nähe der in der Literatur angegebenen unteren Grenze der Steifigkeitswerte humaner Haut von 360 Pa (156). Demnach scheint das verwendete Gel adäquat, um sowohl Rücksicht auf eine geringe Steifigkeit zu nehmen als auch nicht zu weit von der Steifigkeit humaner Haut abzuweichen.

In Folgendem soll der zweite Teil dieser Arbeit diskutiert werden, dessen Fokus auf der Beeinflussung des Phänotyps der Makrophagen durch die ESWT lag. Gleichzeitig sollte ein potentieller Einfluss des verwendeten Hydrogels als Stimulus auf die Polarisierung der Zellen untersucht werden. Um diese Informationen gewinnen zu können wurde bewusst auf ein komplexeres Modell in Co-Kultur mit anderen Zelltypen verzichtet.

#### **5.4 3D-Hautmodell auf Basis eines bovinen Kollagengels**

Die Kultivierung von Zellen in einem Kollagengel im Vergleich zu der Besiedlung einer Kollagenmembran hat einige anwendungsspezifische Vorteile. Bei 4 °C befindet sich das Gel in einem flüssigen Zustand. In dieser Form lassen sich die Makrophagen in die Gel-

Suspension überführen und können so in ein Well einer Zellkulturplatte übertragen werden. Erst im Anschluss härtet das Gel bei 37 °C in einem Brutschrank aus. Dabei wird es stabil genug, um der mechanischen Beanspruchung durch die ESWT zu widerstehen. Gleichzeitig ist nach Beendigung des Versuchsablaufes eine Isolation der Zellen durch eine Verdauung der Kollagenmatrix mittels Kollagenase möglich. Dadurch lassen sich die Makrophagen individuell untersuchen. Auf diese Weise können die vorliegenden Subpopulationen der Zellen präziser voneinander differenziert werden. Zudem benötigen die Zellen, verglichen mit der Anwendung einer Kollagenmembran als *Scaffold*, keine Zeit, um die Matrix zu durchwandern. Stattdessen sind sie durch die angefertigte Suspension gleichmäßig in der Matrix verteilt. Das Kollagengel selbst kann dabei ebenso wie das Zellkulturmedium mit Nährstoffen sowie verschiedenen Stimulantien für die Makrophagen versehen werden. Durch Diffusion der Inhaltsstoffe aus dem Zellkulturmedium in das Kollagengel ist eine dauerhafte Versorgung der Zellen gewährleistet, die essentiell für das Überleben der Makrophagen über die Dauer der Kultivierung ist.

#### **5.4.1 Stoßwellenapplikation**

Der Applikation von ESWT wird ein positiver Effekt auf das behandelte Gewebe zugeschrieben, welcher seinerseits auf eine verbesserte Geweberegeneration, Angiogenese und Zellproliferation zurückgeführt werden kann (14, 25, 98, 99). Nach der Behandlung mit Stoßwellen wurde die Hochregulation von VEGF, SDF-1 und HIF-1 $\alpha$  beobachtet, die eine erhöhte Migration von endothelialen Vorläuferzellen bedingt und damit die Vaskularisierung des Gewebes befördert (97, 99, 106). Gleichzeitig konnte *in-ovo* eine erhöhte Konzentration von MMP-9 nach ESWT nachgewiesen werden (14), das sowohl an der Aktivierung von VEGF als auch an der Zersetzung der EZM Anteil hat (105, 107) und damit die Prozesse der Angiogenese maßgeblich beeinflusst. Diese Beobachtungen der verbesserten Vaskularisierung durch ESWT wird durch Daten aus *in-vivo* Studien unterstützt (16, 103, 104). So konnten beispielsweise Wang et al. im Vergleich zu einer unbehandelten Vergleichsgruppe durch eine einmalige Anwendung von ESWT (0,18 mJ/mm<sup>2</sup>, 1.000 Impulse) an dem Ansatz der Achillessehne von Hunden nach vier beziehungsweise acht Wochen Gefäßneubildungen nachweisen (103).

Weiterhin zeigte die Applikation der ESWT bereits in zahlreichen Studien einen positiven Effekt auf entzündliche Reaktionen der Haut (220-223). Ko et al. untersuchten die Wirkung von rESWT (0,1–0,15 mJ/mm<sup>2</sup>, 8 Hz, 2.000–12.000 Impulse) und fESWT (0,1–0,15 mJ/mm<sup>2</sup>, 3 Hz, 1.000–6.000 Impulse) an 52 Patienten mit dermalen beziehungsweise subdermalen Fibrosen an unterschiedlichen Regionen des Körpers (221). Dabei konnte eine Verbesserung sowohl des klinischen Erscheinungsbildes als auch funktioneller Bewegungen festgestellt

werden (221). Auch in der Behandlung diabetischer Wunden konnten vielversprechende Ergebnisse durch die Behandlung mit ESWT erbracht werden (224, 225). In einem Rattenmodell mit Streptozocin-induziertem Diabetes konnten Chen et al. durch die Behandlung mit ESWT (0,09 mJ/mm<sup>2</sup>, 800 Impulse) im Vergleich zu einer unbehandelten Vergleichsgruppe eine verkleinerte Wundfläche sowie eine erhöhte Neovaskularisation und verringerte entzündliche Reaktion beobachten (224). Diese Ergebnisse decken sich in Teilen mit den Ergebnissen von Vangaveti et al., deren Arbeitsgruppe diabetische Fußulzera von 48 Patienten entweder mit dem Therapiestandard oder mit einer Kombination aus ESWT (0,11 mJ/mm<sup>2</sup>, 5 Hz, 100 Impulse) und dem Therapiestandard behandelten (223). In der Gruppe, die mit ESWT behandelt wurden, fanden sich verglichen mit denen der Standardtherapie nach 6 Wochen mehr Patienten mit ausgeheilten Läsionen; die Ergebnisse erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (223). Ähnliche Resultate zeigen Wu et al. in einer Metaanalyse, in der sie die Therapie eines diabetischen Fußulcus mittels ESWT mit dem ansonsten durchgeführten Therapiestandard nach internationalen Richtlinien verglichen (225). In der Durchsicht aller eingeschlossenen Studien zeigten sich signifikant mehr ausgeheilte Läsionen in der Gruppe der durch ESWT behandelten Patientengruppe (225). In der Metaanalyse von Charles et al. konnte nach einer Behandlung der Plantarfasziitis mit ESWT eine Verbesserung der Funktion sowie eine Reduktion der Schmerzen der Patienten nachgewiesen werden (226).

Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen für die aufgezeigten klinisch beobachteten und die Wundheilung positiv beeinflussenden Effekte der ESWT sind jedoch noch nicht eindeutig aufgeschlüsselt. Einige Studien bieten jedoch vielversprechende Ansätze für die Erklärung des beobachteten anti-inflammatorischen Effektes nach einer Behandlung mit ESWT. In diesem Zusammenhang beobachteten Ciampa et al. *in-vitro* nach der Behandlung von murinen Gliomzellen eine reduzierte NF-κB-Aktivierung und NF-κB abhängigen Genaktivierung und daraus folgend eine verminderte Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, wie TNF-α und iNOS (109). Andere Arbeitsgruppen konnten eine durch ESWT induzierte Modulation der Entzündungsreaktion nachweisen, die sich unter anderem durch eine herunterregulierte Leukozyteninfiltration (111) oder eine Stimulation des TLR3 Signalwegs äußerte (110).

Gleichzeitig kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten wundheilungsfördernden Effekte durch die ESWT aus einem Zusammenspiel aller oben aufgeführten Beobachtungen resultieren und nicht durch einen einzelnen Zelltyp oder Mechanismus mediiert werden.

#### 5.4.1.1 Auswahl der Parameter der ESWT

Verschiedene Parameter können in der Durchführung der ESWT eingestellt und angepasst werden. Die Auswahl der in dieser Arbeit angewendeten Einstellungen soll im Folgenden diskutiert werden.

Die verwendete EFD wurde häufig unterhalb von  $0,13 \text{ mJ/mm}^2$  gewählt (14, 129, 221, 223). Dahingehend untersuchten Cai et al. die Zellviabilität beziehungsweise Proliferation von humanen Fibroblasten nach der Stoßwellenbehandlung mit unterschiedlichen Impulszahlen (100, 300 und 500) und EFD ( $0,05 \text{ mJ/mm}^2$ ,  $0,1 \text{ mJ/mm}^2$  und  $0,19 \text{ mJ/mm}^2$ ) (227). Die Arbeitsgruppe konnte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Zellviabilität der untersuchten Zellpopulationen, die verschiedene Kombinationen der angegebenen Parameter erhielten, feststellen. Gleichzeitig zeigte die Anwendung verschiedener EFD ( $0,05 \text{ mJ/mm}^2$ ,  $0,1 \text{ mJ/mm}^2$  und  $0,19 \text{ mJ/mm}^2$ ) keine Unterschiede in der gemessenen Genexpression von IL-6, IL-8 oder CC-Chemikin-Ligand-2 (227). Im Gegensatz dazu berichten Mattyasovszky et al. von einem negativen Effekt auf die Zellviabilität bei zweifacher Anwendung einer ESWT mit einer EFD von  $0,14 \text{ mJ/mm}^2$  (228). Ebenfalls beobachteten Martini et al. eine reduzierte Zellzahl nach Stoßwellenbehandlung mit einer EFD von  $0,31 \text{ mJ/mm}^2$  (229). Die Anwendung einer zu hohen EFD scheint sich demnach negativ auf die Viabilität der Zellen auszuwirken. In ähnlicher Weise beschreiben Rompe et al. negative Effekte auf Achillessehnen von Hasen nach der Behandlung mit ESWT mit 1000 Impulsen und einer EFD von  $0,6 \text{ mJ/mm}^2$  (230). Die Autoren schildern verglichen mit den Vergleichsgruppen, die mit einer EFD von  $0,08 \text{ mJ/mm}^2$  beziehungsweise  $0,28 \text{ mJ/mm}^2$  behandelt wurden, einen vergrößerten anteroposterioren Durchmesser der Sehne sowie histologische Zeichen einer fibrinoiden Nekrose und einer Infiltration inflammatorischer Zellen (230). EFD-Werte größer als  $0,28 \text{ mJ/mm}^2$  beziehungsweise  $0,31 \text{ mJ/mm}^2$  scheinen daher vermehrt destruktive Effekte auf das behandelte Gewebe zu haben. Gleichzeitig sollte die EFD hoch genug gewählt werden, um einen möglichst großen therapeutischen Effekt zu erzielen. So zeigen Ciampa et al., dass die höchste gemessene Enzymaktivität von NOS in dem Zytosol muriner Gliomzellen erst bei der Verwendung einer EFD von  $0,03 \text{ mJ/mm}^2$  beziehungsweise  $0,11 \text{ mJ/mm}^2$  gemessen werden konnte (109). Auf Basis der vorliegenden Daten wurde in dieser Arbeit daher eine EFD von  $0,12 \text{ mJ/mm}^2$  verwendet.

Die Anzahl der Impulse wird in verschiedenen Studien sehr unterschiedlich angegeben und reicht von 100 bis 12.000 Impulsen, wobei sowohl für niedrige als auch für hohe Impulszahlen positive Effekte nach einer Behandlung mit ESWT beschrieben wurden (221, 223, 227, 231). Größere Impulszahlen finden besonders in klinischen Studien an größeren Hautdefekten Anwendung (221, 223), wobei die Größe des zu behandelnden Areals einen maßgeblichen Einfluss auf die Auswahl der Anzahl der Impulse hat. Impulszahlen über 1.500 fanden daher

in *in-vitro* Studien wenig Anwendung. In diesen wurden meist 100 bis 1.500 Impulse verwendet (109, 110, 227, 232). In der oben aufgezeigten Studie von Cai et al. beschreiben die Autoren nach 24 Stunden unter Verwendung einer EFD von  $0,05 \text{ mJ/mm}^2$  und verschiedenen Impulszahlen (100, 300 und 500) keine Unterschiede in der gemessenen Genexpression von IL-6 und CC-Chemikin-Ligand-2, jedoch eine signifikant erhöhte Expression von IL-8 in der Gruppe, die mit 500 Impulsen therapiert wurde, sowie eine erniedrigte Expression von TNF- $\alpha$  in den Gruppe, die mit 300 beziehungsweise 500 Impulsen behandelt wurden (227). Zusätzlich wurden die höchsten Werte der gemessenen IL-8 Konzentration des Zellkulturüberstandes in der Gruppe gemessen, die mit 500 Impulsen behandelt wurde (227). Die Verwendung von 500 Impulszahlen scheint demnach vielversprechendere Ergebnisse zu produzieren. Ähnliche Ergebnisse zeigt die Studie von Ciampa et al., in der die höchste Enzymaktivität an NOS nach der Behandlung mit ESWT sowohl mit einer EDF von  $0,03 \text{ mJ/mm}^2$  als auch von  $0,11 \text{ mJ/mm}^2$  unter Verwendung von 500 Impulsen, verglichen mit 1.000 und 1.500 Impulsen, die höchste Enzymaktivität an NOS gemessen wurde. Aus der Analyse der diskutierten Studien scheint demnach die Verwendung von 500 Impulsen in der Anwendung der ESWT in dieser Arbeit als vielversprechend.

In vielen *in-vitro* Studien, die sich mit der Wirkung der ESWT beschäftigten, fand eine einfache Anwendung statt (24, 109, 227, 233-235). Dabei wurden in den meisten Studien eine Einflussnahme der ESWT auf die jeweils untersuchten Effektgrößen aufgezeigt. So beschreiben Sukubo et al. nach einmaliger Anwendung eine Dämpfung pro-inflammatorischer sowie eine verstärkte Ausbildung anti-inflammatorischer Gene (24). Gleichermäßen zeigen auch Weihs et al. nach einmaliger Applikation der ESWT einen Anstieg an freigesetztem ATP in das Zellkulturmedium, eine erhöhte Aktivierung von ERK1/2 und p38 MAPK sowie eine gesteigerte Proliferation der untersuchten Zelltypen (humane Jurkat T-Zell-Zelllinie, murine mesenchymale Stammzellen und humane Fettgewebstammzellen) (234). Hingegen findet in klinischen Studien auch häufig eine mehrfache Applikation der ESWT statt. Begründet werden kann dies mitunter in der einfacheren Anwendung der ESWT in *in-vivo* Studien verglichen mit der in *in-vitro* Studien. Letztere erforderten in einigen Studien eine Überführung der zu behandelnden Zellen von der Zellkulturplatte, auf der sie kultiviert wurden, in ein Röhrchen, indem die Zellen dann in Suspension vorlagen, um sie anschließend mit der ESWT zu behandeln, wie beispielsweise durch Weihs et al. (234), Yu et al. (235) oder Basoli et al. (236) beschrieben. Anschließend wurden die Zellen wieder auf eine Zellkulturplatte überführt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachfolgend analysiert (234-236). Eine weitere Applikation von ESWT hätte ein erneutes Ablösen und Überführen der Zellen bedeutet. In den Ergebnissen der Studien wäre es mitunter schwer geworden, die Einflüsse des mehrmaligen Transfers der Zellen von denen der ESWT zu differenzieren. In klinischen Studien fand im Gegensatz dazu eine Applikation der ESWT auf das zu untersuchende Gewebeareal statt; eine Manipulation

der Ergebnisse durch zellkulturbedingte Einwirkungen ist ausgeschlossen. In Tierstudien hingegen fand häufig nur eine einmalige Behandlung statt, wobei in diesen die Überlegenheit der mehrfachen Anwendung gegenüber der einfachen nicht eindeutig geklärt ist. So konnten beispielsweise Kuo et al. keinen Einfluss einer mehrfachen Applikation verglichen mit einer einfachen Anwendung der ESWT auf die Reduktion der nekrotischen Areale in einem dorsalen Hautlappenmodell von Ratten feststellen (222). Im Gegensatz dazu beobachteten de Lima Morais et al. eine Förderung der Kollagen und Angiogenese sowie eine Hochregulation des Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 in der Haut von Ratten nach Behandlung mit ESWT, wobei die beschriebenen Effekte nach zweifacher Applikation im Vergleich zu einer einfachen Anwendung stärker ausfielen (220). In Metaanalysen humaner Studien, wie die zu der Wirkung der ESWT als Therapie diabetischer Fußulzera durch Huang et al. (237) oder der zur Analyse der Effektivität der ESWT in der Behandlung von Patellatendinopathie, Achillessehnentendinopathie oder einer Plantarfasziitis durch Charles et al. (226), wurden ausschließlich Studien mit mehreren Applikationen der Stoßwelle eingeschlossen.

Nach der Durchsicht der vorliegenden Studien wurde in der vorliegenden Arbeit eine einmalige Applikation der ESWT angewendet. Allerdings erlaubt der Versuchsaufbau in der Theorie eine mehrfache Anwendung der ESWT, ohne dass eine wiederholte zusätzliche Manipulation der Zellen notwendig wäre; zwecks der Vergleichbarkeit mit anderen *in-vitro* Studien wurde jedoch auf eine mehrfache Anwendung der ESWT verzichtet.

#### **5.4.1.2 Auswertung der Oberflächenmoleküle der Makrophagen**

Um eine Veränderung der Polarisierung der verwendeten M1-Makrophagen durch die Behandlung mit ESWT bestimmen zu können, wurden vier verschiedene Oberflächenmoleküle der Zellen analysiert, deren vermehrte Ausprägung charakteristisch für M1- beziehungsweise M2-Makrophagen ist. CD86 wird vornehmlich durch pro-inflammatorische M1-Makrophagen ausgebildet (238) und bietet daher Aufschluss über deren Anteil an der Gesamtzellzahl.

Im Gegensatz dazu werden CD209, CD200R und CD163 vermehrt durch M2-Makrophagen exprimiert (68, 239, 240), die, wiederum abhängig von dem aktivierenden Stimulus, in M2a, M2b, M2c und M2d unterteilt werden (184, 241, 242). Eine Aktivierung mit IL-4 oder IL-13 induziert den M2a Subtyp, der durch die Ausbildung von CD206 und CD200R an seiner Oberfläche sowie durch die Sekretion von CCL17, TGF- $\beta$ , *Insulin Like Growth Factor*, IL-10 und Fibronectin gekennzeichnet ist und somit maßgeblichen Einfluss auf die Wundheilung und die Remodellierung des Gewebes hat (184, 185, 243, 244). Der M2b Subtyp wird dagegen durch IL-1 $\beta$  oder eine kombinierte Exposition zu Immunkomplexen und TLR-Agonisten induziert und besitzt vor allem immunregulatorische Eigenschaften, die unter anderem durch eine vermehrte Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und CCL1 gesteuert wird (62, 78,

185). Interessanterweise wird CD86 ebenfalls als Marker für M2b Makrophagen beschrieben (58). Eine Induktion von M2c Makrophagen kann hingegen durch IL-10, TGF- $\beta$  oder Glukokortikoide erfolgen (181, 184, 245). Durch die Ausschüttung von IL-10 sowie TGF- $\beta$  besitzen diese Zellen anti-inflammatorische beziehungsweise anti-fibrotische Eigenschaften. Zudem ist dieser Makrophagen-Subtyp durch eine hohe Expression der Mer Rezeptor Tyrosin Kinase in der Lage, effektiv Phagozytose zu betreiben (184, 246). Der Subtyp der M2d Makrophagen wird durch eine Kostimulation von TLR-Liganden und Adenosinrezeptor-Liganden induziert (243, 247, 248) und ist durch eine erhöhte IL-10-, VEGF- sowie eine erniedrigte Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-12 gekennzeichnet (242, 243, 247, 249, 250), wodurch er pro-angiogene Eigenschaften besitzt. Gleichzeitig werden die Makrophagen dieses Subtyps mit pro-tumoralen Effekten in Zusammenhang gebracht (251).

Aufgrund der hohen Plastizität der Makrophagen sind die Zellen jedoch in der Lage, ihre Polarisierung durch eine variierende Exposition von M1- beziehungsweise M2-Stimuli der Mikroumgebung zu verändern (184). In den komplexen Abläufen physiologischer Prozesse ist daher ein Spektrum an verschiedenen Makrophagen-Subtypen anzutreffen, wobei in der Analyse spezifische Oberflächenmarker, Gene und/oder ausgeschüttete Zytokine für deren Differenzierung Anwendung finden (78, 238, 240, 242, 245).

Die in dieser Arbeit zur Charakterisierung der M2-Makrophagen ausgewählten Oberflächenmoleküle CD209, CD200R und CD163 werden in unterschiedlichen Subtypen verschieden stark exprimiert. CD209 und CD163 wird verstärkt in M2c-Makrophagen ausgebildet (58, 251-254). Dagegen wird die Expression von CD200R vor allem durch den Subtyp M2a beschrieben (244, 255). Eine Analyse der Subtypen M2b und M2d erscheint daher mit den ausgewählten Polarisierungsmarkern und unter Berücksichtigung einer fehlenden Untersuchung spezifischer Markergene und/oder ausgeschütteter Zytokine nicht möglich. Jedoch galt es in dieser Arbeit einen potentiellen Zusammenhang des beobachteten anti-inflammatorischen Effektes der ESWT mit der Polarisierung von Makrophagen, im Besonderen einer möglichen Umpolarisierung von M1- zu M2-Makrophagen, durch eine Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen herzustellen. Daher wurden Polarisierungsmarker ausgewählt, die eine Differenzierung von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen (CD86+) und anti-inflammatorischen M2-Makrophagen (M2a: CD200R+; M2c: CD209+, CD163+) ermöglichen.

Die untersuchte Gruppe „unbehandelt“ beinhaltet die differenzierten M1-Makrophagen nach Ablösen von ihrer Zellkulturschale. Im Vergleich zu der Gruppe „ohne ESWT“, in der die Zellen anschließend zwei Tage in dem Kollagengel kultiviert wurden, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Oberflächenmarkern CD86, CD209, CD200R und CD163. Daraus lässt sich ableiten, dass die Kultivierung in einer bovinen Kollagenmatrix selbst keinen signifikanten Einfluss auf die Polarisierung der Makrophagen besitzt.

Gleichzeitig bedeutet dies aber nicht, dass sich Makrophagen innerhalb des Kollagengels in einem statischen Zustand befinden. Die Behandlung der Zellen in der Gruppe „Positivkontrolle Gel“ mit 20 ng/μl IL-4 zeigte einen signifikanten Anstieg der gemessenen MFI des CD200R Antikörpers, was für eine Umpolarisierung der M1- zu M2a-Makrophagen spricht. Hiermit wurde sichergestellt, dass eine Änderung der Polarisierung von Makrophagen in dem bovinen Kollagengel grundsätzlich möglich ist. Eine Umpolarisierung in die anderen Subpopulationen der M2-Makrophagen war nicht zu erwarten, da diese durch andere Stimuli induziert werden, wie oben beschrieben.

#### **5.4.1.3 Vergleich der Positivkontrollen**

Durch die Verwendung der 6 Well Zellkulturplatten mit UpCell™ Oberfläche für die Gruppe „Positivkontrolle Zellkulturplatte“ sollte weiterführend das Polarisierungspotential von auf spezialisierten Platten kultivierten Makrophagen mit denen verglichen werden, die in Kollagengel kultiviert wurden. Die Zellen der Gruppen „Positivkontrolle Gel“ und „Positivkontrolle Zellkulturplatte“ wurden dafür jeweils mit IL-4 stimuliert, um eine M2-Polarisierung der M1-Makrophagen zu provozieren. In der Literatur wird beschrieben, dass durch eine Stimulation mit IL-4 unter anderem die Expression des CD200R auf der Zellmembran der Makrophagen stimuliert wird (76, 256, 257). Ein Anstieg in dem MFI des CD200R Antikörpers war daher durch eine IL-4 vermittelte Stimulation zu erwarten. Dies wird durch die Ergebnisse der Gruppe „Positivkontrolle Gel“ bestätigt, deren Werte signifikant im Vergleich zu denen der „Positivkontrolle Zellkulturplatte“ erhöht waren. Das Polarisierungspotential von Makrophagen, die in Kollagengel kultiviert wurden, scheint demnach größer zu sein als das der Vergleichsgruppe der Zellkulturplatte mit UpCell™ Oberfläche. Im Gegensatz dazu waren die MFI-Messwerte des CD86 Antikörpers in der Gruppe „Positivkontrolle Zellkulturplatte“ signifikant gegenüber denen der in Gel kultivierten Gruppe erhöht. Alle anderen gemessenen Antikörper zeigten in den beiden Vergleichsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

Ziel der Verwendung dieser Zellkulturplatte war es, den beschriebenen Einfluss der enzymatischen Zelldissoziation auf die zu untersuchenden Oberflächenmoleküle der Makrophagen zu verhindern. In der Durchsicht der Daten wurde in der Gruppe „Positivkontrolle Zellkulturplatte“ im Vergleich zu den anderen analysierten Gruppen im FACS weniger Debris nachgewiesen, wodurch eine größere Anzahl intakter Zellen vorlag. Ähnliche Erkenntnisse beschreiben Maeß et al., die den Unterschied der Ablösung von transfektierten Makrophagen von Zellkulturplatten mit UpCell™ Oberfläche mit der enzymatischen Dissoziation von konventionellen Polystyrene Kulturplatten mittels Accutase® verglichen (140). Analysiert wurden die Morphologie und Vitalität der Zellen mittels FACS. Mit Hilfe der *Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction* wurden die Ausprägung bestimmter M1-

beziehungsweise M2-spezifischer Differenzierungsmarker sowie die Effizienz der Transfektion bestimmt. Die Arbeitsgruppe konnte allerdings keine deutlichen Unterschiede der untersuchten Parameter zwischen den beiden Vergleichsgruppen feststellen (140). Jedoch fanden sie in der FACS-Analyse in der Gruppe der Makrophagen, die von den Polystyrene Kulturplatten enzymatisch abgelöst wurden, einen erhöhten Anteil an Debris verglichen mit denen der Kulturplatten mit UpCell™ Oberfläche (140). Maeß et al. begründen diese Beobachtung mit der schonenderen Dissoziation der Zellen von der Kulturplatte mit UpCell™ Oberfläche. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit.

Die beschriebene schonendere Dissoziation der Zellen von den Kulturplatten mit UpCell™ Oberfläche könnte ursächlich sein für die deutlich erhöhten Messwerte des CD86 Antikörpers der Gruppe „Positivkontrolle Zellkulturplatte“ verglichen mit denen der Gruppe „Positivkontrolle Gel“. Eine eindeutige Erklärung für diese Beobachtung konnte nicht gefunden werden. Erklärt werden könnte dies durch die schonende Dissoziation, aufgrund derer mutmaßlich die Zellmembran und deren Oberflächenmoleküle weniger stark beeinträchtigt worden sind, wodurch insbesondere die Integrität des CD86 Moleküls erhalten blieb. Vergleichbare Beobachtungen wurden in der Literatur jedoch nicht beschrieben.

Insgesamt zeigte die Kultivierung auf der UpCell™ Zellkulturplatte einen anderen Einfluss auf die Polarisierung der Makrophagen als die Kultivierung in dem verwendeten bovinen Kollagengel. Demnach scheinen die Kultivierungsgegebenheiten der Makrophagen einen maßgeblichen Einfluss auf deren Polarisierung zu besitzen. Weitere Versuche werden jedoch nötig sein, um diese Beobachtung zu verifizieren.

#### **5.4.1.4 Einfluss der ESWT auf die Differenzierung der Makrophagen**

Die Makrophagen wurden über eine Dauer von einem Tag in dem Kollagengel kultiviert. Anschließend erfolgte die einmalige Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen in der Gruppe „mit ESWT“. Einen Tag später wurden die Zellen aus der Matrix isoliert und mittels FACS untersucht. Dabei zeigten sich im Vergleich der mit und ohne ESWT behandelten Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Analyse des M1-Markers CD86 sowie der M2-Marker CD209, CD200R und CD163. Somit konnte in diesem Versuchsaufbau kein Einfluss der ESWT auf die Polarisierung von M1-Makrophagen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde in der Gruppe „Positivkontrolle Gel“ durch eine Stimulation mit IL-4 ein signifikanter Anstieg der MFI des CD200R Antikörpers beobachtet; eine Umpolarisierung pro-inflammatorischer M1-Makrophagen zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen ist somit innerhalb des Kollagengels grundsätzlich möglich.

In der einzigen vergleichbaren Studie, die den potentiellen Effekt der ESWT auf die Makrophagenpolarisation untersucht hat, zeigten Sukubo et al., dass die Behandlung mit

extrakorporalen Stoßwellen zu einer signifikanten Erniedrigung von M1-Markergenen (CD80, COX2, CCL5) führt und einen verstärkenden Effekt auf M2-Markergene (ALOX15, MRC1, CCL18) besitzt (24). Gleichzeitig konnte die Arbeitsgruppe keine Aktivierung von M0-Makrophagen feststellen. In dem dabei verwendeten Modell wurden die Zellen in einer Zellkulturflasche kultiviert. Für die Stoßwellenapplikation erfolgte anschließend die vollständige Füllung der Flasche mit Medium; diese wurde in einem mit entgastem Wasser gefülltem Gefäß platziert. Die Stoßwellen wurden mit einem Abstand von 5 cm und einer EFD von  $0,1 \text{ mJ/mm}^2$  beziehungsweise  $0,03 \text{ mJ/mm}^2$ , einer Frequenz von 3,5 Hz/s und insgesamt 400 Impulsen auf die Zellen appliziert (24). Der Versuchsaufbau unterscheidet sich jedoch wesentlich von dem der vorliegenden Arbeit. Die maßgeblichen Unterschiede sollen im Folgenden näher erläutert werden: Aus den bisherigen Daten zur Wirkungsweise der ESWT wird deutlich, dass es sich bei der Mechanotransduktion um einen potentiell wichtigen Einflussfaktor für die biologische Wirkung von extrakorporalen Stoßwellen handelt (22, 258). Dabei erzeugt die ESWT einen mechanischen Stimulus auf das Gewebe. Die Umwandlung dieser mechanischen Energie in ein biologisches Signal der Zelle wird als Mechanotransduktion bezeichnet (22). Über zwei hauptverantwortliche Mechanismen können die Zellen mechanische Stimuli wahrnehmen und eine spezifische biologische Antwort darauf erzeugen: zum einen durch Zell-Matrix-Verbindungen, den Fokalkontakten, die das Aktin-Zytoskelett der Zelle mit der EZM verbinden und zum anderen durch Zell-Zell-Verbindungen, wie *Adherens Junctions*, die die Zellen untereinander kommunizieren lassen (259). Insgesamt können so verschiedene Signalkaskaden ausgelöst werden, die einen Einfluss auf die Regulation des Metabolismus der Zelle sowie den Zellzyklus nehmen; die genauen Abläufe dieser Prozesse konnten jedoch noch nicht vollständig aufgeschlüsselt werden (22, 258).

In der Literatur sind dabei einige Signalwege aufgezeigt, die einen positiven Effekt der ESWT auf die Wundheilung erklären könnten. In tierexperimentellen Studien konnte nach Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen eine verbesserte Durchblutung durch eine vermehrte Ausschüttung von eNOS, VEGF und PCNA nachgewiesen werden (22, 260-262). Gleichzeitig wurde nach der Applikation der ESWT eine Modulation spezifischer zellregulatorischer Moleküle, wie der ERK, *Focal Adhesion Kinase*, Wnt oder ATP/P2X7, beobachtet, die unter anderem die Differenzierung und Proliferation von Zellen wesentlich beeinflussen (18, 22, 263).

Dabei sind die Signalwege, die den beobachteten anti-inflammatorischen Effekt erklären können, noch nicht eindeutig aufgeschlüsselt. Dennoch gibt es vielversprechende Ansätze, die den Wirkeffekt der ESWT auf molekularer Ebene erklären könnten. So beschreiben Chen et al., verglichen mit unbehandelten Kontrollgruppen, eine Förderung der Wundheilung nach Behandlung einer künstlich verursachten Wunde mit ESWT in einem Diabetes induzierten

Rattenmodell (18). Dabei stellten sie eine verstärkte Modulation der Glykogen Synthase Kinase-3 $\beta$  des Wnt/  $\beta$ -Catenin Signalwegs nach Stoßwellenbehandlung fest (18). In einem anderen Tiermodell, in dem an autoimmuner Prostatitis erkrankte Ratten untersucht wurden, zeigten Feng et al. eine verminderte Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, Cyklooxygenase-2 (COX-2) und Substanz P sowie eine Reduktion des oxidativen Stresses durch eine Minderung intrazellulärer ROS, Superoxiddismutase, NADPH und Glutation (264). Dies begründen die Autoren in einer Hochregulation des PI3 K/AKT/FOXO1 Signalwegs (264). Weiterhin konnte nach Behandlung mit ESWT eine Hemmung der NF- $\kappa$ B und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalwege und folgend eine Reduktion inflammatorischer Zytokine, wie COX-2, iNOS und TNF- $\alpha$ , beobachtet werden (109, 265). Diese Erkenntnisse werden durch die Ergebnisse von Chen et al. weiter bestärkt, die in einem Rattenmodell durch Stimulation des Fettsäurerezeptors GPR120 eine Unterdrückung des NF- $\kappa$ B Signalwegs beobachteten (266). Durch die Reduktion inflammatorischer Zytokine in dem behandelten Gewebe infolge der stoßwellenvermittelten Inhibition des NF- $\kappa$ B beziehungsweise MAPK Signalwegs könnte eine Umpolarisierung der M1- zu M2-Makrophagen begünstigt werden. Jedoch gibt es keine Daten, die diese Vermutung belegen.

Die verschiedenen, in der Literatur aufgezeigten, Signalwege geben einen Einblick in die Komplexität der physiologischen Prozesse, die durch eine Behandlung mit ESWT beeinflusst werden. Gleichzeitig ist ein einzelner Zelltyp als Mediator der stoßwellenvermittelten anti-inflammatorischen Reaktion unwahrscheinlich. Vielmehr ist von einem Zusammenspiel der Hauptakteure, der an der Wundheilung beteiligten Zellen auszugehen. Hierzu zählen vor allem neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten. Daher ist es sinnvoll, zukünftige Versuche auf die Co-Kultur dieser Zelltypen auszurichten, um einen besseren Einblick in die Einflussnahme der ESWT auf zellulärer immunologischer Ebene zu erhalten.

Unter Berücksichtigung der aus der Literatur gewonnenen Informationen sind vorangegangene Versuche, die den Einfluss der ESWT in 2D-Zellkulturen untersuchten, in ihrer Aussagekraft als kritisch zu betrachten. Wird die Wirkung der ESWT auf adhärente Zellen in einer 2D-Zellkultur untersucht, wie durch Sukubo et al. beschrieben, besitzen diese Zellen untereinander zwar Zell-Zell- (24), jedoch keine Zell-Matrix-Verbindungen, die für eine Vermittlung der ESWT-induzierten Zellantwort als essenziell erachtet werden können. Die Nutzung eines Hydrogels als Trägermedium für die Makrophagen in Zellkultur soll hingegen die Interaktion der Zellen mit der EZM, in diesem Fall der Kollagenmatrix, erleichtern. Dies könnte eine Mechanotransduktion innerhalb des Gels ermöglichen, die den biologischen Prozessen in menschlichem Gewebe besser entspricht.

Die beobachtete Abwesenheit einer Veränderung des Phänotyps der Makrophagen nach ESWT lässt vermuten, dass jedoch auch Zell-Zell-Kontakte einen wesentlichen Beitrag zur Mechanotransduktion leisten könnten. Makrophagen sind hochaktive Zellen, die, wie bereits beschrieben, über eine Interaktion mit anderen Zellen unterschiedliche Aufgaben übernehmen können. Ob Makrophagen miteinander signifikante Zell-Zell-Kontakte im Rahmen von Wundheilungsprozessen ausbilden, ist bislang wenig untersucht. Dabei legen auch die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung nahe, dass eine Kommunikation der Makrophagen mit anderen an der Wundheilung beteiligten Zellen für eine Signaltransduktion der beobachteten anti-inflammatorischen Effekte der ESWT mitverantwortlich ist. Besonders mit Fibroblasten stehen Makrophagen in einer engen Verbindung und haben in ihrem Zusammenspiel einen großen Einfluss auf die Mikroumgebung des Gewebes (267). Während einer Entzündungsreaktion produzieren Fibroblasten M-CSF und sorgen so für eine Ansammlung von aktivierten Makrophagen in der Läsion; gleichzeitig wird durch aktivierte Makrophagen die Produktion von M-CSF in den Fibroblasten stimuliert (268). Die Ergebnisse der Studie von Duffield et al. legt zusätzlich die Vermutung nahe, dass eine enge Beziehung zwischen Makrophagen und Fibroblasten innerhalb inflammatorischer Prozesse, wie einer Fibrose, unerlässlich ist. Die Arbeitsgruppe induzierte durch Tetrachlormethan eine Fibrose in murinen Lebern. Sie verwendeten transgenetisch veränderte CD11b-DTR Mäuse, um Makrophagen sowohl zu Beginn als auch in einem fortgeschrittenen Stadium der Fibrose selektiv depletieren zu können (269). Während einer fortgeschrittenen Fibrose depletierte Makrophagen führten zu einer verminderten Narbenbildung und einer verminderten Bildung von Myofibroblasten in dem untersuchten Lebergewebe, wohingegen der Verlust der Makrophagen im Laufe der Resolution der Fibrose zu einem verlängerten Krankheitsverlauf beitrug (269).

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit ein 3D-Hautmodell auf Basis einer Kollagenmatrix entwickelt werden, das den mechanischen Anforderungen zur Untersuchung der Auswirkungen der ESWT gerecht wird. Dieses Modell stellt einen bedeutenden Fortschritt dar, da es den physiologischen Eigenschaften der menschlichen Haut näherkommt und somit realitätsnähere Untersuchungen ermöglicht. Gleichzeitig zeigte sich jedoch, dass die Kultivierung von Makrophagen in Monokultur innerhalb der Kollagenmatrix vermutlich nicht ausreichend ist, um essenzielle Zell-Zell-Interaktionen abzubilden. Diese Interaktionen spielen eine entscheidende Rolle für die Homöostase und die funktionellen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen, insbesondere im Hinblick auf die Polarisierung von Makrophagen und deren Reaktion auf ESWT. Ein Ansatz für zukünftige Studien könnte daher die Integration weiterer Zelltypen, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, in Bi- oder Tri-Kulturen sein. Dadurch ließe sich die Gesamtzellzahl in der Matrix erhöhen und die entstehenden Zell-Zell-Interaktionen könnten wertvolle Einblicke in die Rolle von Fibroblasten

und anderen Zellen bei der Makrophagen-Polarisation und der Immunantwort nach ESWT liefern. Zudem könnten solche Modelle eine umfassendere Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Makrophagen und anderen Zelltypen im Kontext der Geweberegeneration und Homöostase ermöglichen. Mit diesen Erweiterungen könnte das entwickelte Modell als Grundlage für weiterführende Studien dienen, um die komplexen Mechanismen der ESWT auf zellulärer und molekularer Ebene noch detaillierter zu erforschen.

## **5.4.2 Diskussion des Versuchsaufbaus**

### **5.4.2.1 Stoßwellenübertragung**

In der Literatur wird die durchschnittliche Eindringtiefe von radialen extrakorporalen Stoßwellen in Gewebe mit 3 bis 3,5 cm angegeben (270). In ein Well einer 12-Well Kulturplatte wurde je 1 ml der Kollagensuspension gegeben. Dies entsprach einer Höhe des ausgehärteten Hydrogels von 3 mm. Menschliche Haut besitzt je nach Beanspruchung an unterschiedlichen Stellen des Körpers eine andere Schichtstärke. So variiert die Dicke der Epidermis zwischen 0,03 mm an den Augenlidern und 1,6 mm an den Fußsohlen sowie Handinnenflächen (271). Analog dazu schwankt an den beschriebenen Körperstellen die Schichtstärke der Dermis zwischen 0,3 mm und 3 mm (271). Die Schichtdicke des Gels entspricht damit in etwa der Stärke humaner Haut an mechanisch stark beanspruchten Stellen des Körpers.

An dem Ort der Entstehung radialer Stoßwellen besitzen sie die meiste Energie (270). Die akustische Welle breitet sich von dort in alle Richtungen aus und verliert je tiefer sie in das Medium eindringt an Energie (84). Daher war der stärkste Effekt der ESWT an ihrem Entstehungsort zu erwarten. Insofern ist davon auszugehen, dass diejenigen Zellen, die sich in der direkten Nähe zu dem Applikatorkopf befanden, initial einer sehr hohen Energie ausgesetzt wurden.

Die Arbeitsgruppe um Sawicki et al. hat sich intensiv mit dem Verlust der EFD der ESWT beschäftigt, die eine entscheidende Rolle in den Überlegungen zu einem potentiellen Modellaufbau spielt (13). Sie beschreiben den Zusammenhang der gewählten Frequenz und der EFD. Demnach sinkt die EFD oberhalb einer Frequenz von 6 Hz aufgrund der Vibration des Projektils, das aufgrund der hohen Frequenz nicht in den Ruhezustand zurückkehren kann (13). Gleichzeitig zeigen Frequenzen von 2–5 Hz vergleichsweise stabile EFD Werte von 80–90 % (13). In Anbetracht dieser Erkenntnisse wurde für diese Arbeit eine Frequenz von 5 Hz gewählt.

Aufgrund der Differenz der akustischen Impedanz zwischen Polystyrol und der Kollagenmatrix (Tabelle 1) liegt die Vermutung nahe, dass Anteile der Energie, die den Boden der

Zellkulturplatte erreichten, dort zu einem Großteil an der Grenzfläche reflektiert beziehungsweise absorbiert wurden. Diese These wird durch die Arbeit von Liu et al. unterstützt, die die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften von Wasser und porzinem Gewebe während der Behandlung mit rESWT analysierten (272). Die Arbeitsgruppe untersuchte unter anderem das Verhalten einer radialen Stoßwelle, die auf eine Wasseroberfläche in einer 4,6 mm hoch gefüllten konventionellen Petrischale appliziert wurde (angenommen wird eine ähnliche stoffliche Zusammensetzung wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellkulturplatten und damit ähnliche mechanische Eigenschaften) (272). Zum einen konnten sie die beschriebene Abnahme des Schalldrucks entlang der Ausbreitung der Stoßwelle nachweisen, zum anderen beschreiben sie eine Verstärkung des Schalldrucks im Bereich des Schalenbodens. In dem Moment, in dem die Welle das akustische Hindernis des Bodens der Petrischale erreicht, berichten die Autoren von einer Reflexion der Schallwelle, so dass der Schalldruck in dieser Phase der Ausbreitung den doppelten Druck der initialen Schallwelle erreicht (272). Daher werden Zellen in dem zentralen Bereich des Petrischalenbodens dem höchsten Schalldruck ausgesetzt (272). Dementsprechend wurden die Zellen der vorliegenden Arbeit in der zentralen unteren Schicht der Kollagenmatrix zusätzlich der reflektierten Energie der Stoßwelle an dem Boden der Zellkulturplatte ausgesetzt. Eine Platzierung der Zellkulturplatte auf einer Gummimatte fand statt, um den Anteil der Stoßwelle, der den Kunststoff dennoch passierte, zu absorbieren.

#### **5.4.2.2 Methode der Analyse der Makrophagen**

In dieser Arbeit wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Diese Methode erlaubt es, durch Bindung der verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper an spezifische Oberflächenmoleküle der zu untersuchenden Zellen, die verschiedenen Subpopulationen der Makrophagen getrennt voneinander darzustellen. Der Umgang mit den Zellen während des Versuchs kann daher einen wesentlichen Einfluss auf die Zellmembran der Makrophagen besitzen und damit die Ergebnisse entscheidend verändern. Daher sollte die anschließende Analyse mittels Durchflusszytometrie unter Berücksichtigung der Einflussnahme verschiedener Faktoren auf die Ausbildung sowie den Nachweis spezifischer Oberflächenmoleküle der Makrophagen durchgeführt werden.

Initial wurden die Makrophagen auf Zellkulturschalen kultiviert und nach abgeschlossener Differenzierung mittels Accutase<sup>®</sup> und Zellschaber abgelöst. Abschließend folgte die Isolierung aus der Kollagenmatrix mit Hilfe einer Kollagenase I und II enthaltenen Verdauungslösung. In der Literatur wird beiden Verfahren eine Beeinflussung der Expression der zu untersuchenden Oberflächenmoleküle zugeschrieben (273-275). Sie wird in einer enzymatischen oder mechanischen Zerstörung der Rezeptoren begründet (276). So zeigten Chen et al. eine verminderte Expression von CD163 und CD206 nach der enzymatischen Ablösung von

Makrophagen von einer Zellkulturplatte mittels Trypsin oder Accutase<sup>®</sup> verglichen mit der Behandlung mit EDTA (274). Der Einfluss der Behandlung mit Kollagenase auf die Ausbildung spezifischer Oberflächenmoleküle der Zellmembran von Makrophagen ist bislang wenig untersucht. Jedoch wird eine potentiell verminderte Expression der Oberflächenrezeptoren von Immunzellen nach enzymatischer Behandlung mit Kollagenase diskutiert (273).

Die untersuchten Makrophagen zeigten nach Isolation aus dem Gel in der SYTOX<sup>®</sup> Blue Färbung verglichen mit denen, die direkt von der Zellkulturplatte abgelöst wurden („unbehandelt“) deutliche Unterschiede (Abbildung 18). So ist in der Gruppe „unbehandelt“ eine eindeutige Unterscheidung der SYTOX<sup>®</sup> Blue positiven, toten Zellen von den negativen, lebendigen Zellen zu erkennen. In der Gruppe „ohne ESWT“ gehen beide Gruppen fließend ineinander über. Zusätzlich ist eine weitere Population zu erkennen, in der sowohl ein geringeres SYTOX<sup>®</sup> Blue als auch CD45 Signal nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich weniger auf einen Einfluss durch die enzymatische Behandlung mit Kollagenase und mehr auf die mechanische Beanspruchung durch die Methodik der Isolation zurückzuführen.

Die Analyse der Makrophagen mittels FACS wird in vielen Studien verwendet, um die Polarisierung der Zellen auf veränderte Stimuli zu untersuchen (58, 68, 247, 277). Gleichwohl wurden in der Literatur neben der Anpassung der Oberflächenmoleküle eine veränderte Ausschüttung pro-/anti-inflammatorischer Zytokine sowie eine veränderte Expression von Markergenen als Polarisationsmarker beschrieben (184, 185). Daher wurde in einigen Zellkulturversuchen ebenfalls eine Analyse der Mediumüberstände zur Auswertung der durch die Zellen ausgeschütteten Zytokine im Rahmen eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und/oder die Untersuchung bestimmter Markergene mittels qPCR durchgeführt (24, 58, 244). Dadurch lässt sich neben der Veränderung des Phänotyps auch eine Aussage über die veränderte Funktion der Makrophagen ableiten. Jedoch ist nicht jede Auswertungsmethode auf das in dieser Arbeit vorgestellte Modell anwendbar. Die Zellen befanden sich verteilt in dem Gel; eine Entnahme des Mediums hätte dementsprechend wahrscheinlich nur den Zytokinausschüttungen der peripher befindlichen Makrophagen entsprochen. Weil jedoch, wie oben beschrieben, nicht alle Zellen demselben Druck ausgesetzt wurden, galt es eine Analysemethode zu wählen, die die gesamte Zellpopulation abbildet – wie die Durchflusszytometrie aller aus dem Gel entnommenen Makrophagen.

Gehwolf et al. erstellen in ihrer Arbeit ein 3D-Modell zur Untersuchung der Biologie von Sehnen (278). Dabei kultivierte die Arbeitsgruppe Stamm- und Progenitorzellen der Achillessehne von Ratten in einer Kollagen Typ-I Matrix (mit einer Kollagenkonzentration von 2 mg/mL), die zwischen zwei Seidennähte appliziert wurde, um eine Sehnenstruktur imitieren zu können (278). Die grundsätzliche Methodik der Zellkultivierung ähnelt damit sehr stark dem Modell der

vorliegenden Arbeit. In der Auswertung der Modelle durch Gehwolf et al. scheint besonders die histologische Aufarbeitung valide Ergebnisse zu erzielen. Die Arbeitsgruppe fixierte die untersuchten Hydrogelmatrices in vierprozentigem Paraformaldehyd. Anschließend wurden die Proben auf Trockeneis schockgefroren; in diesem Zustand konnten sie entweder gelagert oder für die anschließende Untersuchung direkt geschnitten und auf einem Objektträger platziert und mittels verschiedener histologischer Verfahren analysiert werden (278, 279). Durch das Vermeiden einer potentiell negativen Interaktion der Zelloberfläche mit der Kollagenase und der mechanischen Beanspruchung während der Auflösung der Kollagenmatrix, wie sie oben diskutiert wurde, erscheint die Anfertigung und Analyse solcher Kryoschnitte für künftige Versuche eine valide Alternative darzustellen.

Für eine adäquate Analyse der Ergebnisse der qPCR sind RNA-Proben mit hoher Reinheit essentiell (280, 281). Aufgrund der potentiellen physiochemischen Interaktion der Nukleinsäuren mit den Biomaterialien, ist die Isolation von RNA aus Hydrogelen nicht trivial; die angewandten Isolationsmethoden scheinen hierbei von großer Bedeutung zu sein (281). In dem Zusammenhang untersuchen Yu et al. unterschiedliche Methoden und Reagenzienkombinationen zur Extrahierung von RNA aus in Chitosan-basierten Hydrogelen kultivierten humanen Fettstammzellen hinsichtlich der Verschmutzung des Genoms und der Frage, ob die untersuchten Methoden eine ausreichende Analyse der RNA zulassen (281). Dabei scheint die Verwendung von TRIzol<sup>®</sup> gemeinsam mit einem RNeasy<sup>®</sup> *Mini Kit* oder einer verlängerten Inkubation der Proben in dem Lösungsmittel die Ergebnisse mit der größten Ausbeute und effizienteren Verstärkung der Proben zu generieren. Diese Erkenntnis wird durch die Tatsache unterstützt, dass Gehwolf et al. in ihren Veröffentlichungen ebenfalls TRIzol<sup>®</sup> zur Isolation der RNA aus den sich in dem Gel befindlichen Zellen verwenden (278, 279). Demnach scheint die Extraktion einer ausreichenden Menge an Nukleinsäuren hoher Reinheit in solchen Kollagengel-basierten 3D-Modellen prinzipiell möglich zu sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es neben der Durchflusszytometrie noch weitere Methoden der Analyse der zu untersuchenden Zellen in der Literatur beschrieben sind, die einen positiven Einfluss auf den gewonnenen Informationsgehalt versprechen. Der limitierende Faktor in der Auswahl der Auswertungsmethodik wird bei der Untersuchung von Makrophagen immer die zur Verfügung stehende Zellzahl sein. Makrophagen besitzen eine hohe Spendervariabilität, weshalb idealerweise die Zellen einer Spenderpopulation zusammen untersucht und verglichen werden sollten. Der Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit setzte die Kultivierung in einer 12-Well Zellkulturplatte voraus, um den Applikatorkopf der Stoßwellenpistole auf dem Gel platzieren zu können. Damit sich genügend Zellen in dem Kollagengel befanden, wurden 1 Million Makrophagen benötigt. Gleichzeitig wurden durchschnittlich 10 Millionen differenzierte M1-Makrophagen von den Zellkulturschalen

entnommen; demnach ist die Möglichkeit zur Nutzung verschiedener und unterschiedlicher Analysemethoden begrenzt.

## 6 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Entwicklung eines 3D-Gewebemodells, das die Untersuchung molekularer Mechanismen nach einer Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen in einem belastbaren Versuchsansatz ermöglicht. Ziel war es, ein Modell zu schaffen, das die physiologischen Bedingungen der menschlichen Haut realitätsnah simuliert und gleichzeitig die Kultivierung sowie Behandlung humaner Makrophagen erlaubt. Darüber hinaus wurde der Einfluss der ESWT auf die Polarisierung humaner Makrophagen in dem zuvor etablierten Kollagengel-Modell genauer untersucht.

Unter den zuvor definierten Voraussetzungen wurden in dieser Arbeit zwei Modelle auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht. Dabei zeigte sich die Verwendung einer Kollagenmembran als *Scaffold* für Makrophagen sowohl in Mono- als auch in Tri-Kultur als nicht praktikabel. In dem durchgeführten Versuchsaufbau konnten in der abschließenden mikroskopischen Analyse keine Makrophagen in den Matrices nachgewiesen werden. Dagegen erbrachte die Kultivierung von Fibroblasten und HUVECs in Bi-Kultur vielversprechendere Ergebnisse. Beide Zellpopulationen zeigten innerhalb der Kollagenmembran nachweislich eine Aktivität. Die Fibroblasten migrierten innerhalb der 21 Kulturtage fast vollständig durch die Membran. Zudem konnten durch die HUVECs ausgebildete flächige interzelluläre Vernetzungen in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Das eingesetzte Modell auf Basis eines bovinen Kollagengels zeigte im Hinblick auf die Möglichkeit zur Untersuchung mechanischer Stimuli in einem dreidimensionalen Gewebeverbund vielversprechende Ergebnisse. Das enthaltene Kollagen Typ I, ein zentraler Bestandteil der EZM menschlicher Haut, schafft hierfür ideale Bedingungen. Zudem überzeugt das verwendete Hydrogel durch die einfache Handhabung in der Zellkultur. Die Zellen konnten problemlos in Suspension gebracht und anschließend gleichmäßig in dem gesamten Volumen des ausgehärteten Kollagengels verteilt werden. Die verwendeten Makrophagen konnten zwei Tage in der Kollagenmatrix kultiviert und anschließend mithilfe einer Kollagenase-Lösung aus dem Gel isoliert werden. Zudem wurde nachgewiesen, dass die in dem Gel kultivierten Makrophagen durch adäquate Stimuli, wie IL-4, erfolgreich umpolarisiert werden können. Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung für die weitere Analyse der Wirkung von extrakorporalen Stoßwellen ESWT auf Makrophagen.

Allerdings zeigte eine einmalige Applikation von ESWT keine signifikante Veränderung der untersuchten Oberflächenmoleküle auf den Makrophagen. Um den Einfluss der ESWT auf Makrophagen sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen besser zu verstehen, sind weitere Studien erforderlich. Einen vielversprechenden Ansatz bietet dabei die Analyse in einer Bi-Kultur aus Makrophagen und Fibroblasten.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res.* 2017;58(1-2):81-94.
2. Louiselle AE, Niemiec SM, Zgheib C, Liechty KW. Macrophage polarization and diabetic wound healing. *Translational Research.* 2021;236:109-16.
3. Delavary BM, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology.* 2011;216(7):753-62.
4. Du Cheyne C, Tay H, De Spiegelaere W. The complex TIE between macrophages and angiogenesis. *Anatomia, Histologia, Embryologia.* 2020;49(5):585-96.
5. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhozhij S, et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood.* 2010;116(5):829-40.
6. Kloc M, Ghobrial RM, Wosik J, Lewicka A, Lewicki S, Kubiak JZ. Macrophage functions in wound healing. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(1):99-109.
7. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol.* 2020;10(9):200223.
8. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol.* 2020;877:173090.
9. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports.* 2014;6.
10. Miao M, Niu Y, Xie T, Yuan B, Qing C, Lu S. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiologic correlation. *Wound repair and regeneration.* 2012;20(2):203-13.
11. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol.* 2018;30(11):511-28.
12. Mueller CK, Schultze-Mosgau S. Histomorphometric analysis of the phenotypical differentiation of recruited macrophages following subcutaneous implantation of an allogeneic acellular dermal matrix. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2011;40(4):401-7.
13. Sawicki M, Maćkowski M, Płaczek M. The Phenomenon of Loss of Energy Flux Density in Pneumatic and Electromagnetic Generators for EPAT Therapy. *Applied Sciences.* 2022;12(24):12939.
14. Heimes D, Wiesmann N, Eckrich J, Brieger J, Mattyasovszky S, Proff P, et al. In Vivo Modulation of Angiogenesis and Immune Response on a Collagen Matrix via Extracorporeal Shockwaves. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20).
15. Talso M, Tefik T, Mantica G, Rodriguez Socarras M, Kartalas Goumas I, Somani BK, et al. Extracorporeal shockwave lithotripsy: current knowledge and future perspectives. *Minerva Urol Nefrol.* 2019;71(4):365-72.
16. Alshihri A, Kämmerer PW, Heimes D, Niu W, Alnassar T, Spector M. Extracorporeal Shock Wave Stimulates Angiogenesis and Collagen Production in Facial Soft Tissue. *J Surg Res.* 2020;245:483-91.
17. Chen RF, Chang CH, Wang CT, Yang MY, Wang CJ, Kuo YR. Modulation of vascular endothelial growth factor and mitogen-activated protein kinase-related pathway involved in extracorporeal shockwave therapy accelerate diabetic wound healing. *Wound Repair Regen.* 2019;27(1):69-79.

18. Chen RF, Lin YN, Liu KF, Wang CT, Ramachandran S, Wang CJ, et al. The Acceleration of Diabetic Wound Healing by Low-Intensity Extracorporeal Shockwave Involves in the GSK-3 $\beta$  Pathway. *Biomedicines*. 2020;9(1).
19. Calcagni M, Chen F, Högger DC, Lindenblatt N, Keel M, Giovanoli P, et al. Microvascular response to shock wave application in striated skin muscle. *J Surg Res*. 2011;171(1):347-54.
20. Császár NB, Angstman NB, Milz S, Sprecher CM, Kobel P, Farhat M, et al. Radial Shock Wave Devices Generate Cavitation. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140541.
21. Zhong P, Cioanta I, Cocks FH, Preminger GM. Inertial cavitation and associated acoustic emission produced during electrohydraulic shock wave lithotripsy. *J Acoust Soc Am*. 1997;101(5 Pt 1):2940-50.
22. Liu T, Shindel AW, Lin G, Lue TF. Cellular signaling pathways modulated by low-intensity extracorporeal shock wave therapy. *Int J Impot Res*. 2019;31(3):170-6.
23. Xin ZC, Xu YD, Lin G, Lue TF, Guo YL. Recruiting endogenous stem cells: a novel therapeutic approach for erectile dysfunction. *Asian J Androl*. 2016;18(1):10-5.
24. Sukubo NG, Tibalt E, Respizzi S, Locati M, d'Agostino MC. Effect of shock waves on macrophages: A possible role in tissue regeneration and remodeling. *Int J Surg*. 2015;24(Pt B):124-30.
25. Tamma R, dell'Endice S, Notarnicola A, Moretti L, Patella S, Patella V, et al. Extracorporeal shock waves stimulate osteoblast activities. *Ultrasound Med Biol*. 2009;35(12):2093-100.
26. Vetrano M, Ranieri D, Nanni M, Pavan A, Malisan F, Vulpiani MC, et al. Hyaluronic Acid (HA), Platelet-Rich Plasm and Extracorporeal Shock Wave Therapy (ESWT) promote human chondrocyte regeneration in vitro and ESWT-mediated increase of CD44 expression enhances their susceptibility to HA treatment. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218740.
27. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
28. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical research*. 2009;37(5):1528-42.
29. Zaidi A, Green L. Physiology of haemostasis. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2019;20(3):152-8.
30. Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011;216(7):753-62.
31. Chen L, DiPietro LA. Toll-like receptor function in acute wounds. *Advances in wound care*. 2017;6(10):344-55.
32. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in cell biology*. 2005;15(11):599-607.
33. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews immunology*. 2013;13(3):159-75.
34. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(11):692-704.
35. Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *Journal of leukocyte biology*. 2011;89(3):359-72.
36. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic surgery*. 2005;31(6):674-86.

37. Shaw TJ, Martin P. Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration. *Current opinion in cell biology*. 2016;42:29-37.
38. Wager L, Leavesley D. MicroRNA regulation of epithelial-to-mesenchymal transition during re-epithelialisation: assessing an open wound. *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*. 2015;23(3):132-42.
39. Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretzschmar K, Simons BD, Charalambous M, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*. 2013;504(7479):277-81.
40. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*. 2007;25(1):9-18.
41. Huang S-P, Wu M-S, Shun C-T, Wang H-P, Hsieh C-Y, Kuo M-L, et al. Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *Journal of biomedical science*. 2005;12:229-41.
42. Honnegowda TM, Kumar P, Udupa EGP, Kumar S, Kumar U, Rao P. Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plastic and Aesthetic Research*. 2015;2:243-9.
43. Gurevich DB, Severn CE, Twomey C, Greenhough A, Cash J, Toye AM, et al. Live imaging of wound angiogenesis reveals macrophage orchestrated vessel sprouting and regression. *The EMBO journal*. 2018;37(13):e97786.
44. Poché RA, Hsu C-W, McElwee ML, Burns AR, Dickinson ME. Macrophages engulf endothelial cell membrane particles preceding pupillary membrane capillary regression. *Developmental biology*. 2015;403(1):30-42.
45. Stefater III JA, Lewkowich I, Rao S, Mariggi G, Carpenter AC, Burr AR, et al. Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt–Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature*. 2011;474(7352):511-5.
46. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2014:301-11.
47. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*. 1997;77(3):509-28.
48. Young A, McNaught C-E. The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 2011;29(10):475-9.
49. Hassanshahi A, Moradzad M, Ghalamkari S, Fadaei M, Cowin AJ, Hassanshahi M. Macrophage-Mediated Inflammation in Skin Wound Healing. *Cells*. 2022;11(19).
50. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
51. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:541-66.
52. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*. 2015;518(7540):547-51.
53. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*. 2014;41(1):21-35.
54. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
55. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity*. 2016;44(3):439-49.

56. Gibbings SL, Goyal R, Desch AN, Leach SM, Prabagar M, Atif SM, et al. Transcriptome analysis highlights the conserved difference between embryonic and postnatal-derived alveolar macrophages. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;126(11):1357-66.
57. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13:453-61.
58. Zhao S, Si M, Deng X, Wang D, Kong L, Zhang Q. HCV inhibits M2a, M2b and M2c macrophage polarization via HCV core protein engagement with Toll-like receptor 2. *Exp Ther Med*. 2022;24(2):522.
59. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol*. 2019;10:792.
60. Wu H, Yin Y, Hu X, Peng C, Liu Y, Li Q, et al. Effects of Environmental pH on Macrophage Polarization and Osteoimmunomodulation. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019;5(10):5548-57.
61. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology*. 2005;175(1):342-9.
62. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
63. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(3):787-95.
64. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol*. 2014;5:614.
65. Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sica A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin Immunol*. 2015;27(4):237-48.
66. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*. 2002;23(11):549-55.
67. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 2010;327(5969):1098-102.
68. Devraj VM, Kalidindi K, Guditi S, Uppin M, Taduri G. Macrophage polarization in kidney transplant patients. *Transpl Immunol*. 2022;75:101717.
69. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
70. Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4-and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annual review of immunology*. 2013;31:317-43.
71. Wang L-x, Zhang S-x, Wu H-j, Rong X-l, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of Leukocyte Biology*. 2018;106(2):345-58.
72. Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Cronstein BN, Hasko G, Outram S, et al. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R $\alpha$ ) signaling. *Inflammation*. 2013;36(4):921-31.
73. Biswas SK, Chittechath M, Shalova IN, Lim JY. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res*. 2012;53(1-3):11-24.

74. Buchacher T, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Fischer MB, Weber V. M2 Polarization of Human Macrophages Favors Survival of the Intracellular Pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143593.
75. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol*. 2007;178(8):5245-52.
76. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *The Journal of immunology*. 2006;177(10):7303-11.
77. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *The Journal of Immunology*. 2008;180(4):2011-7.
78. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology*. 2008;8(12):958-69.
79. Mohammadi A, Blesso CN, Barreto GE, Banach M, Majeed M, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization and function in response to curcumin, a diet-derived polyphenol, as an immunomodulatory agent. *J Nutr Biochem*. 2019;66:1-16.
80. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol*. 2010;184(7):3964-77.
81. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol*. 2009;175(6):2454-62.
82. Liechty C, Hu J, Zhang L, Liechty KW, Xu J. Role of microRNA-21 and its underlying mechanisms in inflammatory responses in diabetic wounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(9):3328.
83. Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C. [Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]. *Orthopade*. 2002;31(7):610-7.
84. Auersperg V, Trieb K. Extracorporeal shock wave therapy: an update. *EFORT Open Rev*. 2020;5(10):584-92.
85. Lewin PA, Schafer ME. Shock wave sensors: I. Requirements and design. *J Lithotr Stone Dis*. 1991;3(1):3-17.
86. McClure S, Dorfmueller C. Extracorporeal shock wave therapy: Theory and equipment. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 2003;2(4):348-57.
87. Granz B, Köhler G. What makes a shock wave efficient in lithotripsy? *J Stone Dis*. 1992;4(2):123-8.
88. Loske AM. *Medical and Biomedical Applications of Shock Waves; Shock Wave and High Pressure Phenomena*: Springer International Publishing: Cham, Switzerland; 2017.
89. Dreisilker U. *Enthesiopathien Stoßwellentherapie in Der Praxis*. LEVEL10 Buchverlag: Heilbronn, Germany; 2010.
90. Ji X, Su M, Chen J, Wang X, Cai X. A novel method for plastic particle sizing in suspension based on acoustic impedance spectrum. *Ultrasonics*. 2017;77:224-30.
91. Tavakkoli J, Birer A, Arefiev A, Prat F, Chapelon JY, Cathignol D. A piezocomposite shock wave generator with electronic focusing capability: application for producing cavitation-induced lesions in rabbit liver. *Ultrasound Med Biol*. 1997;23(1):107-15.
92. Greenstein A, Matzkin H. Does the rate of extracorporeal shock wave delivery affect stone fragmentation? *Urology*. 1999;54(3):430-2.

93. Huber P, Jöchle K, Debus J. Influence of shock wave pressure amplitude and pulse repetition frequency on the lifespan, size and number of transient cavities in the field of an electromagnetic lithotripter. *Phys Med Biol*. 1998;43(10):3113-28.
94. Delius M. Medical applications and bioeffects of extracorporeal shock waves. *Shock waves*. 1994;4:55-72.
95. Tomita Y, Shima A. Mechanisms of impulsive pressure generation and damage pit formation by bubble collapse. *Journal of Fluid Mechanics*. 1986;169:535-64.
96. Ginini JG, Maor G, Emodi O, Shilo D, Gabet Y, Aizenbud D, et al. Effects of Extracorporeal Shock Wave Therapy on Distraction Osteogenesis in Rat Mandible. *Plast Reconstr Surg*. 2018;142(6):1501-9.
97. Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, Chang PR, Huang YT, Sun YC, et al. Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1alpha and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts. *J Biol Chem*. 2004;279(11):10331-7.
98. Wang FS, Wang CJ, Sheen-Chen SM, Kuo YR, Chen RF, Yang KD. Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors. *J Biol Chem*. 2002;277(13):10931-7.
99. Chen Y, Lyu K, Lu J, Jiang L, Zhu B, Liu X, et al. Biological response of extracorporeal shock wave therapy to tendinopathy in vivo (review). *Front Vet Sci*. 2022;9:851894.
100. Wang FS, Yang KD, Kuo YR, Wang CJ, Sheen-Chen SM, Huang HC, et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal shock wave-promoted healing of segmental defect. *Bone*. 2003;32(4):387-96.
101. Hatanaka K, Ito K, Shindo T, Kagaya Y, Ogata T, Eguchi K, et al. Molecular mechanisms of the angiogenic effects of low-energy shock wave therapy: roles of mechanotransduction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;311(3):C378-85.
102. Kersh KD, McClure SR, Van Sickle D, Evans RB. The evaluation of extracorporeal shock wave therapy on collagenase induced superficial digital flexor tendonitis. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2006;19(2):99-105.
103. Wang CJ, Huang HY, Pai CH. Shock wave-enhanced neovascularization at the tendon-bone junction: an experiment in dogs. *J Foot Ankle Surg*. 2002;41(1):16-22.
104. Rasmussen S, Christensen M, Mathiesen I, Simonson O. Shockwave therapy for chronic Achilles tendinopathy: a double-blind, randomized clinical trial of efficacy. *Acta Orthop*. 2008;79(2):249-56.
105. Ha CH, Kim S, Chung J, An SH, Kwon K. Extracorporeal shock wave stimulates expression of the angiogenic genes via mechanosensory complex in endothelial cells: mimetic effect of fluid shear stress in endothelial cells. *Int J Cardiol*. 2013;168(4):4168-77.
106. Tepeköylü C, Wang FS, Kozaryn R, Albrecht-Schgoer K, Theurl M, Schaden W, et al. Shock wave treatment induces angiogenesis and mobilizes endogenous CD31/CD34-positive endothelial cells in a hindlimb ischemia model: implications for angiogenesis and vasculogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;146(4):971-8.
107. Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, et al. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*. 2012;120(23):4653-62.
108. Silveira A, Koenig JB, Arroyo LG, Trout D, Moens NM, LaMarre J, et al. Effects of unfocused extracorporeal shock wave therapy on healing of wounds of the distal portion of the forelimb in horses. *Am J Vet Res*. 2010;71(2):229-34.

109. Ciampa AR, de Prati AC, Amelio E, Cavaliere E, Persichini T, Colasanti M, et al. Nitric oxide mediates anti-inflammatory action of extracorporeal shock waves. *FEBS Lett.* 2005;579(30):6839-45.
110. Holfeld J, Tepeköylü C, Kozaryn R, Urbschat A, Zacharowski K, Grimm M, et al. Shockwave therapy differentially stimulates endothelial cells: implications on the control of inflammation via toll-Like receptor 3. *Inflammation.* 2014;37(1):65-70.
111. Kuo YR, Wang CT, Wang FS, Chiang YC, Wang CJ. Extracorporeal shock-wave therapy enhanced wound healing via increasing topical blood perfusion and tissue regeneration in a rat model of STZ-induced diabetes. *Wound Repair Regen.* 2009;17(4):522-30.
112. Barozzi D, Scielzo C. Emerging Strategies in 3D Culture Models for Hematological Cancers. *Hemasphere.* 2023;7(8):e932.
113. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 13):3015-24.
114. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* 2020;7:33.
115. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22).
116. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(1):21-33.
117. Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature Reviews Cancer.* 2005;5(9):675-88.
118. Kievit FM, Florczyk SJ, Leung MC, Wang K, Wu JD, Silber JR, et al. Proliferation and enrichment of CD133+ glioblastoma cancer stem cells on 3D chitosan-alginate scaffolds. *Biomaterials.* 2014;35(33):9137-43.
119. Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Current opinion in biotechnology.* 2003;14(5):526-32.
120. Xu F, Burg KJ. Three-dimensional polymeric systems for cancer cell studies. *Cytotechnology.* 2007;54:135-43.
121. Remuzzi A, Bonandrini B, Tironi M, Longaretti L, Figliuzzi M, Conti S, et al. Effect of the 3D Artificial Nichoid on the Morphology and Mechanobiological Response of Mesenchymal Stem Cells Cultured In Vitro. *Cells.* 2020;9(8).
122. Achilli T-M, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert opinion on biological therapy.* 2012;12(10):1347-60.
123. Ryu N-E, Lee S-H, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells.* 2019;8(12):1620.
124. Gravelle P, Jean C, Familiades J, Decaup E, Blanc A, Bezombes-Cagnac C, et al. Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival, chemoresistance, and sensitivity to immune effectors in follicular lymphoma. *The American journal of pathology.* 2014;184(1):282-95.
125. Haselager MV, van Driel BF, Perelaer E, de Rooij D, Lashgari D, Loos R, et al. In vitro lymph node-mimicking 3D model displays long-term T cell-dependent CLL proliferation and survival. *bioRxiv.* 2023:2023.04. 03.535388.
126. Wu I, Elisseff J. *Biomaterials and tissue engineering for soft tissue reconstruction. Natural and synthetic biomedical polymers: Elsevier; 2014. p. 235-41.*
127. Dey M, Ozbolat IT. 3D bioprinting of cells, tissues and organs. *Sci Rep.* 2020;10(1):14023.

128. Heller M, Frerick-Ochs E, Bauer H-K, Schiegnitz E, Flesch D, Brieger J, et al. Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts. *Biomaterials*. 2016;77:207-15.
129. Peters K, Wiesmann N, Heimes D, Schwab R, Kämmerer PW, Al-Nawas B, et al. Extracorporeal Shock Wave Therapy Improves In Vitro Formation of Multilayered Epithelium of Oral Mucosa Equivalents. *Biomedicines*. 2022;10(3).
130. Dhaliwal A. 3D cell culture: A review. *Mater Methods*. 2012;2:162.
131. Apoorva FNU, Tian YF, Pierpont TM, Bassen DM, Cerchietti L, Butcher JT, et al. Award Winner in the Young Investigator Category, 2017 Society for Biomaterials Annual Meeting and Exposition, Minneapolis, MN, April 05-08, 2017: Lymph node stiffness-mimicking hydrogels regulate human B-cell lymphoma growth and cell surface receptor expression in a molecular subtype-specific manner. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(7):1833-44.
132. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering*. 2009;103(4):655-63.
133. El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science and Practice*. 2013;2013(3):38.
134. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews*. 2001;101(7):1869-80.
135. Elisseeff J. Structure starts to gel. *Nature materials*. 2008;7(4):271-3.
136. Langhans SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:6.
137. Ramtani S, Takahashi-Iniguez Y, Helary C, Geiger D, Guille MMG. Mechanical behavior under unconfined compression loadings of dense fibrillar collagen matrices mimetic of living tissues. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*. 2010;10(01):35-55.
138. Tierney CM, Haugh MG, Liedl J, Mulcahy F, Hayes B, O'Brien FJ. The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2009;2(2):202-9.
139. Cai X, Han M, Lou F, Sun Y, Yin Q, Sun L, et al. Tenascin C(+) papillary fibroblasts facilitate neuro-immune interaction in a mouse model of psoriasis. *Nat Commun*. 2023;14(1):2004.
140. Maeß MB, Keller AA, Rennert K, Mosig A, Lorkowski S. Optimization of the transfection of human THP-1 macrophages by application of Nunc UpCell technology. *Anal Biochem*. 2015;479:40-2.
141. Proserpio V, Conti L, Oliviero S. Flow Cytometry for Beginners: Hints and Tips for Approaching the Very First Single-Cell Technique. *Methods Mol Biol*. 2022;2386:27-41.
142. Chen J, Nie J. Effects of Extracorporeal Shock Wave Combined with Vivaphototherapy on Blood Perfusion, Inflammatory Response, and Prognosis in Burn Patients. *Comput Math Methods Med*. 2022;2022:1386875.
143. Quan T. Molecular insights of human skin epidermal and dermal aging. *J Dermatol Sci*. 2023;112(2):48-53.
144. Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S, et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J Anat*. 2019;234(4):438-55.
145. Morasso MI, Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biology of the Cell*. 2005;97(3):173-83.
146. Koster MI. Making an epidermis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1170(1):7-10.

147. Gilchrest BA. Skin aging 2003: recent advances and current concepts. *Cutis*. 2003;72(3 Suppl):5-10; discussion
148. Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G-e, et al. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;117(5):1218-24.
149. Malheiro A, Thon M, Lourenço AF, Gamardo AS, Chandrakar A, Gibbs S, et al. A Humanized In Vitro Model of Innervated Skin for Transdermal Analgesic Testing. *Macromol Biosci*. 2023;23(1):e2200387.
150. Gunzer M, Friedl P, Niggemann B, Bröcker EB, Kämpgen E, Zänker KS. Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol*. 2000;67(5):622-9.
151. Carlson MW, Alt-Holland A, Egles C, Garlick JA. Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin. *Current Protocols in Cell Biology*. 2008;41(1):19.9. 1-9. 7.
152. El Ghalbzouri A, Commandeur S, Rietveld MH, Mulder AA, Willemze R. Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products. *Biomaterials*. 2009;30(1):71-8.
153. Gangatirkar P, Paquet-Fifield S, Li A, Rossi R, Kaur P. Establishment of 3D organotypic cultures using human neonatal epidermal cells. *Nature protocols*. 2007;2(1):178-86.
154. Graham HK, McConnell JC, Limbert G, Sherratt MJ. How stiff is skin? *Exp Dermatol*. 2019;28 Suppl 1:4-9.
155. Feng X, Li GY, Ramier A, Eltony AM, Yun SH. In vivo stiffness measurement of epidermis, dermis, and hypodermis using broadband Rayleigh-wave optical coherence elastography. *Acta Biomater*. 2022;146:295-305.
156. Holt B, Tripathi A, Morgan J. Viscoelastic response of human skin to low magnitude physiologically relevant shear. *Journal of biomechanics*. 2008;41(12):2689-95.
157. Heller M, Bauer HK, Schwab R, Blatt S, Peters K, Nezi-Cahn S, et al. The impact of intercellular communication for the generation of complex multicellular prevascularized tissue equivalents. *J Biomed Mater Res A*. 2020;108(3):734-48.
158. Schwab R, Heller M, Pfeifer C, Unger RE, Walenta S, Nezi-Cahn S, et al. Full-thickness tissue engineered oral mucosa for genitourinary reconstruction: A comparison of different collagen-based biodegradable membranes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021;109(4):572-83.
159. Moharamzadeh K, Colley H, Murdoch C, Hearnden V, Chai WL, Brook IM, et al. Tissue-engineered oral mucosa. *J Dent Res*. 2012;91(7):642-50.
160. Ram-Liebig G, Bednarz J, Stuerzebecher B, Fahlenkamp D, Barbagli G, Romano G, et al. Regulatory challenges for autologous tissue engineered products on their way from bench to bedside in Europe. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;82:181-91.
161. Raya-Rivera AM, Esquiliano D, Fierro-Pastrana R, López-Bayghen E, Valencia P, Ordorica-Flores R, et al. Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study. *The Lancet*. 2014;384(9940):329-36.
162. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Smith KG, Thornhill MH. Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(4):1793-801.

163. Shams F, Moravvej H, Hosseinzadeh S, Mostafavi E, Bayat H, Kazemi B, et al. Overexpression of VEGF in dermal fibroblast cells accelerates the angiogenesis and wound healing function: in vitro and in vivo studies. *Sci Rep.* 2022;12(1):18529.
164. Mohammadi S, Ravanbakhsh H, Taheri S, Bao G, Mongeau L. Immunomodulatory Microgels Support Proregenerative Macrophage Activation and Attenuate Fibroblast Collagen Synthesis. *Adv Healthc Mater.* 2022;11(11):e2102366.
165. Sapudom J, Wu X, Chkolnikov M, Ansorge M, Anderegg U, Pompe T. Fibroblast fate regulation by time dependent TGF- $\beta$ 1 and IL-10 stimulation in biomimetic 3D matrices. *Biomater Sci.* 2017;5(9):1858-67.
166. Kriegebaum U, Mildenerger M, Mueller-Richter UD, Klammert U, Kuebler AC, Reuther T. Tissue engineering of human oral mucosa on different scaffolds: in vitro experiments as a basis for clinical applications. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology.* 2012;114(5):S190-S8.
167. Miron-Mendoza M, Lin X, Ma L, Ririe P, Petroll WM. Individual versus collective fibroblast spreading and migration: regulation by matrix composition in 3D culture. *Exp Eye Res.* 2012;99:36-44.
168. Rhee S. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp Mol Med.* 2009;41(12):858-65.
169. Gentile MT, Pastorino O, Bifulco M, Colucci-D'Amato L. HUVEC Tube-formation Assay to Evaluate the Impact of Natural Products on Angiogenesis. *J Vis Exp.* 2019(148).
170. Jia Y, Wang Q, Liang M, Huang K. KPNA2 promotes angiogenesis by regulating STAT3 phosphorylation. *J Transl Med.* 2022;20(1):627.
171. Sun J, Shen H, Shao L, Teng X, Chen Y, Liu X, et al. HIF-1 $\alpha$  overexpression in mesenchymal stem cell-derived exosomes mediates cardioprotection in myocardial infarction by enhanced angiogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):373.
172. Zou Y, Wu F, Liu Q, Deng X, Hai R, He X, et al. Downregulation of miRNA-328 promotes the angiogenesis of HUVECs by regulating the PIM1 and AKT/mTOR signaling pathway under high glucose and low serum condition. *Mol Med Rep.* 2020;22(2):895-905.
173. Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer.* 1998;75(5):780-6.
174. Zuo WH, Zeng P, Chen X, Lu YJ, Li A, Wu JB. Promotive effects of bone morphogenetic protein 2 on angiogenesis in hepatocarcinoma via multiple signal pathways. *Sci Rep.* 2016;6:37499.
175. Yuan M, Liu K, Jiang T, Li S, Chen J, Wu Z, et al. GelMA/PEGDA microneedles patch loaded with HUVECs-derived exosomes and Tazarotene promote diabetic wound healing. *J Nanobiotechnology.* 2022;20(1):147.
176. Miyazaki H, Tsunoi Y, Akagi T, Sato S, Akashi M, Saitoh D. A novel strategy to engineer pre-vascularized 3-dimensional skin substitutes to achieve efficient, functional engraftment. *Sci Rep.* 2019;9(1):7797.
177. Andrée B, Ichanti H, Kalies S, Heisterkamp A, Strauß S, Vogt PM, et al. Formation of three-dimensional tubular endothelial cell networks under defined serum-free cell culture conditions in human collagen hydrogels. *Sci Rep.* 2019;9(1):5437.
178. Arnal-Pastor M, Martínez-Ramos C, Vallés-Lluch A, Pradas MM. Influence of scaffold morphology on co-cultures of human endothelial and adipose tissue-derived stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2016;104(6):1523-33.

179. Asano Y, Nishiguchi A, Matsusaki M, Okano D, Saito E, Akashi M, et al. Ultrastructure of blood and lymphatic vascular networks in three-dimensional cultured tissues fabricated by extracellular matrix nanofilm-based cell accumulation technique. *Microscopy (Oxf)*. 2014;63(3):219-26.
180. Chen DY, Wei HJ, Lin KJ, Huang CC, Wang CC, Wu CT, et al. Three-dimensional cell aggregates composed of HUVECs and cbMSCs for therapeutic neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Biomaterials*. 2013;34(8):1995-2004.
181. Cheng P, Li S, Chen H. Macrophages in Lung Injury, Repair, and Fibrosis. *Cells*. 2021;10(2).
182. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445-55.
183. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*. 2014;41(5):694-707.
184. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-40.
185. Gharavi AT, Hanjani NA, Movahed E, Doroudian M. The role of macrophage subtypes and exosomes in immunomodulation. *Cell Mol Biol Lett*. 2022;27(1):83.
186. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cellular and molecular life sciences*. 2015;72:4111-26.
187. Bashir S, Sharma Y, Elahi A, Khan F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflammation research*. 2016;65:1-11.
188. Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection. *The Journal of pathology*. 2013;229(2):186-97.
189. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4):792-804.
190. Kim SY, Nair MG. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol*. 2019;97(3):258-67.
191. Garcia-Sabaté A, Mohamed WKE, Sapudom J, Alatoon A, Al Safadi L, Teo JCM. Biomimetic 3D Models for Investigating the Role of Monocytes and Macrophages in Atherosclerosis. *Bioengineering (Basel)*. 2020;7(3).
192. Ollington B, Colley HE, Murdoch C. Immunoresponsive Tissue-Engineered Oral Mucosal Equivalents Containing Macrophages. *Tissue Eng Part C Methods*. 2021;27(8):462-71.
193. Sapudom J, Karaman S, Mohamed WKE, Garcia-Sabaté A, Quartey BC, Teo JCM. 3D in vitro M2 macrophage model to mimic modulation of tissue repair. *NPJ Regen Med*. 2021;6(1):83.
194. Sapudom J, Mohamed WKE, Garcia-Sabaté A, Alatoon A, Karaman S, Mahtani N, et al. Collagen Fibril Density Modulates Macrophage Activation and Cellular Functions during Tissue Repair. *Bioengineering (Basel)*. 2020;7(2).
195. Shi H, Li D, Shi Q, Han Z, Tan Y, Mu X, et al. Three-Dimensional Culture Decreases the Angiogenic Ability of Mouse Macrophages. *Front Immunol*. 2021;12:795066.
196. Isali I, McClellan P, Wong TR, Hijaz S, Fletcher DR, Liu G, et al. Differential effects of macrophage subtype-specific cytokines on fibroblast proliferation and endothelial cell function in co-culture system. *J Biomed Mater Res A*. 2024.

197. Luo T, Tan B, Zhu L, Wang Y, Liao J. A Review on the Design of Hydrogels With Different Stiffness and Their Effects on Tissue Repair. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:817391.
198. Abdollahiyan P, Baradaran B, de la Guardia M, Oroojalian F, Mokhtarzadeh A. Cutting-edge progress and challenges in stimuli responsive hydrogel microenvironment for success in tissue engineering today. *Journal of Controlled Release.* 2020;328:514-31.
199. Liao J, Shi K, Jia Y, Wu Y, Qian Z. Gold nanorods and nanohydroxyapatite hybrid hydrogel for preventing bone tumor recurrence via postoperative photothermal therapy and bone regeneration promotion. *Bioactive materials.* 2021;6(8):2221-30.
200. Tan B, Wu Y, Wu Y, Shi K, Han R, Li Y, et al. Curcumin-microsphere/IR820 hybrid bifunctional hydrogels for in situ osteosarcoma chemo-co-thermal therapy and bone reconstruction. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2021;13(27):31542-53.
201. Abdollahiyan P, Oroojalian F, Mokhtarzadeh A, de la Guardia M. Hydrogel-based 3D bioprinting for bone and cartilage tissue engineering. *Biotechnology journal.* 2020;15(12):2000095.
202. Abdeen AA, Lee J, Bharadwaj NA, Ewoldt RH, Kilian KA. Temporal modulation of stem cell activity using magnetoactive hydrogels. *Advanced healthcare materials.* 2016;5(19):2536-44.
203. Dai CF, Zhang XN, Du C, Frank A, Schmidt H-W, Zheng Q, et al. Photoregulated gradient structure and programmable mechanical performances of tough hydrogels with a hydrogen-bond network. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2020;12(47):53376-84.
204. Deshpande SR, Hammink R, Nelissen FH, Rowan AE, Heus HA. Biomimetic stress sensitive hydrogel controlled by DNA nanoswitches. *Biomacromolecules.* 2017;18(10):3310-7.
205. Xavier JR, Thakur T, Desai P, Jaiswal MK, Sears N, Cosgriff-Hernandez E, et al. Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. *ACS nano.* 2015;9(3):3109-18.
206. Zhang Y, Chen M, Tian J, Gu P, Cao H, Fan X, et al. In situ bone regeneration enabled by a biodegradable hybrid double-network hydrogel. *Biomaterials science.* 2019;7(8):3266-76.
207. Abalymov A, Parakhonskiy B, Skirtach AG. Polymer-and hybrid-based biomaterials for interstitial, connective, vascular, nerve, visceral and musculoskeletal tissue engineering. *Polymers.* 2020;12(3):620.
208. Zhan X. Effect of matrix stiffness and adhesion ligand density on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2020;108(3):675-83.
209. Liu Y, Li Z, Li J, Yang S, Zhang Y, Yao B, et al. Stiffness-mediated mesenchymal stem cell fate decision in 3D-bioprinted hydrogels. *Burns & trauma.* 2020;8:tkaa029.
210. Bi X, Maturavongsadit P, Tan Y, Watts M, Bi E, Kegley Z, et al. Polyamidoamine dendrimer-PEG hydrogel and its mechanical property on differentiation of mesenchymal stem cells. *Bio-Medical Materials and Engineering.* 2019;30(1):111-23.
211. Cao H, Lee MKH, Yang H, Sze SK, Tan NS, Tay CY. Mechanoregulation of cancer-associated fibroblast phenotype in three-dimensional interpenetrating hydrogel networks. *Langmuir.* 2018;35(23):7487-95.
212. Mohammed M, Lai T-S, Lin H-C. Substrate stiffness and sequence dependent bioactive peptide hydrogels influence the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Chemistry B.* 2021;9(6):1676-85.

213. Stanton AE, Tong X, Lee S, Yang F. Biochemical ligand density regulates yes-associated protein translocation in stem cells through cytoskeletal tension and integrins. *ACS applied materials & interfaces*. 2019;11(9):8849-57.
214. R. Ibañez RI, Do Amaral RJ, Reis RL, Marques AP, Murphy CM, O'Brien FJ. 3D-printed gelatin methacrylate scaffolds with controlled architecture and stiffness modulate the fibroblast phenotype towards dermal regeneration. *Polymers*. 2021;13(15):2510.
215. Okamoto T, Takagi Y, Kawamoto E, Park EJ, Usuda H, Wada K, et al. Reduced substrate stiffness promotes M2-like macrophage activation and enhances peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression. *Experimental cell research*. 2018;367(2):264-73.
216. Sridharan R, Ryan EJ, Kearney CJ, Kelly DJ, O'Brien FJ. Macrophage polarization in response to collagen scaffold stiffness is dependent on cross-linking agent used to modulate the stiffness. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2018;5(2):544-52.
217. Zhuang Z, Zhang Y, Sun S, Li Q, Chen K, An C, et al. Control of matrix stiffness using methacrylate–gelatin hydrogels for a macrophage-mediated inflammatory response. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2020;6(5):3091-102.
218. Previtiera ML, Sengupta A. Substrate stiffness regulates proinflammatory mediator production through TLR4 activity in macrophages. *PloS one*. 2015;10(12):e0145813.
219. Advanced BioMatrix I. Hydrogel Stiffness of Diluted PureCol: Advanced BioMatrix, Inc.; 2019 [Available from: <https://advancedbiomatrix.com/diluted-purecol.html>].
220. de Lima Morais TM, Meyer PF, de Vasconcellos LS, JC ES, IF EA, de Farias VAF, et al. Effects of the extracorporeal shock wave therapy on the skin: an experimental study. *Lasers Med Sci*. 2019;34(2):389-96.
221. Ko J, Cho SB. Clinical Efficacy and Safety of Low-Energy Extracorporeal Shock Wave Therapy for Various Conditions of Deep Dermal and Subdermal Fibrosis. *Skin Res Technol*. 2024;30(10):e70082.
222. Kuo YR, Wu WS, Hsieh YL, Wang FS, Wang CT, Chiang YC, et al. Extracorporeal shock wave enhanced extended skin flap tissue survival via increase of topical blood perfusion and associated with suppression of tissue pro-inflammation. *J Surg Res*. 2007;143(2):385-92.
223. Vangaveti VN, Jhamb S, Goodall J, Bulbrook J, Biros E, Malabu UH. Extracorporeal Shockwave Therapy (ESWT) in the Management of Diabetic Foot Ulcer: A Prospective Randomized Clinical Trial. *J Foot Ankle Surg*. 2023;62(5):845-9.
224. Chen RF, Lin YN, Liu KF, Lee CC, Hu CJ, Wang CT, et al. Compare the effectiveness of extracorporeal shockwave and hyperbaric oxygen therapy on enhancing wound healing in a streptozotocin-induced diabetic rodent model. *Kaohsiung J Med Sci*. 2023;39(11):1135-44.
225. Wu F, Qi Z, Pan B, Tao R. Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) favors healing of diabetic foot ulcers: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2024;217:111843.
226. Charles R, Fang L, Zhu R, Wang J. The effectiveness of shockwave therapy on patellar tendinopathy, Achilles tendinopathy, and plantar fasciitis: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2023;14:1193835.
227. Cai Z, Falkensammer F, Andrukhov O, Chen J, Mittermayr R, Rausch-Fan X. Effects of Shock Waves on Expression of IL-6, IL-8, MCP-1, and TNF- $\alpha$  Expression by Human Periodontal Ligament Fibroblasts: An In Vitro Study. *Med Sci Monit*. 2016;22:914-21.
228. Mattyasovszky SG, Langendorf EK, Ritz U, Schmitz C, Schmidtman I, Nowak TE, et al. Exposure to radial extracorporeal shock waves modulates viability and gene expression of human skeletal muscle cells: a controlled in vitro study. *J Orthop Surg Res*. 2018;13(1):75.

229. Martini L, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, et al. Shock wave therapy as an innovative technology in skeletal disorders: study on transmembrane current in stimulated osteoblast-like cells. *Int J Artif Organs*. 2005;28(8):841-7.
230. Rompe JD, Kirkpatrick CJ, Küllmer K, Schwitalle M, Krischek O. Dose-related effects of shock waves on rabbit tendo Achillis. A sonographic and histological study. *J Bone Joint Surg Br*. 1998;80(3):546-52.
231. Chung E, Lee J, Liu CC, Taniguchi H, Zhou HL, Park HJ. Clinical Practice Guideline Recommendation on the Use of Low Intensity Extracorporeal Shock Wave Therapy and Low Intensity Pulsed Ultrasound Shock Wave Therapy to Treat Erectile Dysfunction: The Asia-Pacific Society for Sexual Medicine Position Statement. *World J Mens Health*. 2021;39(1):1-8.
232. Tepeköylü C, Lobenwein D, Blunder S, Kozaryn R, Dietl M, Ritschl P, et al. Alteration of inflammatory response by shock wave therapy leads to reduced calcification of decellularized aortic xenografts in mice†. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015;47(3):e80-90.
233. Sun D, Junger WG, Yuan C, Zhang W, Bao Y, Qin D, et al. Shockwaves induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through ATP release and activation of P2X7 receptors. *Stem Cells*. 2013;31(6):1170-80.
234. Weihs AM, Fuchs C, Teuschl AH, Hartinger J, Slezak P, Mittermayr R, et al. Shock wave treatment enhances cell proliferation and improves wound healing by ATP release-coupled extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation. *J Biol Chem*. 2014;289(39):27090-104.
235. Yu T, Junger WG, Yuan C, Jin A, Zhao Y, Zheng X, et al. Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298(3):C457-64.
236. Basoli V, Chaudary S, Cruciani S, Santaniello S, Balzano F, Ventura C, et al. Mechanical Stimulation of Fibroblasts by Extracorporeal Shock Waves: Modulation of Cell Activation and Proliferation Through a Transient Proinflammatory Milieu. *Cell Transplant*. 2020;29:963689720916175.
237. Huang Q, Yan P, Xiong H, Shuai T, Liu J, Zhu L, et al. Extracorporeal Shock Wave Therapy for Treating Foot Ulcers in Adults With Type 1 and Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Can J Diabetes*. 2020;44(2):196-204.e3.
238. Bertani FR, Mozetic P, Fioramonti M, Iuliani M, Ribelli G, Pantano F, et al. Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):8965.
239. Liu PT, Phan J, Tang D, Kanchanapoomi M, Hall B, Krutzik SR, et al. CD209(+) macrophages mediate host defense against *Propionibacterium acnes*. *J Immunol*. 2008;180(7):4919-23.
240. Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*. 2014;219(9):695-703.
241. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Nikiforov NG, Elizova NV, Sobenin IA, Orekhov AN. RETRACTED: Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: the associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. *International journal of cardiology*. 2015;184:436-45.
242. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front biosci*. 2008;13(13):453-61.
243. Wang LX, Zhang SX, Wu HJ, Rong XL, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol*. 2019;106(2):345-58.

244. Koning N, van Eijk M, Pouwels W, Brouwer MS, Voehringer D, Huitinga I, et al. Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation. *J Innate Immun.* 2010;2(2):195-200.
245. Liu L, Stokes JV, Tan W, Pruett SB. An optimized flow cytometry panel for classifying macrophage polarization. *J Immunol Methods.* 2022;511:113378.
246. Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *The Journal of Immunology.* 2012;189(7):3508-20.
247. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles M-P, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2007;110(13):4319-30.
248. Wang Q, Ni H, Lan L, Wei X, Xiang R, Wang Y. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell research.* 2010;20(6):701-12.
249. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International journal of molecular sciences.* 2018;19(6):1801.
250. Ferrante CJ, Leibovich SJ. Regulation of macrophage polarization and wound healing. *Advances in wound care.* 2012;1(1):10-6.
251. Zhang Q, Sioud M. Tumor-Associated Macrophage Subsets: Shaping Polarization and Targeting. *Int J Mol Sci.* 2023;24(8).
252. Allam M, Fathy H, Allah DA, Salem MAE. Lupus nephritis: correlation of immunohistochemical expression of C4d, CD163-positive M2c-like macrophages and Foxp3-expressing regulatory T cells with disease activity and chronicity. *Lupus.* 2020;29(8):943-53.
253. Bianchini R, Roth-Walter F, Ohradanova-Repic A, Flicker S, Hufnagl K, Fischer MB, et al. IgG4 drives M2a macrophages to a regulatory M2b-like phenotype: potential implication in immune tolerance. *Allergy.* 2019;74(3):483-94.
254. Olmes G, Büttner-Herold M, Ferrazzi F, Distel L, Amann K, Daniel C. CD163+ M2c-like macrophages predominate in renal biopsies from patients with lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:90.
255. Unuvar Purcu D, Korkmaz A, Gunalp S, Helvacı DG, Erdal Y, Dogan Y, et al. Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *PLoS One.* 2022;17(3):e0265196.
256. Baxter EW, Graham AE, Re NA, Carr IM, Robinson JI, Mackie SL, et al. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN $\gamma$ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods.* 2020;478:112721.
257. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41(1):14-20.
258. d'Agostino MC, Craig K, Tibalt E, Respizzi S. Shock wave as biological therapeutic tool: From mechanical stimulation to recovery and healing, through mechanotransduction. *Int J Surg.* 2015;24(Pt B):147-53.
259. Chen CS, Tan J, Tien J. Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004;6:275-302.
260. Kuo YR, Wang CT, Wang FS, Chiang YC, Wang CJ. Extracorporeal shock-wave therapy enhanced wound healing via increasing topical blood perfusion and tissue

regeneration in a rat model of STZ-induced diabetes. *Wound Repair and Regeneration*. 2009;17(4):522-30.

261. Wang C-J, Wang F-S, Yang KD. Biological effects of extracorporeal shockwave in bone healing: a study in rabbits. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2008;128:879-84.

262. Wang CJ, Wang FS, Yang KD, Weng LH, Hsu CC, Huang CS, et al. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon–bone junction. A study in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research*. 2003;21(6):984-9.

263. Kuo Y-R, Wu W-S, Hsieh Y-L, Wang F-S, Wang C-T, Chiang Y-C, et al. Extracorporeal shock wave enhanced extended skin flap tissue survival via increase of topical blood perfusion and associated with suppression of tissue pro-inflammation. *Journal of Surgical Research*. 2007;143(2):385-92.

264. Feng B, Dong Z, Wang Y, Yan G, Yang E, Cheng H, et al. Li-ESWT treatment reduces inflammation, oxidative stress, and pain via the PI3K/AKT/FOXO1 pathway in autoimmune prostatitis rat models. *Andrology*. 2021;9(5):1593-602.

265. Jeon SH, Zhu GQ, Kwon EB, Lee KW, Cho HJ, Ha US, et al. Extracorporeal shock wave therapy decreases COX-2 by inhibiting TLR4-NFκB pathway in a prostatitis rat model. *The Prostate*. 2019;79(13):1498-504.

266. Chen YL, Lin YP, Sun CK, Huang TH, Yip HK, Chen YT. Extracorporeal shockwave against inflammation mediated by GPR120 receptor in cyclophosphamide-induced rat cystitis model. *Mol Med*. 2018;24(1):60.

267. Buechler MB, Fu W, Turley SJ. Fibroblast-macrophage reciprocal interactions in health, fibrosis, and cancer. *Immunity*. 2021;54(5):903-15.

268. Meziani L, Mondini M, Petit B, Boissonnas A, de Montpreville VT, Mercier O, et al. CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages. *European Respiratory Journal*. 2018;51(3).

269. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest*. 2005;115(1):56-65.

270. Trebinjac S, Mujić-Skikić E, Ninković M, Karaiković E. Extracorporeal shock wave therapy in orthopaedic diseases. *Bosn J Basic Med Sci*. 2005;5(2):27-32.

271. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage*. 2006;52(9):24-35; quiz 6-7.

272. Liu Y, Chen X, Guo A, Liu S, Hu G. Quantitative Assessments of Mechanical Responses upon Radial Extracorporeal Shock Wave Therapy. *Adv Sci (Weinh)*. 2018;5(3):1700797.

273. Autengruber A, Gereke M, Hansen G, Hennig C, Bruder D. Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2012;2(2):112-20.

274. Chen S, So EC, Strome SE, Zhang X. Impact of Detachment Methods on M2 Macrophage Phenotype and Function. *J Immunol Methods*. 2015;426:56-61.

275. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Collagenase Impacts the Quantity and Quality of Native Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived during Processing of Umbilical Cord Tissue. *Cell Transplant*. 2018;27(1):181-93.

276. Botting RA, Bertram KM, Baharlou H, Sandgren KJ, Fletcher J, Rhodes JW, et al. Phenotypic and functional consequences of different isolation protocols on skin mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol*. 2017;101(6):1393-403.

277. Zhuge F, Ni Y, Nagashimada M, Nagata N, Xu L, Mukaida N, et al. DPP-4 Inhibition by Linagliptin Attenuates Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance by Regulating M1/M2 Macrophage Polarization. *Diabetes*. 2016;65(10):2966-79.
278. Gehwolf R, Spitzer G, Wagner A, Lehner C, Weissenbacher N, Tempfer H, et al. 3D-Embedded Cell Cultures to Study Tendon Biology. *Methods Mol Biol*. 2019;2045:155-65.
279. Gehwolf R, Schwemberger B, Jessen M, Korntner S, Wagner A, Lehner C, et al. Global Responses of Il-1 $\beta$ -Primed 3D Tendon Constructs to Treatment with Pulsed Electromagnetic Fields. *Cells*. 2019;8(5).
280. Wang C, Hou X, Qi N, Li C, Luo Y, Hu D, et al. An optimized method to obtain high-quality RNA from different tissues in *Lilium davidii* var. *unicolor*. *Sci Rep*. 2022;12(1):2825.
281. Yu C, Young S, Russo V, Amsden BG, Flynn LE. Techniques for the isolation of high-quality RNA from cells encapsulated in chitosan hydrogels. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(11):829-38.

## **8 Anhang**

### **8.1 Protokolle der Versuchsreihe 3D-Hautmodell auf Basis einer Kollagenmembran**

Die nachfolgenden Protokolle wurden uns freundlicherweise von der AG Brenner der Frauenklinik der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt.

#### **8.1.1 Isolation der Fibroblasten aus oraler Mundschleimhaut**

- Probe 2x für 15-20 Sekunden in 70% Ethanol desinfizieren
- Probe 1x spülen in DPBS
- Probe in DPBS in 6 Well (Corning CellBIND) Platte überführen
- Mit Skalpell Probe in 1 mm<sup>2</sup> große Stücke zerschneiden
- Jeweils 6 Stückchen in ein Well verteilen
- Für 15 Minuten im Brutschrank antrocknen (anheften) lassen
- 1,5 ml Fibro-Medium / Well aufpipettieren
- Im Brutschrank inkubieren lassen, bis Zellen zu sehen sind (Max. 5 Tage warten)
- Wechsel des Mediums alle 2-3 Tage
- CAVE: aufpassen, dass nicht verpilzt. Wenn ja, dann verwerfen
- Bei 90% Konfluenz / Well:
  - Gewebe entfernen
  - Zellen mit DPBS waschen
  - Mit Acutase 5 Minuten im Brutschrank lösen
  - In 2 ml Medium aufgenommen und gepoolt
  - Zentrifugieren
  - Resuspendieren und in Kulturflasche überführen

#### **8.1.2 Isolation der HUVECs**

- Generell: je frischer die Nabelschnur ist, desto weniger Blut ist koaguliert und desto leichter ist das Einführen der Braunüle
- 2 große Petrischalen vorbereiten - eine dient dem Lagern der Nabelschnur, die andere wird mit PBS gefüllt (einfacheres Aufziehen der Spritze)
- Die Nadel aus der Braunüle (G18 / grün) entfernen und diese auf etwa 2cm kürzen

- Die Nabelschnur aus dem Gefäß nehmen und an einem Ende gerade abschneiden (man kann dann die 2 Arterien und 1 Vene erkennen)
- Eine Nabelschnurlänge von ca. 25 cm ist ausreichend – ideal später gefüllt mit 10 ml Kollagenase
- Die gekürzte Braunüle sehr vorsichtig in die Vene einführen (diese ist großlumiger als die Arterien), mit einem Stück autoklavierter Schnur / dickem Nahtmaterial die Braunüle mittels 2 einfacher fester Knoten fixieren. Danach um die Flügel der Braunüle wickeln, damit diese nicht verrutscht
- 3-Wegehahn auf die Braunüle setzen – erleichtert das Einspritzen der Flüssigkeiten, jedoch nicht zwingend nötig
- Eine 10 ml Spritze mit PBS aufziehen und mit sanftem Druck durch den 3-Wegehahn die Nabelschnur spülen, diesen Vorgang mehrmals wiederholen, bis der Puffer klar ist (das Spülen dient der Entfernung von Blutgerinnseln in der Vene)
- Einmal vorsichtig mit Luft durchspritzen, um PBS vollständig zu entfernen
- Das andere Ende der Nabelschnur ebenfalls mit autoklavierter Schnur / dickes Nahtmaterial zubinden
- Mit einer frischen 10ml Spritze die verdünnte Kollagenase (vorher auf RT erwärmen) aufziehen (mit Hilfe der aus der Braunüle entfernten Nadel)
- Kollagenase in die Nabelschnur spritzen, wenn die Lösung oben herausquillt und / oder die Vene prall gefüllt ist, den 3-Wegehahn schließen
- Die Nabelschnur in eine saubere Petrischale legen
- 12 Minuten bei 37 °C im Brutschrank lagern
- Autoklavierten Trichter auf ein 50 ml Tube setzen, um ein sauberes Abgießen der Kollagenase – Zelloberflächenlösung zu ermöglichen. Wenn dieser nicht vorhanden ist: sich von einem Kollegen die Nabelschnur mit sicherem Abstand über den Tube halten lassen
- Schnur am Ende über dem Trichter abschneiden, 3-Wegehahn öffnen und die Kollagenase mit den gelösten Endothelzellen ins Tube laufen lassen
- Die Vene 2x mit 20ml PBS aus der Spritze nachspülen, Nabelschnur dabei leicht ausdrücken
- Mit max. 420 g zentrifugieren – HUVEC- Programm der Zentrifuge einstellen
- 25 mm<sup>2</sup> Kulturflasche vorbereiten
- Überstand aus Tube entfernen, Pallet in 5 ml HUVEC-Medium auflösen und in Mini-Flasche geben
- Zellen über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubieren, damit sie adhären können
- Am nächsten Tag:

- Zellen unter Mikroskop kontrollieren
- Medium entfernen
- Zellen mit PBS waschen, PBS dann entfernen (dient dazu die restlichen Erythrozyten zu entfernen)
- Neues HUVEC-Medium dazugeben
- Zellen weiter kultivieren
- Zellen im Verhältnis 1:3 splitten

### 8.1.3 Immunhistochemische Färbungen

- Zunächst wurden die Schnitte in der folgenden absteigenden alkoholischen Reihe hydratisiert und Paraffin entfernt:

| Lösung       | Dauer         |
|--------------|---------------|
| Xylol        | 3x 10 Minuten |
| 100% Ethanol | 2x 2 Minuten  |
| 96% Ethanol  | 2x 2 Minuten  |
| 70% Ethanol  | 1x 2 Minuten  |
| VE-Wasser    | 1x 1 Minuten  |

- Danach folgte die Hitzedemaskierung:
  - Dampfgerar vorheizen (bis Max. auffüllen)
  - Küvetten je nach primärem Antikörper mit 1x high (pH 9) Puffer befüllen.  
Ansetzen des high Puffers: 1:10 mit VE-Wasser
  - Küvette mit Objektträgern auffüllen und für ca. 10 Minuten im Dampfgerar inkubieren
  - Nach der Hitzedemaskierung die Küvetten aus dem Dampfgerar entnehmen und für 10 – 20 Minuten zum Abkühlen in Pufferlösung stehen lassen
  - Anschließend 2x mit VE-Wasser spülen
- Anschließend fand eine Blockierung der endogenen Peroxidase wie folgt statt:
  - Tücher in VE-Wasser tränken und damit den Behälter auslegen
  - 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stocklösung wird 1:10 auf 3 % mit VE-Wasser herunterverdünnt.  
Für 10 Objektträger ca. 1,5 ml ansetzen
  - Einkreisen der Schnitte mit Fettstift

- 150 µl der 3 % -Lösung pro Schnitt auf den umrandeten Bereich aufgetragen
- Inkubation in der geschlossenen Kammer für 10 Minuten
- Abschließend 2x mit VE-Wasser spülen und in DPBS (1:10 mit VE-Wasser verdünnt) überführen
- Danach werden die unspezifischen Antikörperbindungen blockiert:
  - 100µl der 1 % -Albumin Lösung (BSA 1% + DPBS) werden pro Schnitt auf den umrandeten Bereich aufgetragen
  - Inkubation in der geschlossenen Kammer bei RT für 1 h
  - Abschließend 2x mit VE-Wasser spülen
- Es folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper:
  - Je Gewebegröße werden 50 bis 100 µl Antikörperlösung benötigt.
  - Antikörper werden wie folgt in Envision Antibody Solution gelöst und aufgetragen:
    - CD31: 1:50
    - Tenascin: 1:50.000
    - CD45: 1:50
  - Auf Negativkontrolle wird nur Antibody Diluent aufgetropft
  - In der geschlossenen Kammer werden die Objektträger dann bei RT über Nacht bei 4 °C inkubiert
  - Nach Inkubation Schnitte 3x mit DPBS für 2 min waschen
- Inkubation (Sekundärantikörper) mit Dako Realtime Envision:
  - Je Gewebegröße werden 50 bis 100 µl Dako Real Envision sekundär Antikörperlösung benötigt
  - In geschlossener Kammer Objektträger bei RT für mindestens 30 Minuten inkubiert (siehe Datasheet)
  - Nach Inkubation Schnitte 3x mit DPBS für 2 Minuten waschen
- DAB Färbung:
  - DAB immer frisch ansetzen
  - 1:50 in DAB-Puffer verdünnen (Achtung: gleiche LOT-Nr.)
  - je Objektträger ca. 100 µl DAB-Lösung
  - Schnitte werden max. für 5 Minuten inkubiert oder bis die Färbung sichtbar wird (Überfärbung vermeiden)
  - 3x mit VE-Wasser für 2 Minuten waschen
- Zellkernfärbung /Mayers Hämalaun-Färbung
  - Hämalaun von der Firma Roth unverdünnt verwenden
  - für ca. 10 Minuten färben
  - zum Gewebe bläuen unter fließendem Leitungswasser ca. 10 Minuten spülen

- 1x in VE-Wasser spülen
- In der folgenden aufsteigenden alkoholischen Reihe werden die Schnitte entwässert:

| <b>Lösung</b> | <b>Dauer</b> |
|---------------|--------------|
| 70% Ethanol   | 1x spülen    |
| 96% Ethanol   | 1x 3 Minuten |
| 100% Ethanol  | 2x 5 Minuten |
| Xylol         | 3x 5 Minuten |

- Eingedeckt werden die Schnitte mit Hico-Mic. Dafür muss der Objektträger feucht durch Xylol sein und das Hico-Mic eine honigartige Konsistenz haben

#### **8.1.4 CD31-Fluoreszenzfärbung**

- Die fixierten Matrices zunächst 3 x mit 1 ml DPBS für jeweils 10 min, bei RT und 300 rpm waschen
- Danach die Matrices für 20 min in 0,2 % Triton-X in DPBS (200 µl) bei RT inkubieren
- Daraufhin die Matrices erneut 3 x für 10 min bei 300 rpm mit DPBS waschen
- Anschließend folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper. Hierzu Antikörper anti-CD31 1:50 in einer 1 % BSA/DPBS-Lösung verdünnen. Jeweils 200 µl auf die Matrices pipettieren. Dann für 1 h bei RT auf dem Schüttler und im Anschluss über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler bei 300 rpm inkubieren
- Am nächsten Tag die Matrices erneut 3 x für 10 min mit DPBS waschen.
- Danach wird der Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 1:200 in 1 % BSA/DPBS-Lösung verdünnt und jeweils 200 µl auf die Matrices pipettiert. Für 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubieren, lichtgeschützt durch Alufolie
- Abschließend werden die Matrices wiederholt 3 x mit DPBS gewaschen und bis zum Mikroskopieren dunkel in PBS kühl gelagert.
- Mikroskop: Leica TCS SP8

## **9 Danksagung**

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die mich und diese Arbeit in den letzten Jahren unterstützt haben.

## **10 Tabellarischer Lebenslauf**

