

**Hat eine milde Hyperthermie einen Einfluss auf
das Inflammationspotenzial von Zellen im
Wundheilungsgeschehen?**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Julius Maximilian Ehnert

geboren am 03.08.1994 in Kitzingen

Gutachter:

- 1. Frau Prof. Dr. rer. biol. hum. Ingrid Hilger, Jena**
- 2. Herr Prof. Dr. med. Udo Markert, Jena**
- 3. Herr PD Dr. med. habil. Jens-Peter Heyne, Weimar**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.10.2019

Abschluss Examen: 19.11.2019

„Ach, daß der Mensch doch durchsichtig wäre wie eine Qualle
und daß man den Sitz seiner Leiden schauen könnte.“

Wilhelm Conrad Röntgen (1845 – 1925)

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung	4
3	Einleitung	6
3.1	Erkrankungen mit chronischen Inflammationsprozessen.....	6
3.2	Inflammationsprozesse im Rahmen der normalen und pathologischen Wundheilung.....	7
3.3	Konventionelle Behandlungsmethoden im Rahmen von chronischen Wunden	9
3.4	Biologische Effekte einer Hyperthermiebehandlung auf Zellen.....	10
3.5	Bisherige Ansätze einer Hyperthermie als Behandlungsform von chronischen Wunden	11
4	Ziele der Arbeit	13
5	Materialien und Methoden	14
5.1	Materialien	14
5.1.1	Geräte	14
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
5.1.3	Chemikalien und Puffer	15
5.1.4	Antikörper.....	16
5.1.5	Software	17
5.1.6	Zelllinien	17
5.2	Methoden.....	17
5.2.1	Kultivierung von Zellen	17
5.2.2	Differenzierung von THP-1-Zellen	19
5.2.3	Nachweis der Zelldifferenzierung mittels Durchflusszytometrie	19
5.2.4	Erstellen einer Wachstumskurve für HMEC-1- und THP-1-Zellen.....	20
5.2.5	Durchführung der Brutschrankhyperthermie mit HMEC-1- und THP-1-Zellen	21

5.2.6	Vitalitätsuntersuchung der HMEC-1- und THP-1-Zellen mittels MTS-Test	22
5.2.7	Ermittlung der Langzeitvitalität der HMEC-1-Zellen durch Colony Forming Assays	23
5.2.8	Statistische Auswertung	24
6	Ergebnisse	25
6.1	HMEC-1-Zell-Wachstumskurve	25
6.2	HMEC-1-Zellen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität auf	26
6.3	HMEC-1-Zellen zeigen 14 Tage nach Anwendung einer milden Hyperthermie eine verringerte Vitalität.....	27
6.4	THP-1-Zell-Wachstumskurve	29
6.5	Undifferenzierte THP-1-Zellen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität auf.....	30
6.6	Differenzierung von THP-1-Zellen in M1- und M2-Makrophagen.....	31
6.7	M1-Makrophagen zeigen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität.....	35
6.8	M2-Makrophagen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine veränderte Vitalität auf	36
6.9	M1-Makrophagen zeigen nach Anwendung einer milden Hyperthermie eine tendenzielle Erhöhung von CD 163 und CD 206 auf der Zelloberfläche	37
7	Diskussion	40
7.1	HMEC-1-Zell-Wachstumskurve	40
7.2	HMEC-1-Zellen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität auf	41
7.3	HMEC-1-Zellen zeigen 14 Tage nach Anwendung einer milden Hyperthermie eine verringerte Vitalität.....	42
7.4	THP-1-Zell-Wachstumskurve	43

7.5	Undifferenzierte THP-1-Zellen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität auf.....	44
7.6	Differenzierung von THP-1-Zellen in M1- und M2-Makrophagen.....	45
7.7	M1-Makrophagen zeigen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität.....	46
7.8	M2-Makrophagen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine veränderte Vitalität auf	47
7.9	M1-Makrophagen zeigen nach Anwendung einer milden Hyperthermie eine tendenzielle Erhöhung von CD 163 und CD 206 auf der Zelloberfläche	48
8	Schlussfolgerungen	50
9	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	52
10	Anhang	57
10.1	Abbildungsverzeichnis	57
10.2	Tabellenverzeichnis	58
10.3	Danksagung.....	59
10.4	Ehrenwörtliche Erklärung.....	60

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A. dest	destilliertes Wasser (<i>aqua destillata</i>)
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Differenzierungsgruppe (<i>cluster of differentiation</i>)
CEM43	Kumulative äquivalente Minuten bei 43 °C (<i>cumulative equivalent minutes at 43 °C</i>)
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie mit Sortierung von fluoreszenzmarkierten Zellen (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FasL	Fas-Ligand
FKS	Fetales Kälberserum
geometr.	geometrisch
h	Stunde
HBSS	gepufferte Salzlösung (<i>Hank's balanced salt solution</i>)
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor-1α (<i>hypoxia inducible factor-1α</i>)
HMEC-1	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzelllinie-1 (<i>human dermal microvascular endothelial cell line-1</i>)

HSF-1	Hitzeschock Transkriptionsfaktor-1 (<i>heat shock factor-1</i>)
HSP	Hitzeschockprotein (<i>heat shock protein</i>)
HUVEC	Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
Hyp.	Hyperthermie
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRL	Irland
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
MCF-7	humane Brustkrebszelllinie (<i>michigan cancer foundation-7</i>)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensitäten
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mol	Mol
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazol
NF- κ B	nukleärer Faktor- κ B (<i>nuclear factor k-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDGF	von Thrombozyten freigesetzter Wachstumsfaktor (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PE	Phycoerythrin
PEMF	Therapie mit pulsierenden elektromagnetischen Feldern (<i>pulsed electromagnetic field therapy</i>)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung (<i>relative centrifugal force</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)

SAPK/JNK	Stress-aktivierte Proteinkinasen/C-Jun-N-terminale Kinasen
siRNA	Kleine eingreifende Ribonukleinsäure (<i>small interfering ribonucleic acid</i>)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (<i>transforming growth factor-β</i>)
TIMP	Inhibitor von Metalloproteinasen (<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>)
THP-1	Humane leukämische Zelllinie (<i>human leukemic cell line</i>)
UK	Vereinigtes Königreich (<i>United Kingdom</i>)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>United States of America</i>)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
vol.	Volumen
wIRA	Wassergefiltertes Infrarot A (<i>water-filtered infrared-A</i>)
z. B.	zum Beispiel

2 Zusammenfassung

Chronische Wunden treten im Rahmen verschiedener Erkrankungen auf und stellen ein zunehmendes Problem in unserer alternden Gesellschaft dar. Trotz der bestehenden unterschiedlichen Behandlungsmöglichkeiten ist die Heilung in vielen Fällen aufgrund verstärkter und verlängerter Inflammationsprozesse schwierig. Unter den verschiedenen Therapiemöglichkeiten liegen auch vielversprechende Behandlungsansätze mit Wärme vor. Dennoch kommt der Anwendung von Wärme in der Behandlung von chronischen Wunden nur ein geringer Stellenwert zu. Ein Grund dafür sind die noch weitgehend unklaren Auswirkungen einer Wärmebehandlung auf Zellen, die im Wundheilungsgeschehen eine wichtige Rolle einnehmen. Hierbei kommt vor allem den für die Angiogenese essenziellen Endothelzellen, sowie den an Inflammationsprozessen beteiligten M1- und M2-Makrophagen eine besondere Bedeutung zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss einer 60-minütigen milden Hyperthermiebehandlung bei 39 °C und 41 °C auf die Vitalität von sowohl Endothelzellen (HMEC-1-Zelllinie), als auch Monozyten (THP-1-Zelllinie) und den daraus differenzierten proinflammatorischen M1- und antiinflammatorischen M2-Makrophagen zu erfassen. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern sich M1-Makrophagen durch Anwendung einer milden Hyperthermie (39 °C und 41 °C) in M2-Makrophagen umwandeln lassen.

Zunächst wurde die Kurzzeitvitalität von HMEC-1-Zellen und THP-1-Zellen, welche sich in der logarithmischen Phase ihres Wachstums befanden, bis zu 72 h nach der Behandlung mit einer milden Hyperthermie mittels MTS-Test bestimmt. Im Falle der Endothelzellen wurde zusätzlich die Langzeitvitalität zum Zeitpunkt von 14 Tagen nach der Behandlung mit Hilfe eines Colony Forming Assays ermittelt. Im Anschluss an eine Differenzierung der THP-1-Zellen in M1- und M2-Makrophagen wurde bei diesen Zellen ebenfalls der Einfluss einer milden Hyperthermie auf die Kurzzeitvitalität mittels MTS-Test untersucht. Eine mögliche Umwandlung von M1- in M2-Makrophagen nach einer milden Hyperthermiebehandlung wurde anhand der Expression der für M2-Makrophagen typischen Oberflächenmarker CD 163 und CD 206 auf M1-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie erfasst.

Es konnte gezeigt werden, dass eine milde Hyperthermie die Kurzzeitvitalität der HMEC-1-Zellen in Abhängigkeit der Zeit tendenziell erhöht. Demgegenüber war in diesen Zellen die Langzeitvitalität vermindert. THP-1-Zellen und die daraus differenzierten M1-Makrophagen wiesen nach einer milden Hyperthermiebehandlung eine erhöhte Vitalität über einen Nachbeobachtungszeitraum von 72 h auf. Im Falle der M2-Makrophagen steigerte hingegen lediglich eine Temperatur von 41 °C zum Zeitpunkt von 48 h nach der Behandlung die Vitalität der Zellen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass M1-Makrophagen, welche einer milden Hyperthermie ausgesetzt waren, über einen Zeitraum von 48 h nach einer Behandlung eine tendenziell erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD 163 und CD 206 aufwiesen.

Zusammenfassend wurde veranschaulicht, dass eine milde Hyperthermie Funktionen von am Wundheilungsgeschehen beteiligten Zellen beeinflusst. Übertragen auf das Wundheilungsgeschehen lässt eine erhöhte Vitalität von Endothelzellen eine gesteigerte Angiogenese vermuten. Eine gesteigerte Vitalität von M1-Makrophagen könnte sich positiv auf proinflammatorische Prozesse in der frühen Phase der Wundheilung auswirken, während eine Vitalitätserhöhung von M2-Makrophagen von Bedeutung für die Steuerung von antiinflammatorischen Vorgängen in den späten Phasen der Wundheilung sein könnte. Eine durch Anwendung einer milden Hyperthermie bedingte Umwandlung von M1- in M2-Makrophagen könnte zudem antiinflammatorische Prozesse fördern und damit die Wundheilung beschleunigen.

3 Einleitung

Entzündliche Prozesse sind im menschlichen Körper von hoher Bedeutung. Sie sind sowohl für die Abwehr von Pathogenen, als auch für die Heilung von inneren und äußeren Verletzungen des Körpers notwendig und grundsätzlich von Vorteil für den Menschen. Inflammatorische Prozesse werden erst nachteilig, wenn sie übermäßig und chronisch verlaufen. Dies ist dann einerseits mit der Entstehung, andererseits aber auch mit der Progression bzw. Aufrechterhaltung verschiedener Erkrankungen assoziiert.

3.1 Erkrankungen mit chronischen Inflammationsprozessen

Inflammationsprozesse spielen sowohl bei Tumorerkrankungen, als auch bei metabolischen, kardiovaskulären und rheumatischen Erkrankungen eine wesentliche Rolle. Als Bestandteil des Tumorgeschehens fördern Inflammationsprozesse die Proliferation sowie das Überleben der malignen Zellen, Angiogenese, Metastasierung und eine reduzierte Antwort auf Chemotherapeutika und Hormone (Colotta et al. 2009). Des Weiteren finden sich entzündliche Prozesse bei Adipositas, Diabetes Mellitus Typ 2, metabolischem Syndrom und Atherosklerose (Kuroda und Sakaue 2017, Esser et al. 2014, Rosenfeld 2013). Zudem sind sowohl Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, wie die rheumatoide Arthritis und der systemische Lupus erythematodes, als auch chronische Infektionen, wie Hepatitis B und C, mit chronischer Inflammation vergesellschaftet (Straub und Schradin 2016, Karin et al. 2006). Ebenfalls sind Inflammationsprozesse ein wichtiger Bestandteil im Heilungsgeschehen von Wunden und können unter bestimmten Bedingungen zu einer pathologischen Wundheilung im Sinne einer Chronifizierung der Wunde beitragen (Zhao et al. 2016). Es wird geschätzt, dass 1 – 2 % der Bevölkerung in den Industrieländern eine chronische Wunde während ihres Lebens entwickeln (Sen et al. 2009). Allein in Deutschland weisen ca. 2 – 3 Millionen Menschen chronische Wunden auf (Korber et al. 2011). Die Ursachen für die Entstehung sind vielfältig. Oftmals führen Erkrankungen wie Diabetes und vaskuläre Insuffizienz, aber auch fortgeschrittenes Alter der Patienten und lokale Faktoren wie Druck, Infektion und Ödem zu einer verzögerten Wundheilung (Fonder et al. 2008). Im Falle der Diabetes mellitus Erkrankung entsteht als Komplikation oftmals eine chronische

Wunde im Fußbereich, welche als diabetisches Fußulkus bezeichnet wird (Zhao et al. 2016). Das Risiko eines Patienten, welcher an Diabetes erkrankt ist, eine solche Komplikation zu entwickeln kann bei bis zu 25 % liegen (Bowling et al. 2015). Hat ein Patient einmal einen diabetischen Fuß entwickelt, ist die Heilung schwierig und in einem von zehn Fällen folgt eine Amputation (Game und Jeffcoate 2016). Abgesehen von einem diabetischen Fußulkus, manifestieren sich chronische Wunden oftmals als Beinulkus (Korber et al. 2011). Die häufigste Form stellt hierbei das venöse Ulkus dar (Fonder et al. 2008).

3.2 Inflammationsprozesse im Rahmen der normalen und pathologischen Wundheilung

Die Wundheilung ist ein komplexer und dynamischer Prozess im menschlichen Körper (Guo und DiPietro 2010). Im Rahmen der normalen Wundheilung werden nacheinander die Phase der Hämostase, die Inflammationsphase, die Proliferationsphase und die Resolutionsphase durchlaufen (Gosain und DiPietro 2004). In der Phase der Hämostase wird durch Koagulationsprozesse eine vorläufige Wundmatrix, vorwiegend bestehend aus Fibrin und Thrombozyten, gebildet, während die darauf folgende Inflammationsphase durch eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus Leukozyten und eine Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen gekennzeichnet ist (Diegelmann und Evans 2004, Zhao et al. 2016). In der Proliferationsphase findet eine Reepithelialisierung und eine Angiogenese, in der Resolutionsphase eine Wundkontraktion und eine Remodellierung der Extrazellulären Matrix statt (Zhao et al. 2016). Monozyten reifen in der Inflammationsphase zu Makrophagen und nehmen somit eine Schlüsselrolle für den weiteren Verlauf der Wundheilung ein (Li et al. 2007). Bei Makrophagen werden zunächst 2 Aktivierungszustände unterschieden (Rodero und Khosrotehrani 2010). M1-aktivierte Makrophagen weisen proinflammatorische Funktionen, wie die Produktion von TNF- α , IL-1 und IL-6, M2-aktivierte Makrophagen einen antiinflammatorischen Charakter mit Produktion von Zytokinen, wie IL-10, und Wachstumsfaktoren, wie EGF und VEGF, auf (Ferrante und Leibovich 2012, Rodero und Khosrotehrani 2010, Hesketh et al. 2017). Im Laufe der normalen Wundheilung findet eine Umwandlung des Aktivierungszustandes der Makrophagen statt, was sich daran zeigt, dass M1-

Makrophagen zu Beginn der inflammatorischen Phase in der Wunde überwiegen und in der späten inflammatorischen Phase, der Proliferationsphase und der Resolutionsphase hauptsächlich M2-Makrophagen in der Wunde vorhanden sind (Sindrilaru und Scharffetter-Kochanek 2013). Ebenfalls kommt den Endothelzellen eine wichtige Bedeutung in der Wundheilung zu. Endothelzellen sind in der Proliferationsphase verantwortlich für die Neovaskularisierung der Wunde (Hesketh et al. 2017, Guo und DiPietro 2010). Eine durch die Endothelzellen bedingte Angiogenese ist für die Versorgung der Wunde mit Sauerstoff und sonstigen Nährstoffen und damit für die Wundheilung essentiell (Rodero und Khosrotehrani 2010, Okonkwo und DiPietro 2017).

Bei der pathologischen Wundheilung kommt es zu einem Verharren des Wundheilungsprozesses in der Inflammationsphase, was eine Chronifizierung von Wunden begünstigt (Zhao et al. 2016). In dieser deutlich verlängerten und verstärkten Inflammationsphase kommt es zu einer erhöhten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und IL-1 β , welche wiederum eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und eine Inhibition von *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) bedingen (Zhao et al. 2016, Demidova-Rice et al. 2012). Dadurch wird extrazelluläre Matrix abgebaut, wobei die entstehenden Abbauprodukte einen erneuten Inflammationsreiz darstellen, was letztendlich zu einem chronisch selbsterhaltenden Prozess führt (Zhao et al. 2016, Menke et al. 2007). Eine wichtige Stellung im Inflammationsgeschehen von chronischen Wunden kommt ebenfalls neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zu, welche verstärkt MMPs, Kollagenase und Elastase, die einen übermäßigen Abbau von Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF und TGF- β , bedingen und dadurch die zur Wundheilung nötige Angiogenese und Gewebekonstruktion hemmen, freisetzen (Zhao et al. 2016). Im Rahmen von chronischen Wunden bleibt zudem auch die Umwandlung von M1- zu M2-Makrophagen aus, wodurch verstärkt M1-Makrophagen in der Wunde vorliegen, die vor allem durch ihre proinflammatorische Zytokinproduktion das oben bereits beschriebene Verharren chronischer Wunden in der Inflammationsphase mitbedingen (Sindrilaru und Scharffetter-Kochanek 2013, Zhao et al. 2016). Durch die verminderte Umwandlung zu M2-Makrophagen fehlen die notwendigen antiinflammatorischen und angiogenen Signale, um eine Formation von Granulationsgewebe, eine Reepithelialisierung und eine Myofibroblasten-

assoziierte Wundkontraktion zu unterstützen (Sindrilaru und Scharffetter-Kochanek 2013). Weiterhin zeigen chronische Wunden eine unzureichende Bildung neuer Blutgefäße, was durch eine verringerte Kapillardichte und Vaskularisierung deutlich wird (Okonkwo und DiPietro 2017). Ein Grund hierfür ist ein höherer Anteil an antiangiogenen Proteinen, wie die Myeloperoxidase, in chronischen Wunden (Eming et al. 2014). Demgegenüber sind angiogene Stimulatoren, wie die extrazelluläre Superoxid-Dismutase, erniedrigt (Eming et al. 2014).

3.3 Konventionelle Behandlungsmethoden im Rahmen von chronischen Wunden

Grundsätzlich basiert die Therapie von chronischen Wunden auf dem chirurgischen, mechanischen, enzymatischen und autolytischen Wunddébridement zur Herstellung eines physiologischen Wundmilieus, dem Einsatz von Verbänden zur Exsudatkontrolle, der antibiotischen Therapie bzw. Infektionsprophylaxe und der Deckung des Gewebedefektes durch Transplantate (Zhao et al. 2016, Han und Ceilley 2017).

Unter den Transplantaten hat sich der Autograft, welcher einer Deckung des Defektes mit einem an anderer Körperstelle des Patienten entnommenen Hautlappen entspricht, als Goldstandard bewährt (Dreifke et al. 2015). Jedoch gibt es auch die Möglichkeit kultivierte epitheliale Autografts, basierend auf den patienteneigenen Keratinozyten, zu verwenden, wobei aufgrund langer Herstellungszeiten deren klinischer Einsatz limitiert ist (Dreifke et al. 2015, Clark et al. 2007). Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, Keratinozyten von einem Spender zu transplantieren, wobei auch hier das Proliferationsverhalten der Keratinozyten stark von der Qualität des Spender-Transplantates abhängig ist (Dreifke et al. 2015, Clark et al. 2007).

Ein weiterer Baustein der Wundbehandlung ist, wie bereits oben erwähnt, der Einsatz von Verbänden, welche zur Hydratation, zum Infektionsschutz, zur Regenerationsunterstützung und zum Schutz der Wundfläche dienen (Dreifke et al. 2015). Grundlage der hierbei verwendeten Materialien sind Kollagene, Hydrogele, Hydrokolloide, Alginat, Hyaluronsäure, Biobrane, welches einem mit

einer Nylon-Matrix aus Schweinekollagen verknüpften Silikonfilm entspricht, und Chitosan (Dhivya et al. 2015).

Weitere Therapiemöglichkeiten sind die hyperbare Sauerstofftherapie zur Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe, die Vakuumtherapie, um durch Aufbau eines negativen Drucks Flüssigkeit aus der Wunde zu ziehen, eine elektrische Stimulationstherapie zur Beeinflussung von Membranpotenzialen der Wundzellen und eine Low-Level-Laser-Therapie, bei der versucht wird, mit Photonen Energie zur ATP-Produktion zu übertragen (Boateng und Catanzano 2015, Huang et al. 2014, Kranke et al. 2004).

Experimentelle Ansätze sind die lokale Gabe von Wachstumsfaktoren, wie z. B. EGF, die Gabe von siRNAs zur Stilllegung proinflammatorischer Gene, Stammzelltherapie und die Behandlung in pulsierenden elektromagnetischen Feldern (PEMF) (Boateng und Catanzano 2015, Wong und Gurtner 2012).

3.4 Biologische Effekte einer Hyperthermiebehandlung auf Zellen

Eine therapeutische Hyperthermie ist Gegenstand der aktuellen Forschung, speziell im Rahmen der Tumorbehandlung. Eine Hyperthermie kann lokal durch interne, wie z. B. magnetische Nanopartikel, oder externe Energiequellen, wie z. B. elektromagnetische Strahlung und Ultraschalltherapie, regional durch Veränderung der Perfusion des zu behandelten Gebietes und in Form einer Ganzkörperhyperthermie angewendet werden (Ahmed und Zaidi 2013). Besonders die Kombination der Hyperthermie mit Radio- und Chemotherapie im Rahmen der Tumorbehandlung hat sich bisher in Studien als vielversprechende Therapiemöglichkeit herausgestellt (Wust et al. 2002).

Zelluläre Effekte der Hyperthermie sind zum einen die Erhöhung der Zellmembranpermeabilität, was zu einer Elektrolytimbalance in der Zelle führt, zum anderen Veränderungen am Zytoskelett, wie beispielsweise eine Alteration der Mitosespindel (Ahmed und Zaidi 2013). Ebenfalls bewirkt eine Hyperthermie eine Denaturierung von Proteinen, wodurch es zu einer Hemmung von DNA-Reperaturenzymen und einer Zellapoptose kommen kann (Ahmed und Zaidi 2013, DeNardo und DeNardo 2008). Zudem kann eine Apoptose durch eine Hyperthermie-bedingte verstärkte ROS-Produktion in den Mitochondrien ausgelöst werden (Bettaieb et al. 2013). Besonders hitzesensibel sind Zellen, die sich

innerhalb ihres Zellzyklus in der M-Phase befinden, währenddessen Zellen in der G1-Phase relativ hitzeresistent sind (Hildebrandt et al. 2002). Eine Hyperthermie kann auch zu einer gesteigerten Expression von HSPs in der Zelle führen, was im Laufe einer Behandlung je nach Therapieziel eine erwünschte oder unerwünschte Thermotoleranz der Zellen auslösen kann (Hildebrandt et al. 2002). Zusätzlich können immunologische Effekte im Rahmen der Hyperthermie auftreten. Hitze führt zu einer verstärkten Expression von Oberflächenmolekülen auf Immunzellen, bewirkt somit eine verstärkte Migration dieser Zellen in das jeweilige Gewebe und erhöht die Produktion und Freisetzung von Zytokinen (Bettaieb et al. 2013).

Allgemein werden bei der Behandlung mit Hitze Temperaturen von über 37 °C bis 45 °C als Hyperthermie und Temperaturen über 45 °C als Thermoablation beschrieben (Hilger 2013). Des Weiteren werden speziell Temperaturen, welche kleiner als 42 °C sind, als moderate bzw. im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit als milde Hyperthermie bezeichnet (Hildebrandt et al. 2002).

3.5 Bisherige Ansätze einer Hyperthermie als Behandlungsform von chronischen Wunden

Hyperthermie als Behandlung von chronischen Wunden kann zum einen zur Infektionsbekämpfung eingesetzt werden. Hierbei werden magnetische Nanopartikel, die mit gegen Pathogene gerichtete Antikörper gekoppelt werden, eingesetzt, welche im Magnetfeld Hitze erzeugen und somit gezielt Bakterien im Biofilm der Wunde abtöten (Kim 2016). Zum anderen werden hypertherme Bedingungen direkt zur Verbesserung der Wundheilung genutzt. Zur Erzeugung der Wärme wird in der Klinik wIRA-Strahlung verwendet, welche einer Hitzestrahlung von 780 nm bis 1400 nm entspricht und das Blut in den oberflächlichen Kapillaren der Wunde erhitzt, wodurch es zum Transport von Wärme in die tieferen Wundschichten kommt, ein Temperaturanstieg zu einer Vasodilatation der dort verlaufenden Gefäße führt und der Blutfluss in der Wunde gesteigert wird (Mercer et al. 2008). Dies führt wiederum zu einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck im Gewebe, somit zu einer erhöhten Energieproduktion in den Zellen und letztendlich zu einer verbesserten Wundheilung (Mercer et al. 2008). Ebenfalls normalisiert wIRA-Strahlung das thermische Verhältnis in Wunden, da chronische Wunden ohne Therapie ein hyperthermes randständiges Gewebe und einen hypothermen Wundgrund aufweisen (Mercer et al. 2008). Die

Therapie mit wIRA erhöht sowohl den Infektionsschutz als auch die Regeneration der Wunde und vermindert gleichzeitig Exsudation, Inflammation und Schmerzen (Hoffmann et al. 2016).

Ein experimenteller Ansatz zur hyperthermen Wundbehandlung ist die Verwendung von Chitosan-Verbänden in Kombination mit hexagonalen Silber-Nanopartikeln, die unter Infrarotbestrahlung einer Wellenlänge von 1064 nm Hitze erzeugen (Levi-Polyachenko et al. 2016). In vitro konnten sich somit unter hyperthermen Bedingungen von 38 °C bis 44 °C Fibroblasten und Keratinozyten auf den Chitosanfilmen vermehren und eine gesteigerte Aufnahme von kleinen Molekülen in die Zellen, gemessen anhand der intrazellulären Aufnahme von mit fluoreszierenden Stoffen gekoppeltem Dextran, nachgewiesen werden (Levi-Polyachenko et al. 2016).

Zudem wurden Studien durchgeführt, um genaue Temperaturbereiche zu bestimmen, in denen die Angiogenese und dementsprechend auch die Wundheilung voranschreitet. Bei Endothelzellen, die im Inkubator 60 min einer Temperatur von 41 °C ausgesetzt waren, konnte eine gute Formierung von Gefäßen beobachtet werden, während bei Endothelzellen, die 60 min mit 42,5 °C therapiert wurden, die Gefäßbildung geringer ausfiel (Rattan et al. 2007). Es wurde dabei angenommen, dass bei mit 41 °C behandelten Endothelzellen verstärkt HSP 90, welches die NO-Produktion durch die NO-Synthase steigert, exprimiert wird und somit die Angiogenese gefördert wird (Rattan et al. 2007). Allerdings wird die Wundheilung bei noch höheren Temperaturen beeinträchtigt. Mäuse, die nach künstlicher Zufuhr einer Wunde über 13 Tage täglich 30 min mit einer Ganzkörperhyperthermie bei 43 °C behandelt wurden, wiesen im Laufe der 13 Tage eine Vergrößerung der Wunde, einer Vermehrung von Makrophagen in der Wunde und einen verstärkten Abbau von Kollagen Typ 1 durch sezernierte MMPs auf (Dos Santos-Silva et al. 2017).

4 Ziele der Arbeit

Chronische Wunden treten als Begleiterscheinung bei vielen Erkrankungen auf. Trotz der verschiedenen vorhandenen Therapieansätze und -techniken stellt die Behandlung immer noch eine große Herausforderung in der heutigen Medizin dar. Einzelne vorangegangene Studien belegen die potentiell günstige Wirkung von Wärme. Dennoch fehlt bisher ein umfassendes Verständnis der Wirkmechanismen dieses Ansatzes. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es den Einfluss einer milden Hyperthermie (39 °C und 41 °C) auf zelluläre Funktionen von Makrophagen und Endothelzellen im Wundheilungsgeschehen *in vitro* zu untersuchen.

Im ersten Teil der Arbeit wird ermittelt, ob Temperaturen im Bereich von 39 °C bis 43 °C die Vitalität von Endothelzellen (HMEC-1-Zelllinie), die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, beeinflussen. Die Zellen werden hierfür im Brutschrank über einen Zeitraum von 60 min mit den genannten Temperaturen behandelt. Die Vitalitäten werden anschließend über einen Zeitraum von 3 Tagen (Kurzzeiteffekt), sowie zum Zeitpunkt von 14 Tagen (Langzeiteffekt) nach der Behandlung erfasst.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Wirkung der Hyperthermie auf die Funktion von Makrophagen untersucht. Da sich diese Zellen aus Monozyten differenzieren, wird zunächst der Einfluss von Temperaturen im Bereich von 39 °C bis 43 °C auf die Vitalität von THP-1-Zellen (monozytische Zelllinie), die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, untersucht. Die THP-1-Zellen werden für 60 min im erwähnten Temperaturbereich im Brutschrank behandelt und die Vitalität wird über einen Zeitraum von 3 Tagen nach der Behandlung ermittelt. Im nächsten Schritt werden die THP-1-Zellen sowohl in M1- als auch M2-Makrophagen differenziert und deren Vitalität nach einer milden Hyperthermie bei 39 °C und 41 °C unter den gleichen Bedingungen wie für THP-1-Zellen untersucht.

Abschließend wird überprüft, inwiefern eine milde Hyperthermie bei 39 °C und 41 °C in der Lage ist M1-Makrophagen in M2-Makrophagen umzuwandeln. Hierfür werden M1-Makrophagen einer 60-minütigen Hyperthermie im Brutschrank unterzogen und über einen Zeitraum von 48 h nach der Behandlung auf M2-Makrophagen-typische Oberflächenmarker untersucht.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte sowie deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Brenner „Schuett-Phoenix“	Schuett-Biotec GmbH, D
Brutschrank „HERAcell“	Heraeus Holding GmbH, D
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	BD Biosciences, USA
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH
Fotemp 6 OPTOcon	Weidmann Technologies Deutschland GmbH, D
Gefrierschrank „Forma 900 Series“ (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, USA
Gefrierschrank „Liebherr premium“ (-20°C)	Liebherr-International Deutschland GmbH, D
Kamera „Canon EOS 650D“	Canon Deutschland GmbH, D
Kühlschrank „Economic“ (4°C)	Bosch, D
Kühlschrank „Liebherr profi line“ (8°C)	Liebherr-International Deutschland GmbH, D
Laptop „acer TravelMate 5742Z“	Acer Computer GmbH, D
Magnetrührer „PMC“	Barnstead, USA
Mikroskop „Evos XL“	Advanced Microscopy Group, D
pH-Meter „WTW“	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, D
Pipetten	Eppendorf Research, D
Pipetten	Brand GmbH & Co KG, D
Pipettierhilfe „accu-jet © pro“	Brand GmbH & Co KG, D
Präzisionswaage 440	KERN & SOHN GmbH, D
TECAN Sunrise Plattenreader	TECAN Trading AG, CH
Thermoelemente TS5/2A (Fiber Optic Temperature Sensor)	Weidmann Technologies Deutschland GmbH, D
Vakuumsauger „BVC professional“	Vacuubrand GmbH & Co KG, D
Wasserbad „E100“ (37°C)	Lauda GmbH & Co KG, D
Werkbank „Hera Safe“	Thermo Fisher Scientific, USA
Werkbank „Holten Lamin air“	Thermo Fisher Scientific, USA
Zellzähler „Casy®“	Roche Applied Science, D
Zentrifuge „320R“	Hettich GmbH & CoKG, D

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Casy®-Cups	Roche Applied Science, D
Eppendorf-Cups 0,5-2 ml	Eppendorf AG, D
FACS-Röhrchen	Corning Incorporated, USA
Falcontubes, 15 ml/ 50 ml	Greiner Bio-One, D
Messpipette 10 ml/ 20 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, D
Micro-Sterilfilter 0,22 µm	Merck Millipore Ltd., IRL
Mikrotiterplatten, 96-Well	Greiner Bio-One, D
Multiwellplatten, 6-Well	Greiner Bio-One, D
Parafilm "PM-966"	Bemis Company, Inc., USA
Pasteurpipetten	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, D
Pipettenspitzen	Brand GmbH & Co KG, D
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, D
Spritze Omnifix 10 ml	B. Braun Melsungen AG, D
Zellkulturflaschen, 25 cm ² -175 cm ²	Greiner Bio-One, D
Zellschaber	Sarstedt AG & Co KG, D

5.1.3 Chemikalien und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Biotase	Biochrom GmbH, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, D
Casy®ton	OmniLife Science GmbH, D
Coomassie® Brillant Blau G250	Merck KGaA, D
CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega Corporation, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, D
Essigsäure ≥ 99,7%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D
Ethanol 96% (vol.), vergällt	Nordbrand Nordhausen GmbH, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies Corporation, D
GlutaMAX-1	Life Technologies Corporation, D
Hank's balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom GmbH, D
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D
Interferon-γ (IFN-γ)	PeproTech, Inc., USA
Interleukin-4	Miltenyi Biotec, D

Interleukin-13	Miltenyi Biotec, D
Kaliumchlorid	Fluka Chemie GmbH, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D
MCDB 131 Medium	Life Technologies Corporation, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, D
Natrium-pyruvat	Invitrogen AG, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D
Rekombinantes humanes EGF	Invitrogen AG, USA
RPMI 1640 Medium	Life Technologies Corporation, D

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer sowie deren Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	1 % BSA in PBS
„Phosphate buffered saline“-Puffer (PBS)	0,008 mol/l Dinatriumhydrogenphosphat 0,003 mol/l Kaliumchlorid 0,0015 mol/l Kaliumdihydrogenphosphat 0,137 mol/l Natriumchlorid pH 7,4

5.1.4 Antikörper

Die in dieser Arbeit für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper mit der Spezies des Spendertiers, der Markierung, der für die Durchflusszytometrie notwendigen Verdünnung und deren Hersteller

Antikörper	Spezies des Spendertiers	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Anti-human-CD 86	Maus	PE-gekoppelt	1:50	Abcam, UK
Anti-human-CD 163	Maus	PE-gekoppelt	1:200	Abcam, UK
Anti-human-CD 206	Maus	PE-gekoppelt	1:100	Miltenyi Biotec, D
Mouse-IgG1-Isotypkontrolle	Maus	PE-gekoppelt	1:1000	Miltenyi Biotec, D

5.1.5 Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Software-Programme sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Software-Programme und deren Hersteller

Software	Hersteller
Adobe Acrobat Pro XI	Adobe Systems Software Ireland Limited, IRL
CellQEst Pro™	BD Biosciences, D
EndNote X6	Clarivate Analytics, USA
FoTempMKT	Weidmann Technologies Deutschland GmbH, D
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Cooperation, USA

5.1.6 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Zelllinien, der Zellart und deren Herkunft

Zelllinie	Zellart	Herkunft
HMEC-1	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen	Centers for Disease Control and Prevention, USA
THP-1	Humane monozytische Leukämiezellen	Cell Lines Service GmbH, D

5.2 Methoden

5.2.1 Kultivierung von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit unter Verwendung des jeweils in Tabelle 8 aufgezeigten Mediums kultiviert. Die Arbeit mit den Zelllinien erfolgte ausschließlich unter sterilen Bedingungen. Um den Einfluss einer zu hohen Passagezahl der Zellen auf die Versuche zu minimieren, wurden die Zellen in einem Rahmen von 15 Passagen kultiviert.

HMEC-1-Zellen wurden bei einer 80 – 90 %igen Konfluenz passagiert. Dabei wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgenommen und die Zellen drei Mal mit HBSS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurden diese mit 1,5 ml Biotase über eine Dauer von 5 min bei 37 °C, 5 % CO₂

und 95 %iger Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 8,5 ml Medium zu den Zellen hinzugegeben und die damit entstandene Zellsuspension in ein Falcontube überführt. Aus dieser Zellsuspension wurden 50 µl abgenommen und für die Zellzählung verwendet. Diese erfolgte mit Hilfe des „Casy®“-Zellzählers. Die im Falcontube verbliebene Zellsuspension wurde darauf folgend 5 min bei 200 rcf zentrifugiert. Danach wurde der Mediumüberstand abgenommen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Die für die entsprechenden Versuche und für die Weiterkultivierung der Zellen benötigte Zellzahl wurde in dem mit Hilfe der Zellzählung berechneten Volumen abgenommen und erneut in Zellkulturflaschen bzw. Wellplatten hinzugegeben.

THP-1-Zellen wurden ebenfalls bei 80 – 90 %iger Konfluenz passagiert. Da es sich bei THP-1-Zellen um Suspensionszellen handelt, konnte hierbei auf Waschvorgänge und Substanzen zur Ablösung der Zellen verzichtet werden. Die Zellen wurden direkt mit dem Medium aus der Zellkulturflasche in ein Falcontube überführt, woraufhin 50 µl zur Zellzählung mittels „Casy®“-Zellzähler abgenommen wurden und der verbleibende Inhalt des Falcontubes 5 min bei 150 rcf zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde der Mediumüberstand abgenommen und die Zellen in entsprechendem frischem Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurde darauf folgend das mittels Zellzählung berechnete Volumen, welches die für die jeweiligen Versuche und für die Weiterkultivierung der Zellen entsprechende Zellzahl enthält, abgenommen und erneut in Zellkulturflaschen bzw. Wellplatten pipettiert.

Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, deren Medium und deren initialer Passagezahl

Zelllinie	Medium	Initiale Passagezahl
HMEC-1	MCDB 131 10 % FKS 1 % GlutaMAX-1 1 µg/mL Hydrocortison 10 ng/mL Rekombinantes humanes EGF	7 und 9
THP-1	RPMI 1640 10 % FKS 1 % Natrium-pyruvat	38 und 41

5.2.2 Differenzierung von THP-1-Zellen

Für nachfolgende Versuche war es notwendig THP-1-Zellen jeweils in M1-aktivierte Makrophagen und M2-aktivierte Makrophagen zu differenzieren.

Da es sich bei THP-1-Zellen um Monozyten handelt, wurden diese zunächst mit Hilfe von PMA in adhärenz nicht-aktivierte Makrophagen (M0-Makrophagen) differenziert. Dazu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 48 h mit 100 ng/ml PMA in dem entsprechenden Medium inkubiert (Chanput et al. 2014). Anschließend wurde das PMA-haltige Medium entfernt, die adhärenz Zellen zwei Mal mit 5 ml Medium gewaschen und für weitere 24 h in reinem Medium inkubiert (Chanput et al. 2013). Die dadurch gereiften M0-Makrophagen wurden nun weiter in M1- und M2-Makrophagen differenziert.

Um den M1-Status zu erreichen, wurden die M0-Makrophagen über 24 h mit 20 ng/ml LPS und 20 ng/ml IFN- γ in hitze-inaktiviertem Medium inkubiert (Qin 2012). Die Differenzierung in M2-Makrophagen erfolgte durch eine Inkubation der M0-Makrophagen mit 20 ng/ml IL-4 und 20 ng/ml IL-13 ebenfalls über einen Zeitraum von 24 h in hitze-inaktiviertem Medium (Genin et al. 2015).

Bevor die differenzierten M1- und M2-Makrophagen jeweils für Versuche verwendet wurden, erfolgte eine 72-stündige Inkubation dieser Zellen in reinem Medium.

5.2.3 Nachweis der Zelldifferenzierung mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können bestimmte Antigene auf der Oberfläche von Zellen nachgewiesen werden. Dafür müssen diese Antigene mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gekoppelt werden. Einzelne Zellen werden im Durchflusszytometer mit einem Laser bestrahlt. Im Falle einer Expression des Antigens auf der Oberfläche der Zellen und der spezifischen Bindung des Antikörpers an das Antigen wird die durch den Laser angeregte Fluoreszenz des gebundenen Antikörpers gemessen.

Um eine Differenzierung der M0-Makrophagen in M1-Makrophagen bzw. M2-Makrophagen zu bestätigen, wurde bei M1-Makrophagen die Expression des M1-typischen Oberflächenantigens CD 86 und bei M2-Makrophagen die Expression der M2-typischen Oberflächenantigene CD 163 und CD 206 mittels Durchflusszytometrie untersucht (Stoger et al. 2012, Genin et al. 2015).

Pro Ansatz wurden hierfür 1×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden zunächst einmal mit 500 μ l FACS-Puffer gewaschen und für 5 min bei 150 rcf zentrifugiert. Anschließend wurden diese für 30 min mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern und der IgG1-Isotypenkontrolle im Dunkeln auf Eis in 500 μ l FACS-Puffer inkubiert. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift mit 500 μ l FACS-Puffer an (zentrifugiert bei 150 rcf für 5 min), um ungebundene Antikörper aus den jeweiligen Proben zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 1000 μ l FACS-Puffer resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen zur Messung am „FACSCalibur“-Gerät überführt. Für die Isotypkontrolle wurde ein PE-gekoppelter muriner IgG1-Antikörper verwendet. Der Nachweis von CD 86, CD 163 und CD 206 erfolgte mit spezifischen Antikörpern, welche ebenfalls mit PE gekoppelt waren. Parallel dazu wurde eine ungefärbte Probe mitgeführt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu bestimmen. Die mittels Durchflusszytometrie erhaltenen Daten wurden anschließend mit Hilfe der „CellQuest Pro™“-Software dargestellt und ausgewertet. Es wurde hierbei das geometrische Mittel der mittleren Fluoreszenzintensitäten von jeweils 1×10^6 Zellen ermittelt.

Der durchflusszytometrische Nachweis einer erfolgreichen Differenzierung von M0-Makrophagen in M1- und M2-Makrophagen erfolgte schließlich vor jeder Hyperthermiebehandlung.

5.2.4 Erstellen einer Wachstumskurve für HMEC-1- und THP-1-Zellen

Um für nachfolgende Hyperthermieversuche die optimale Zellzahl festzustellen, wurden Wachstumskurven für die jeweiligen Zellen erstellt. Zuerst wurde eine Stammlösung hergestellt, die $1,5 \times 10^6$ der jeweiligen Zellen auf 10 ml Medium enthält. Aus dieser Stammlösung wurden Ansätze für unterschiedliche Zellzahlen hergestellt. Aus diesen Ansätzen wurden Zellzahlen von 500 bis 12000 Zellen in 100 μ l des entsprechenden Mediums in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Pro Zellzahl wurde eine 6-fach-Bestimmung durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurde jeweils eine Mikrotiterplatte aus dem Inkubator entnommen und die darin enthaltenen Zellen mit Hilfe des MTS-Tests auf ihre Vitalität untersucht. Eine Leerwertmessung erfolgte mit dem entsprechenden Medium. Die Durchführung der Vitalitätsuntersuchung an Zellen mittels MTS-Test wird in Abschnitt 5.2.6 dargestellt.

5.2.5 Durchführung der Brutschrankhyperthermie mit HMEC-1- und THP-1-Zellen

Für die Brutschrankhyperthermie wurden sowohl HMEC-1- als auch THP-1-Zellen verwendet. HMEC-1-Zellen wurden mit einer Anzahl von 1000 Zellen pro 100 µl in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. THP-1-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 8000 Zellen pro 100 µl in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Es wurde je verwendeter Zellzahl eine 18-fach-Bestimmung durchgeführt. Die 96-Well-Mikrotiterplatten wurden für 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, bevor sie einer Hyperthermiebehandlung ausgesetzt wurden. Um sicherzustellen, dass die gewünschte Temperatur im Well vorlag, wurden zusätzlich 18 Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl Medium pipettiert. Diese sogenannte „Dummy“-Platte diente der Temperaturkontrolle.

Die Durchführung der Hyperthermie der Zellen erfolgte in einem Inkubator, welcher zuvor auf 50 °C aufgeheizt wurde. Beim Einbringen der Mikrotiterplatten in den Inkubator wurde eine Temperatursonde in einem Well der „Dummy“-Platte befestigt, sodass während des gesamten Behandlungszeitraumes die Temperatur im Well mit Hilfe des „Fotemp 6 OPTOcon“-Gerätes kontrolliert und durch die dazugehörige „FoTempMKT“-Software aufgezeichnet wurde (Abbildung 1). Weiterhin wurde bei jeder Hyperthermiebehandlung die Zeitdauer der Erwärmung über 43 °C (CEM43) anhand Formel 1 berechnet und repräsentativ im Ergebnisteil angegeben (Sapareto und Dewey 1984).

$$CEM43 = \sum_{i=1}^n t_i \cdot R^{(43-T_i)} \quad (1)$$

t_i = Zeitintervall, T_i = Durchschnittstemperatur während t_i ,
 R = Konstante ($R = 0,5$ wenn $T_i > 43$ °C, $R = 0,25$ wenn $T_i < 43$ °C)

Die Zieltemperaturen von 39 °C, 41 °C und 43 °C in den Wells wurden zum einen durch Öffnen der Tür des Brutschranks und zum anderen durch Senken der Inkubator Temperatur von anfangs 50 °C auf die gewünschte Zieltemperatur erreicht. Die Zieltemperaturen wurden somit über einen Zeitraum von 60 min konstant gehalten. Während dieses Zeitraums lag der CO₂-Gehalt im Inkubator bei 5 % und die Luftfeuchtigkeit bei 95 %. Nach Beendigung der Hyperthermiebehandlung wurden die HMEC-1- bzw. THP-1-Zellen für einen

Zeitraum von 24 h bis 72 h in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, wohingegen die jeweilige „Dummy“-Platte verworfen wurde. Bei jedem Hyperthermieversuch wurden Zellen, die bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit belassen wurden und somit keiner hyperthermen Behandlung ausgesetzt waren, als Referenz mitgeführt. 24 h, 48 h und 72 h nach der Hyperthermiebehandlung wurde die Vitalität der behandelten und unbehandelten HMEC-1- bzw. THP-1-Zellen mittels MTS-Test (siehe Abschnitt 5.2.6) bestimmt. Hierbei wurden die gemessenen Absorptionswerte in Prozent dargestellt, wobei eine Zellvitalität von 100 % den jeweils bei 37 °C belassenen Zellen zugeordnet wurde. Alle anderen gemessenen Absorptionswerte der therapierten Zellen wurden auf die Werte der jeweiligen Referenzzellen normiert.

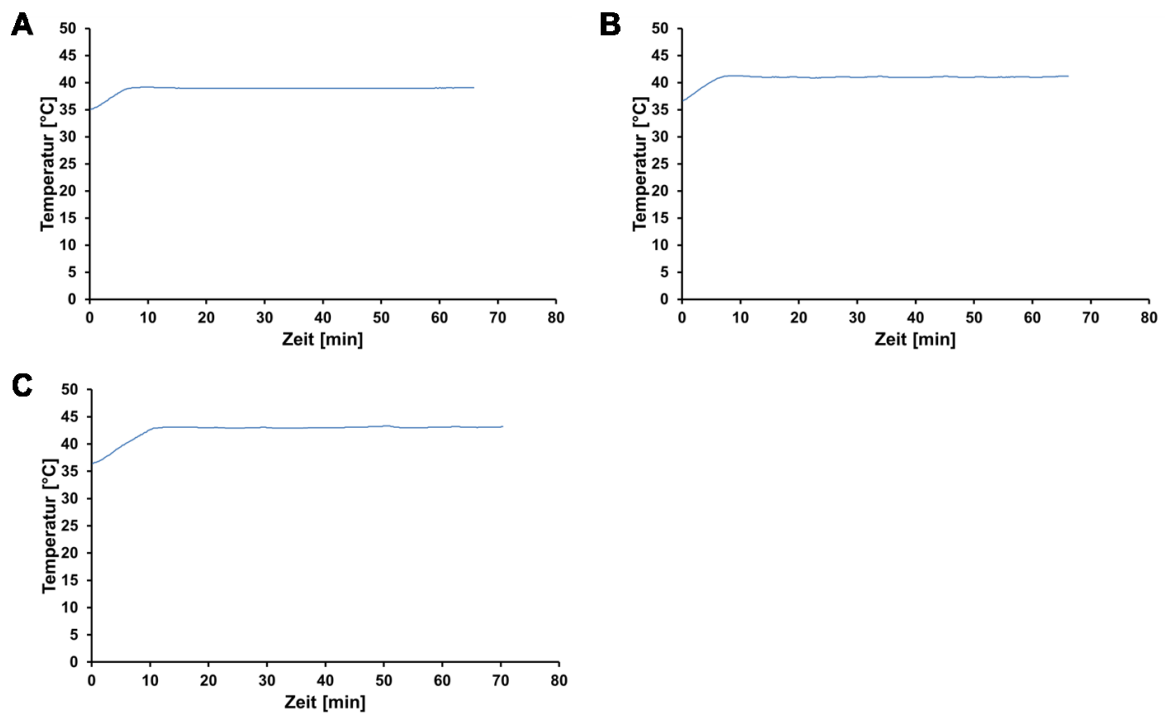


Abbildung 1: Repräsentative Darstellung der Temperaturverläufe während der Brutschrankhyperthermie. Die Temperatursonde wurde in ein mit 100 µl Medium befülltes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte eingebracht. **A:** Temperaturverlauf bei einer milden Hyperthermie von 39 °C. **B:** Temperaturverlauf bei einer milden Hyperthermie von 41 °C. **C:** Temperaturverlauf bei einer Hyperthermie von 43 °C.

5.2.6 Vitalitätsuntersuchung der HMEC-1- und THP-1-Zellen mittels MTS-Test

Um die Vitalität von Zellen festzustellen, kann der MTS-Test verwendet werden. Lebende Zellen sind in der Lage durch ihre mitochondrialen Dehydrogenasen die

chemische Substanz 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazol (MTS) in Formazanprodukte umzuwandeln, deren Absorption anschließend durch einen Mikroplattenreader bei 492 nm erfasst werden kann (Chen et al. 2013).

Mit Hilfe des MTS-Tests wurde der Anteil vitaler HMEC-1- und THP-1-Zellen sowohl für die Wachstumskurven als auch nach der Brutschrankhyperthermie ermittelt. Hierbei wurden jeweils 20 µl „CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay“ zu den Zellen in die Wells der 96-Well-Mikrotiterplatten gegeben. Während der Inkubation mit „CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay“ wurden die Zellen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Nach maximal 4 h wurde die Absorption bei 492 nm als Maß für die Zellvitalität mit Hilfe des „TECAN Sunrise Plattenreaders“ ermittelt. Die gemessenen Absorptionswerte sollten nicht größer als 1 sein. Durch wiederholtes Messen der Absorptionswerte während der Inkubationszeit wurde kontrolliert, ob innerhalb der 4 h bereits ein Absorptionswert von 1 erreicht wurde. Wenn dies der Fall war, wurde die Messung der Absorptionswerte zu diesem Zeitpunkt beendet.

5.2.7 Ermittlung der Langzeitvitalität der HMEC-1-Zellen durch Colony Forming Assays

Es wurde die Langzeitvitalität von HMEC-1-Zellen, die zuvor einer milden Brutschrankhyperthermie bei jeweils 39 °C und 41 °C über einen Zeitraum von 60 min ausgesetzt waren, untersucht. Als Referenzzellen dienten HMEC-1-Zellen, welche bei 37 °C belassen wurden. Für die Bestimmung der Langzeitvitalität wurde jeweils eine Zellzahl von 650 HMEC-1-Zellen in 2 ml Medium in die Wells einer 6-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Zellen wurden anschließend für 14 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 70 %igem Ethanol fixiert. Es schloss sich eine Färbung mit der Coomassie Brillant Blau-Färbelösung, deren Zusammensetzung in Tabelle 9 dargestellt ist, an, worauf zwei Waschgänge mit jeweils A. dest und 70 %igem Ethanol folgten. Nach erneutem Waschen mit A. dest trockneten die Platten für 24 h bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die makroskopische Auszählung der innerhalb der 14 Tage gewachsenen HMEC-1-Zellkolonien. Dabei wurden nur HMEC-1-Zellansammlungen, welche einen Durchmesser von einem Millimeter und größer aufwiesen, als Kolonie gewertet.

Tabelle 9: Darstellung der Zusammensetzung der Coomassie Brillant Blau-Färbelösung

Färbelösung	Zusammensetzung
Coomassie Brillant Blau	26,5 ml A. dest 3,5 ml Essigsäure \geq 99,7 % 20 ml Ethanol 96 % (vol.), vergällt 0,125 g Coomassie® Brillant Blau G250

5.2.8 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism 6“ durchgeführt. Verwendet wurde der ungepaarte t-Test mit der Korrektur nach Welch. Die in den Abbildungen dieser Arbeit genutzte Kodierung der p-Werte ist in Tabelle 10 ersichtlich. Alle p-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angenommen.

Tabelle 10: Darstellung der Kodierung der p-Werte

p-Wert	Kodierung
< 0,05	*
< 0,01	**
< 0,001	***

6 Ergebnisse

6.1 HMEC-1-Zell-Wachstumskurve

Zur Bestimmung der optimalen Zellzahl von HMEC-1-Zellen für nachfolgende Versuche, wurde das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der Zellzahl über einen Zeitraum von 96 h untersucht.

In Abbildung 2 ist ersichtlich, dass mit zunehmender Zellzahl die gemessene Absorption und damit der Anteil vitaler Zellen über die untersuchten Beobachtungszeiträume von 24 h bis 96 h anstieg. Während bei der Inkubation über 24 h und 48 h die Absorption bis zur maximal eingesetzten Zellzahl stetig anstieg, war bei der Inkubation der HMEC-1-Zellen über 72 h und 96 h eine Stagnation und ein anschließender Abfall der Absorptionswerte zu erkennen. Die Messung nach 96 h zeigte hierbei eine Stagnation mit darauf folgendem Abfall der Absorptionswerte in einem Bereich von 4000 bis 6000 Zellen, wobei ein verringerter Anstieg des Wachstums bereits ab einer Zellzahl von 2000 Zellen festzustellen war.

Da für nachfolgende Versuche HMEC-1-Zellen in Zellzahlen, bei denen auch nach einer Inkubationszeit von 96 h das Wachstum nicht stagniert, benötigt werden, wurde für anschließende Experimente eine HMEC-1-Zellzahl von 1000 Zellen ausgewählt. Bei dieser Zellzahl befanden sich alle gemessenen Absorptionswerte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 96 h in einer Phase des kontinuierlichen Anstiegs, weswegen eine Verfälschung der Ergebnisse nachfolgender Versuche durch ein vermindertes Zellwachstum ausgeschlossen werden konnte.

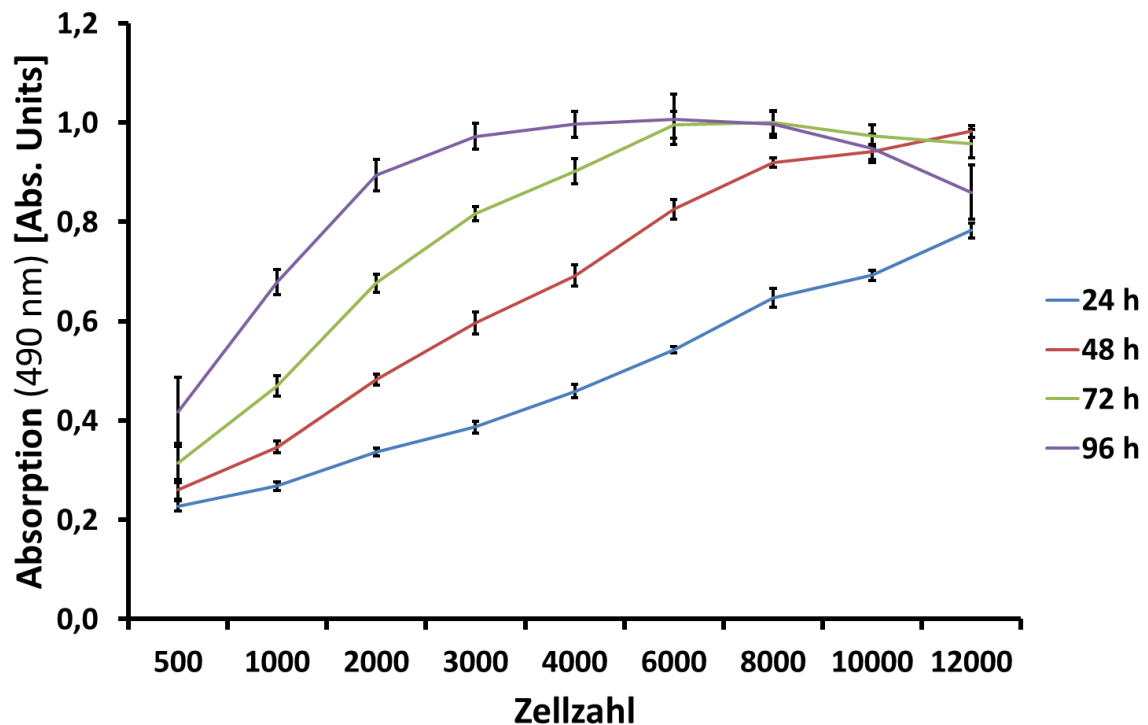


Abbildung 2: Repräsentative Darstellung der Wachstumskurve von HMEC-1-Zellen. HMEC-1-Zellen wurden mit steigenden Zellzahlen in 96-Well-Mikrotiterplatten als 6-fach-Bestimmung ausgesät und über einen Zeitraum von jeweils 24 h, 48 h, 72 h und 96 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTS-Test bestimmt. Dargestellt sind die entsprechenden Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen eines durchgeführten Experimentes (n=1).

6.2 HMEC-1-Zellen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität auf

In Abbildung 3 ist der Einfluss einer 60-minütigen Hyperthermiebehandlung bei jeweils 39 °C, 41 °C und 43 °C auf die Vitalität von HMEC-1-Zellen über einen Zeitraum bis zu 72 h nach der Behandlung dargestellt. Besonders die mit einer milden Hyperthermie von 41 °C (CEM43 = 4,21) behandelten Zellen zeigten eine gesteigerte Vitalität mit zunehmenden Beobachtungszeitraum nach der Behandlung auf. Hierbei erhöhte sich die Vitalität der Zellen 48 h nach der Hyperthermiebehandlung um 33 % verglichen mit den bei 37 °C belassenen Zellen. 72 h nach der Hyperthermiebehandlung war eine 75 %ige Erhöhung der Vitalität im Vergleich zu den Referenzzellen zu erkennen. Im Gegensatz zum Einfluss einer Temperatur von 41 °C auf die Vitalität der HMEC-1-Zellen, war bei einer milden Hyperthermie von 39 °C (CEM43 = 0,25) eine weitaus geringere Wirkung auf die Zellen zu erkennen. Während über einen Zeitraum bis zu 48 h nach der Hyperthermiebehandlung bei 39 °C keine Veränderung der Vitalität

erkennbar war, steigerte sich diese 72 h nach der Behandlung verglichen mit den Referenzzellen um 14 %. Entgegen der Erwartung, dass eine Hyperthermie bei 43 °C die Zellvitalität vermindert, steigerte diese Temperatur (CEM43 = 55,71) ab einem Beobachtungszeitraum von 48 h nach der Behandlung die Vitalität der HMEC-1-Zellen. Hierbei ist das Augenmerk besonders auf die unerwartete 52 %ige Vitalitätserhöhung dieser Zellen 72 h nach Hyperthermie im Vergleich zur 37 °C-Referenz zu richten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl eine milde Hyperthermie von 41 °C als auch unerwarteter Weise höhere Temperaturen von 43 °C die Vitalität der HMEC-1-Zellen 72 h nach der Behandlung erhöhen.

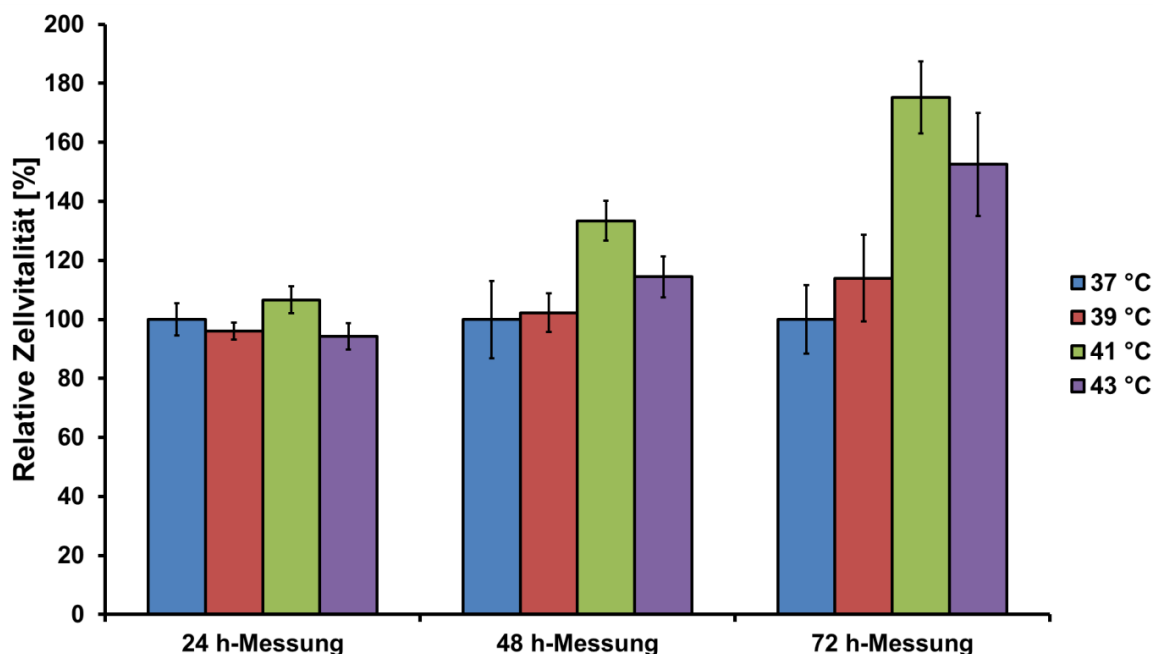


Abbildung 3: Repräsentative Darstellung des Effektes einer Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von HMEC-1-Zellen über einen Nachbeobachtungszeitraum von 72 h. Es wurden jeweils 1000 HMEC-1-Zellen in 100 µl Medium als 18-fach Bestimmung bei 39 °C, 41 °C und 43 °C für 60 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellvitalitäten 24 h, 48 h und 72 h nach der Hyperthermiebehandlung mittels MTS-Test untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen eines durchgeführten Experimentes (n = 1). Die Werte wurden auf unbehandelte HMEC-1-Zellen normiert.

6.3 HMEC-1-Zellen zeigen 14 Tage nach Anwendung einer milden Hyperthermie eine verringerte Vitalität

Der Einfluss einer 60-minütigen milden Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von HMEC-1-Zellen 14 Tage nach der Behandlung ist in Abbildung 4 dargestellt.

Es ist erkennbar, dass die Fähigkeit der Zellen Kolonien zu bilden 14 Tage nach der Behandlung mit Temperaturen von 39 °C sowie 41 °C verringert war. Im Vergleich zu den bei 37 °C belassenen Zellen, die zum untersuchten Zeitpunkt 35 Kolonien aufwiesen, zeigten Zellen, die bei 39 °C inkubiert wurden (CEM43 = 0,27) 27 Kolonien ($p < 0,001$). Eine vergleichbar verminderte Koloniebildung gegenüber den Referenzzellen konnte bei HMEC-1-Zellen, die mit 41 °C behandelt wurden (CEM43 = 3,79), festgestellt werden. Hierbei konnten 14 Tage nach der Hyperthermiebehandlung 29 Kolonien gezählt werden ($p < 0,01$).

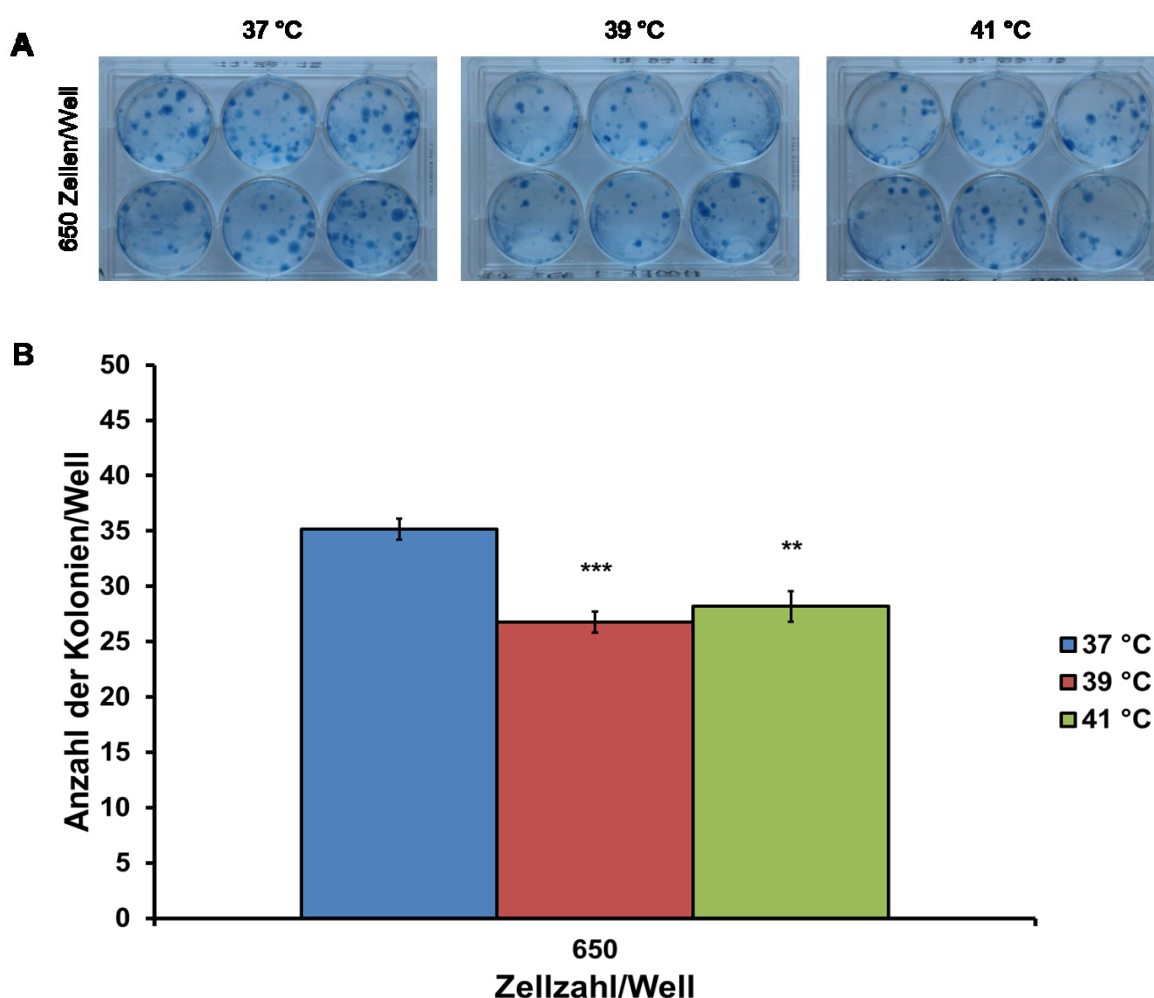


Abbildung 4: Effekt einer milden Brutschrankhyperthermie auf die Langzeitvitalität von HMEC-1-Zellen. Die HMEC-1-Zellen wurden für 60 min bei 39 °C und 41 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend jeweils mit der dargestellten Zellzahl in 6-Well-Platten ausgesät. 14 Tage nach der Hyperthermiebehandlung wurden die von den HMEC-1-Zellen gebildeten Kolonien makroskopisch ausgezählt. **A:** Repräsentative Darstellung der Colony Forming Assays. Die Kolonien der HMEC-1-Zellen wurden fixiert und mit der Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung gefärbt ($n = 3$). **B:** Darstellung der quantitativen Auswertung der gezählten Kolonien. Ersichtlich sind die gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ($n = 3$). Es werden die relevanten Signifikanzen angegeben (Signifikanz bezogen auf bei 37 °C belassene Zellen: ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

6.4 THP-1-Zell-Wachstumskurve

Um eine geeignete Zellzahl für nachfolgende Versuche mit THP-1-Zellen zu ermitteln, wurde das Wachstumsverhalten der THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl über einen Zeitraum von 96 h Stunden untersucht, was in Abbildung 5 dargestellt ist. Es ist erkennbar, dass die gemessenen Absorptionswerte mit zunehmender Zellzahl über den Zeitraum von 96 h anstiegen. Bei der Inkubation über 24 h, 48 h und 72 h war ein dauerhafter Anstieg der Absorption bis zur der höchsten verwendeten Zellzahl ersichtlich, wohingegen bei der 96 h-Inkubation im Bereich einer Zellzahl von 10000 bis 12000 Zellen eine Stagnation bzw. ein Abfall der Absorptionswerte zu erkennen war. Bei den darunter liegenden Zellzahlen der 96 h-Inkubation ist ein stetiger Anstieg der Absorption festzustellen.

Für nachfolgende Experimente werden THP-1-Zellen in Zellzahlen, bei denen auch nach einer Inkubationszeit von 96 h das Wachstum nicht stagniert, benötigt. Deswegen wurde für anschließende THP-1-Zell-Versuche eine Zellzahl von 8000 Zellen ausgewählt. Bei dieser Anzahl von Zellen befanden sich alle Absorptionswerte über einen Zeitraum von 96 h in einer Phase des kontinuierlichen Anstiegs, wodurch eine Verfälschung der Ergebnisse nachfolgender Versuche durch ein vermindertes Zellwachstum ausgeschlossen werden konnte.

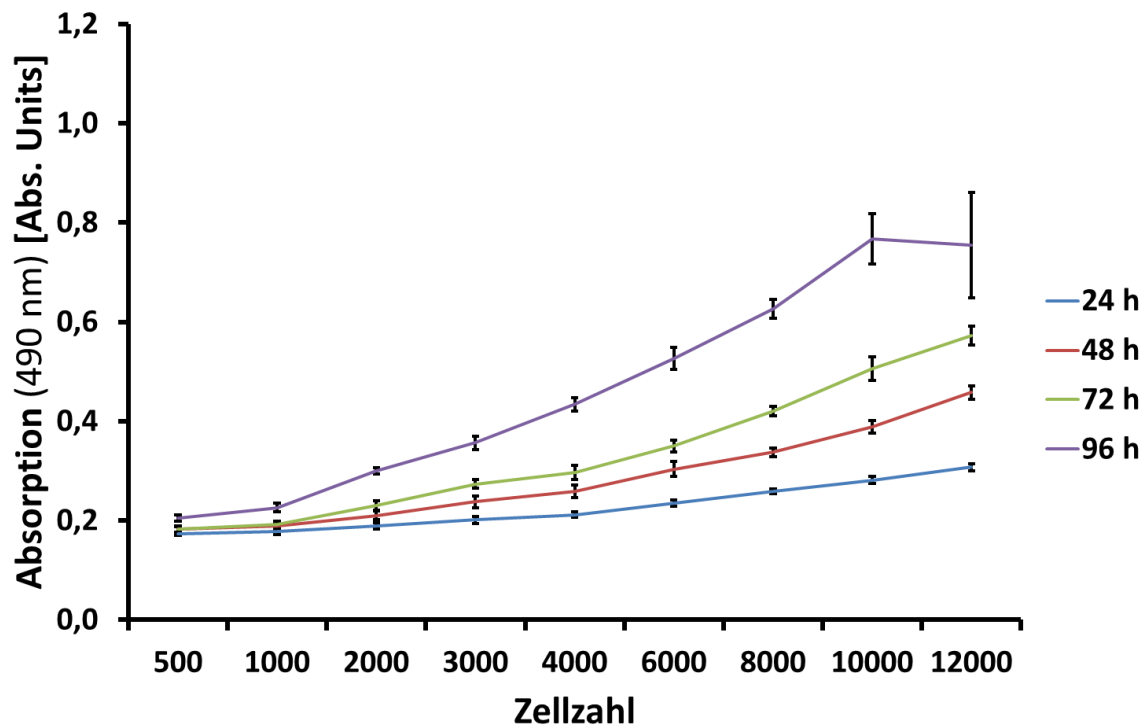


Abbildung 5: Repräsentative Darstellung der Wachstumskurve von THP-1-Zellen. THP-1-Zellen wurden mit steigenden Zellzahlen in 96-Well-Mikrotiterplatten als 6-fach-Bestimmung ausgesät und über einen Zeitraum von jeweils 24 h, 48 h, 72 h und 96 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTS-Test bestimmt. Dargestellt sind die entsprechenden Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen eines durchgeführten Experimentes (n=1).

6.5 Undifferenzierte THP-1-Zellen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität auf

In Abbildung 6 ist der Einfluss einer 60-minütigen Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität undifferenzierter THP-1-Zellen über einen Zeitraum bis zu 72 h nach der Hyperthermiebehandlung dargestellt. Die THP-1-Zellen, die bei 41 °C behandelt wurden (CEM43 = 3,93), zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum nach der Hyperthermiebehandlung eine stetige Erhöhung der Vitalität auf. Hierbei stieg die Vitalität der THP-1-Zellen 72 h nach der Behandlung um 24 % im Vergleich zu den Zellen, welche bei 37 °C belassen wurden ($p < 0,01$). Weiterhin wird deutlich, dass Zellen, die einer Temperatur von 39 °C ausgesetzt waren (CEM43 = 0,25), ebenfalls eine signifikant gesteigerte Vitalität 24 h und 72 h nach der Behandlung aufwiesen. Im Vergleich zu den Referenzzellen erhöhte sich die Vitalität dabei um 11 % 24 h ($p < 0,001$) und um 16 % 72 h nach der Hyperthermiebehandlung ($p < 0,01$). Eine Ausnahme bildet hierbei der Untersuchungszeitpunkt von 48 h nach der Behandlung, bei dem keine signifikante Änderung der Vitalität der THP-1-

Zellen im Vergleich zur 37 °C-Referenz erkennbar war. Wie zu erwarten, zeigten THP-1-Zellen, die mit 43 °C behandelt wurden (CEM43 = 62,4), 24 h und 72 h nach der Hyperthermiebehandlung eine verringerte Vitalität, wohingegen in der 48 h-Messung ein Vitalitätsverhalten, was sich nicht von den Referenzzellen unterschied, festzustellen war.

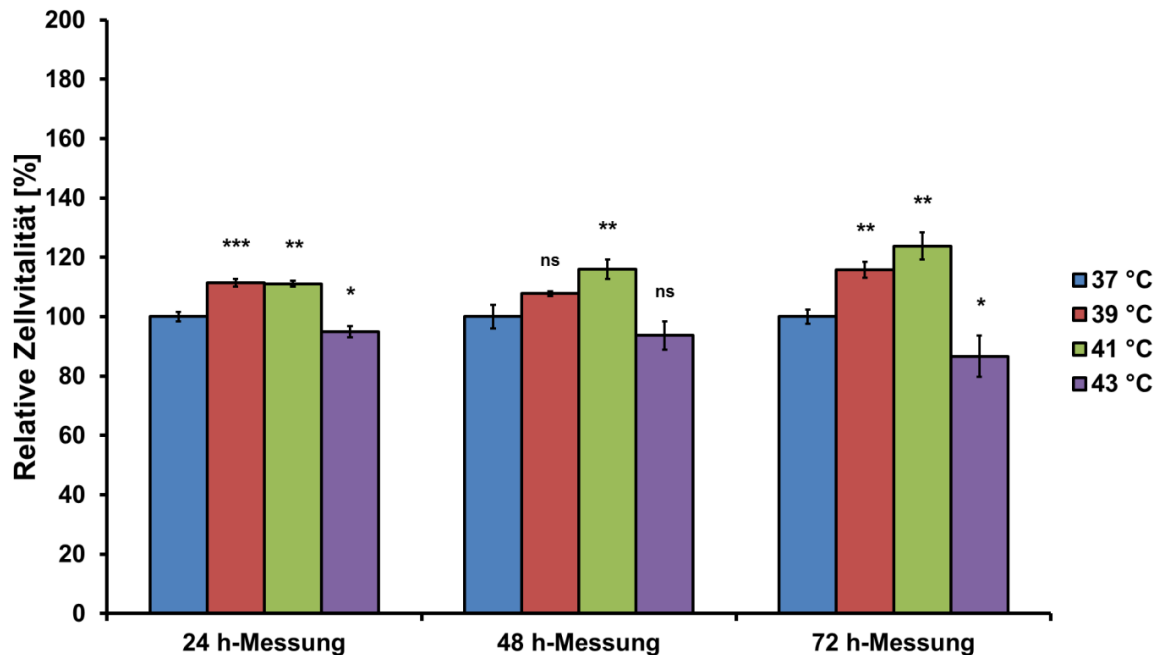


Abbildung 6: Effekt einer Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von undifferenzierten THP-1-Zellen über einen Nachbeobachtungszeitraum von 72 h. Es wurden jeweils 8000 THP-1-Zellen in 100 µl Medium als 18-fach Bestimmung bei 39 °C, 41 °C und 43 °C für 60 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellvitalitäten 24 h, 48 h und 72 h nach der Hyperthermiebehandlung mittels MTS-Test untersucht. Dargestellt sind die gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n = 3). Die Werte wurden auf unbehandelte THP-1-Zellen normiert. Es werden die relevanten Signifikanzen angegeben (Signifikanz bezogen auf bei 37 °C belassene Zellen: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; ns = nicht signifikant).

6.6 Differenzierung von THP-1-Zellen in M1- und M2-Makrophagen

Für nachfolgende Hyperthermieexperimente war es notwendig die THP-1-Zellen zunächst in M0-Makrophagen und weiter in M1-aktivierte- sowie M2-aktivierte-Makrophagen zu differenzieren. Um eine gelungene Differenzierung in sowohl M1- als auch M2-Makrophagen sicherzustellen, erfolgte ein Nachweis zelltypspezifischer Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie. Für eine erfolgreiche Differenzierung in M1-Makrophagen diente hierbei der Nachweis des

Oberflächenmarkers CD 86, wohingegen für M2-Makrophagen die beiden Oberflächenmarker CD 163 und CD 206 als Nachweis verwendet wurden.

Abbildung 7 veranschaulicht die Expression von CD 86 auf der Oberfläche von M0-Makrophagen und M1-Makrophagen. Auf M0-Makrophagen konnte eine CD 86-Grundexpression festgestellt werden. Das CD 86-Fluoreszenzsignal liegt hierbei höher, als das der unmarkierten Zellen und der Isotypkontrolle. M1-Makrophagen wiesen in den Messungen ein deutlich höheres CD 86-Fluoreszenzsignal als M0-Makrophagen auf, was schließlich eine erfolgreiche M1-Differenzierung bestätigte.

Die Untersuchung der Oberflächenmarker CD 163 und CD 206 auf M0- und M2-Makrophagen ist in Abbildung 8 dargestellt. Auf M0-Makrophagen konnte keine Expression der beiden Marker nachgewiesen werden. Die Höhe des Fluoreszenzsignals dieser Marker unterschied sich nicht von dem der unmarkierten Zellen und der Isotypkontrolle. M2-Makrophagen wiesen dagegen ein typisches Fluoreszenzsignal für die CD 163- und CD 206-Oberflächenexpression auf, welches somit eine gelungene Differenzierung bestätigt. Das Fluoreszenzsignal von CD 163 und CD 206 lag hierbei höher als das der unmarkierten Zellen und der Isotypkontrolle.

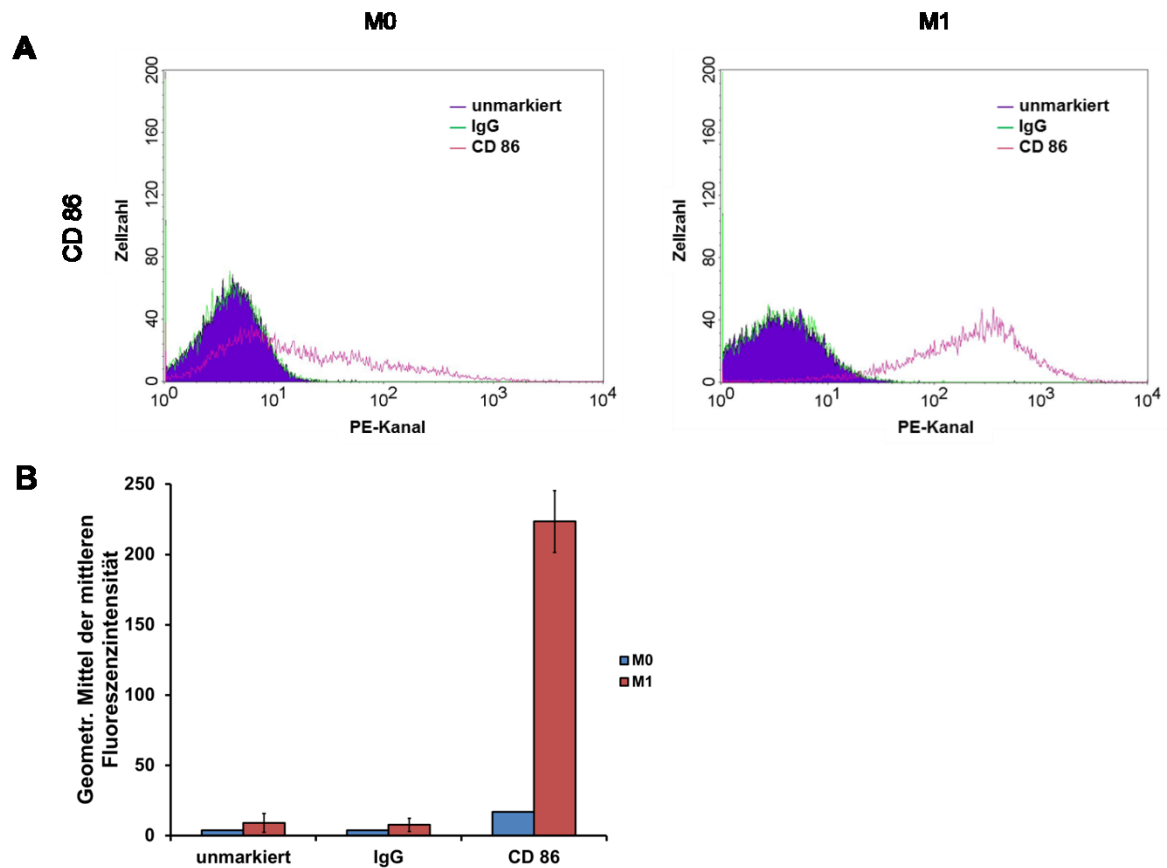


Abbildung 7: Analyse der Oberflächenexpression von CD 86 auf M0- und M1-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie. Eine Differenzierung in M0-Makrophagen erfolgte durch eine zweitägige Inkubation von THP-1-Zellen mit 100 ng/ml PMA und anschließender Inkubation in reinem Medium für 24 h. Eine weitere Differenzierung von M0- in M1-Makrophagen erfolgte durch eine Inkubation mit 20 ng/ml LPS und 20 ng/ml IFN- γ über 24 h. Pro Ansatz wurden 1×10^6 Zellen in 1000 μ l FACS-Puffer verwendet, die entweder unmarkiert blieben oder mit einem PE-gekoppelten Anti-CD 86 Antikörper bzw. der entsprechenden IgG-Isotypkontrolle inkubiert wurden. **A:** Repräsentative Darstellung des CD 86-Markers auf der Zelloberfläche anhand der MFI. **B:** Quantitative Auswertung der Oberflächenexpression des Markers eines durchgeführten Experimentes mit M0-Makrophagen ($n = 1$) bzw. drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit M1-Makrophagen ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte der geometr. Mittel der MFI und deren Standardabweichungen.

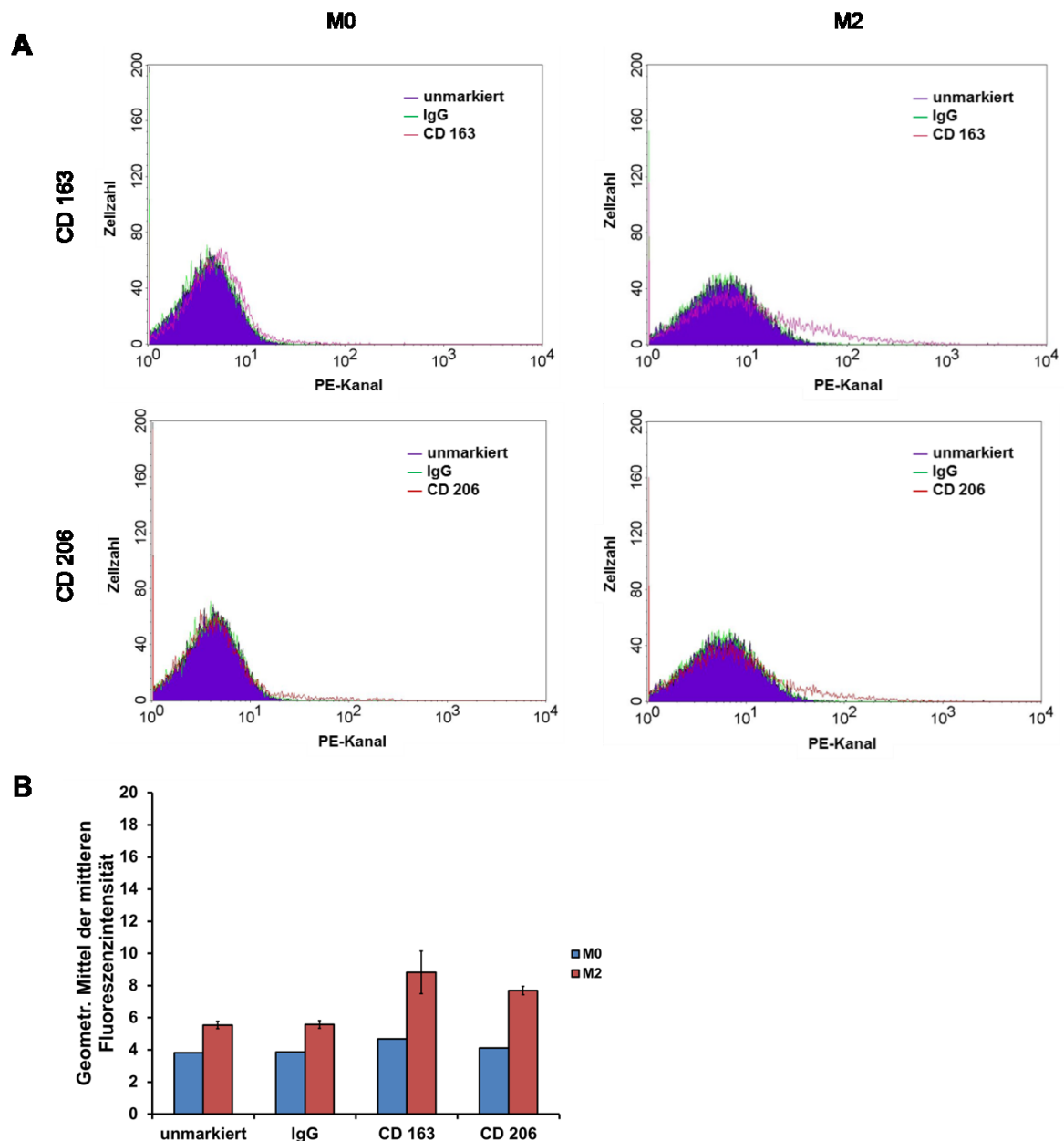


Abbildung 8: Analyse der Oberflächenexpression von CD 163 und CD 206 auf M0- und M2-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie. Eine Differenzierung in M0-Makrophagen erfolgte durch eine zweitägige Inkubation von THP-1-Zellen mit 100 ng/ml PMA und anschließender Inkubation in reinem Medium für 24 h. Eine weitere Differenzierung von M0- in M2-Makrophagen erfolgte durch eine Inkubation mit 20 ng/ml IL-4 und 20 ng/ml IL-13 über 24 h. Pro Ansatz wurden 1×10^6 Zellen in 1000 μ l FACS-Puffer verwendet, die entweder unmarkiert blieben, mit einem PE-gekoppelten Anti-CD 163 Antikörper, einem PE-gekoppelten Anti-CD 206 Antikörper oder der entsprechenden IgG-Isotypkontrolle inkubiert wurden. **A:** Repräsentative Darstellung des CD 163- und CD 206-Markers auf der Zelloberfläche anhand der MFI. **B:** Quantitative Auswertung der Oberflächenexpression der Marker eines durchgeführten Experimentes mit M0-Makrophagen ($n = 1$) bzw. drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit M2-Makrophagen ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte der geometr. Mittel der MFI und deren Standardabweichungen.

6.7 M1-Makrophagen zeigen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität

Abbildung 9 zeigt den Einfluss einer 60-minütigen milden Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von M1-Makrophagen über einen Zeitraum bis zu 72 h nach der Hyperthermiebehandlung. Eine milde Hyperthermie bei 41 °C (CEM43 = 4,07) beeinflusste die Vitalität von M1-Makrophagen lediglich 72 h nach der Behandlung. Im Vergleich zu den bei 37 °C belassenen Zellen stieg hierbei die Vitalität um 17 % an ($p < 0,05$). 24 h und 48 h nach der Hyperthermiebehandlung konnten hingegen keine Veränderungen der Zellvitalität festgestellt werden. Einen ähnlichen Einfluss auf die Vitalität der Zellen zeigte eine milde Hyperthermie von 39 °C (CEM43 = 0,24). Die M1-Makrophagen wiesen hierbei ausschließlich 48 h nach der Hyperthermiebehandlung eine signifikant erhöhte Zellvitalität um 12 % im Vergleich zu den Referenzzellen auf ($p < 0,01$). Demgegenüber änderte sich die Vitalität der Zellen im Zeitraum von 24 h und 72 h nach der Behandlung verglichen mit den Referenzzellen nicht signifikant.

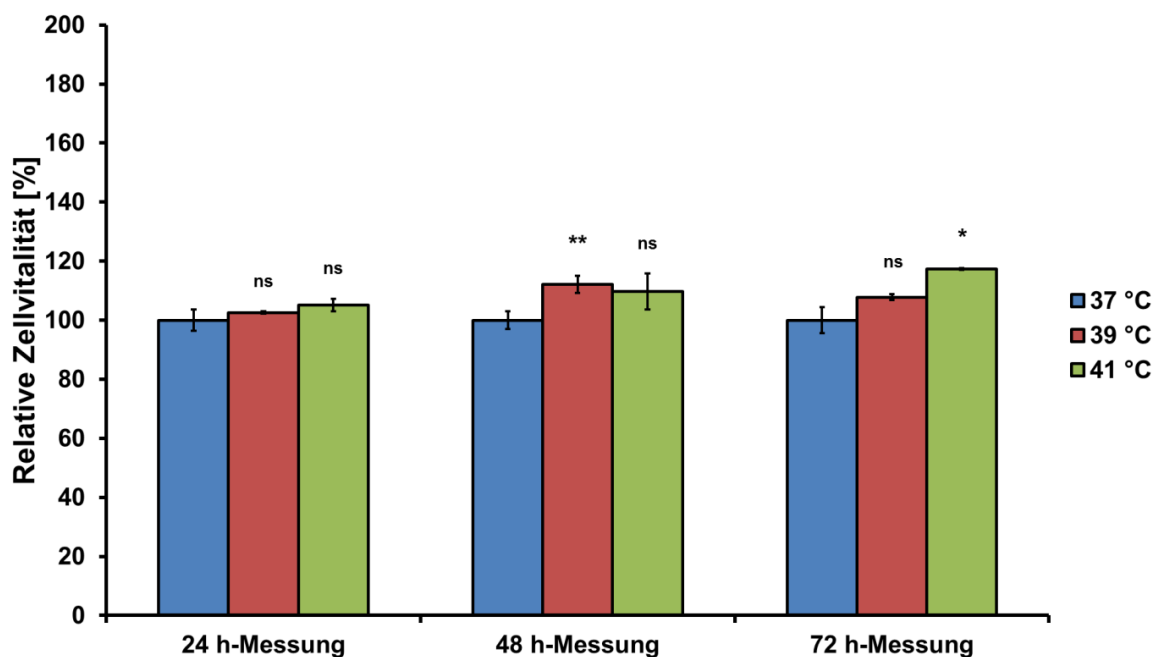


Abbildung 9: Effekt einer milden Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von M1-Makrophagen über einen Nachbeobachtungszeitraum von 72 h. Es wurden jeweils 8000 M1-Makrophagen in 100 µl Medium als 18-fach Bestimmung für 60 min bei 39 °C und 41 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellvitalitäten nach verschiedenen Beobachtungszeiträumen von 24 h, 48 h und 72 h mittels MTS-Test untersucht. Dargestellt sind die gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ($n = 3$). Die Werte wurden auf unbehandelte M1-Makrophagen normiert. Es werden die relevanten Signifikanzen angegeben (Signifikanz bezogen auf bei 37 °C belassene Zellen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ns = nicht signifikant).

6.8 M2-Makrophagen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine veränderte Vitalität auf

Nachfolgend ist in Abbildung 10 der Effekt einer 60-minütigen milden Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von M2-Makrophagen über einen Zeitraum bis zu 72 h nach Hyperthermie dargestellt. Die bei 41 °C behandelten M2-Makrophagen (CEM43 = 3,96) wiesen ausschließlich 48 h nach der Hyperthermiebehandlung eine Vitalitätserhöhung um 13 % im Vergleich zu den bei 37 °C belassenen Zellen auf ($p < 0,05$). 24 h und 72 h nach der Hyperthermiebehandlung zeigten die M2-Makrophagen hingegen keine signifikanten Vitalitätsveränderungen verglichen mit den Referenzzellen. Bei den M2-Makrophagen, die mit einer milden Hyperthermie von 39 °C behandelt wurden (CEM43 = 0,26), konnten über den gesamten Nachbeobachtungszeitraum keine signifikanten Unterschiede der Zellvitalität im Vergleich zu den Referenzzellen festgestellt werden.

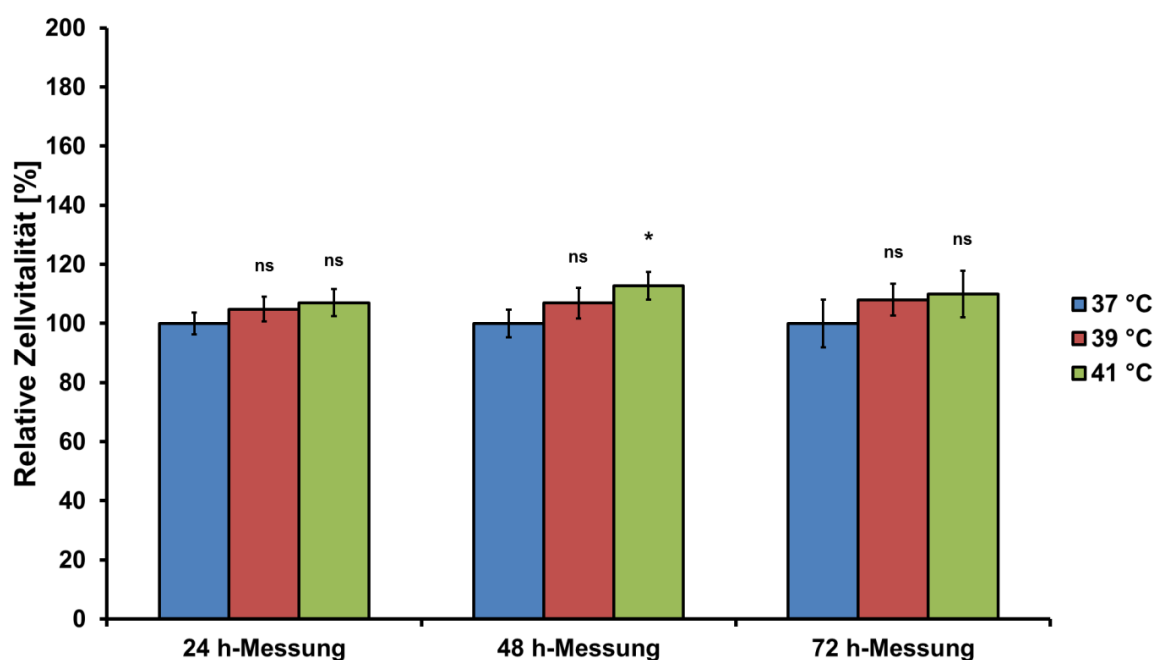


Abbildung 10: Effekt einer milden Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von M2-Makrophagen über einen Nachbeobachtungszeitraum von 72 h. Es wurden jeweils 8000 M2-Makrophagen in 100 µl Medium als 18-fach Bestimmung für 60 min bei 39 °C und 41 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellvitalitäten nach verschiedenen Beobachtungszeiträumen von 24 h, 48 h und 72 h mittels MTS-Test untersucht. Dargestellt sind die gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ($n = 3$). Die Werte wurden auf unbehandelte M2-Makrophagen normiert. Es werden die relevanten Signifikanzen angegeben (Signifikanz bezogen auf bei 37 °C belassene Zellen: * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant).

6.9 M1-Makrophagen zeigen nach Anwendung einer milden Hyperthermie eine tendenzielle Erhöhung von CD 163 und CD 206 auf der Zelloberfläche

Es wurde untersucht, ob eine milde Hyperthermie in der Lage ist, eine Umwandlung von M1- in M2-Makrophagen auszulösen. Hierfür wurden M1-Makrophagen einer 60-minütigen milden Brutschrankhyperthermie ausgesetzt. Anschließend wurde auf deren Oberfläche die Expression der M2-typischen Marker CD 163 und CD 206 in einem Zeitraum bis zu 48 h nach der Hyperthermiebehandlung mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Abbildung 11 zeigt die Expression der Oberflächenmarker CD 163 und CD 206 auf den M1-Makrophagen 24 h nach der Behandlung mit milder Hyperthermie bei 39 °C (CEM43 = 0,28) und 41 °C (CEM43 = 5,15). Die M1-Makrophagen, welche bei 41 °C behandelt wurden, wiesen verglichen mit den Zellen vor der Hyperthermiebehandlung eine höhere Autofluoreszenz auf, was an der Erhöhung des Fluoreszenzsignals unmarkierter Zellen zu erkennen war. Zudem war bei den mit 41 °C behandelten M1-Makrophagen eine tendenzielle Erhöhung der Fluoreszenzsignale von CD 163 und CD 206 im Vergleich zu den Zellen vor der Behandlung festzustellen. Auch im Falle der M1-Makrophagen, die bei 39 °C behandelt wurden, waren tendenziell gesteigerte Fluoreszenzsignale der für M2-Makrophagen typischen Oberflächenmarker zu erkennen. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Analyse der Marker CD 163 und CD 206 auf der Zelloberfläche von M1-Makrophagen 48 h nach der Behandlung mit milder Hyperthermie (Abbildung 12). Zum einen wiesen die bei 41 °C behandelten M1-Makrophagen eine erhöhte Autofluoreszenz im Vergleich zu den Zellen vor der Hyperthermiebehandlung auf. Zum anderen war ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung der Fluoreszenzsignale der genannten Marker für M2-Makrophagen verglichen mit den Zellen vor der Behandlung zu erkennen. Auch bei den M1-Makrophagen, die einer Temperatur von 39 °C ausgesetzt waren, konnte eine tendenzielle Erhöhung der Fluoreszenzsignale für die Marker CD 163 und CD 206 beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Anwendung einer milden Hyperthermie bei M1-Makrophagen über einen Zeitraum bis zu 48 h nach der Behandlung eine tendenzielle Erhöhung der Oberflächenmarker CD 163 und CD 206 bewirkt.

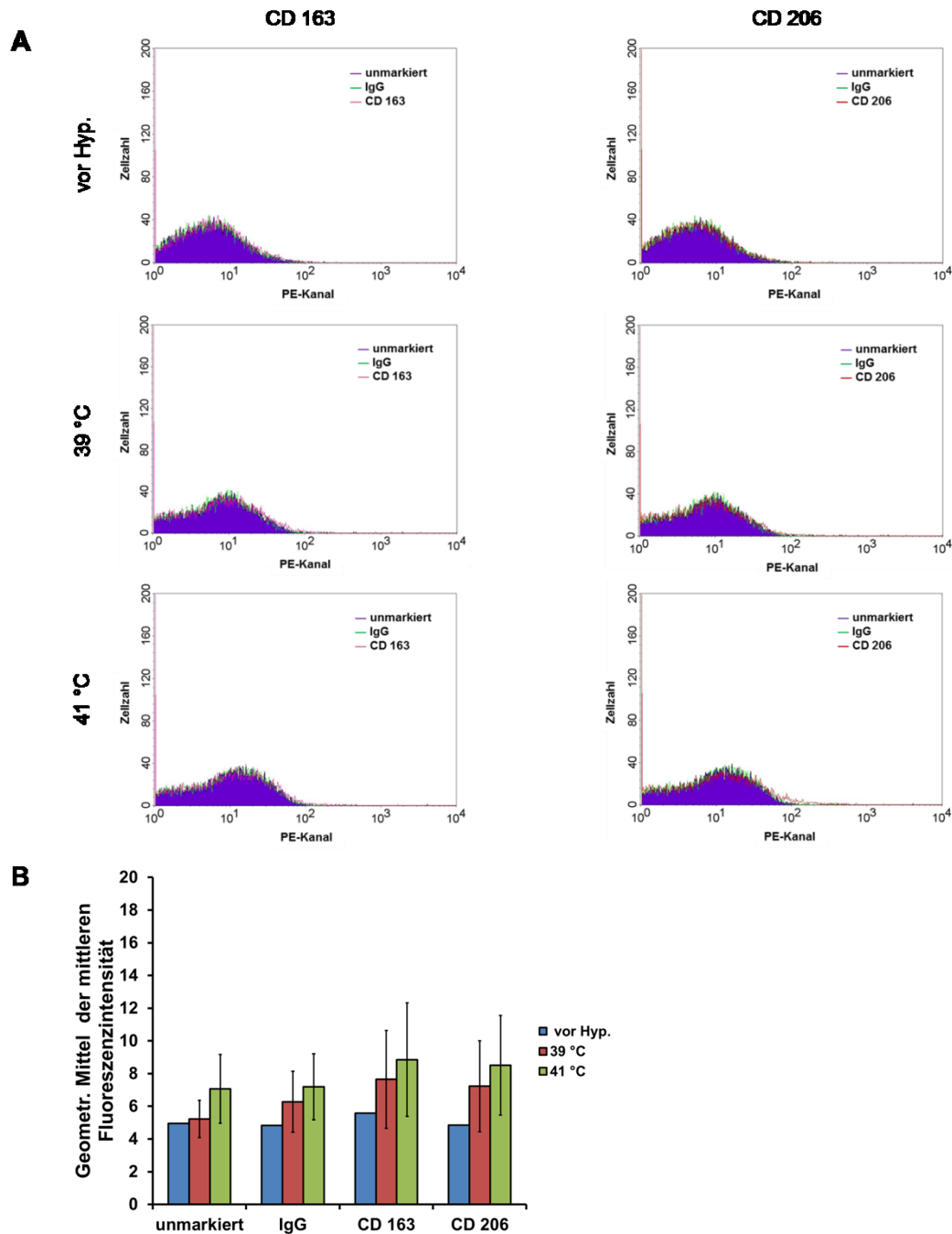


Abbildung 11: Analyse der Oberflächenexpression von CD 163 und CD 206 auf M1-Makrophagen vor und 24 h nach einer Brutschrankhyperthermie mittels Durchflusszytometrie. M1-Makrophagen wurden bei 39 °C und 41 °C für 60 min im Brutschrank inkubiert. 24 h nach der Hyperthermiebehandlung wurde die Oberflächenexpression der beiden für M2-Makrophagen typischen Marker mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei wurden für die Analyse 1×10^6 Zellen in 1000 μ l FACS-Puffer pro Ansatz verwendet, die entweder unmarkiert blieben, mit einem PE-gekoppelten Anti-CD 163 Antikörper, einem PE-gekoppelten Anti-CD 206 Antikörper oder der entsprechenden IgG-Isotypkontrolle inkubiert wurden. **A:** Repräsentative Darstellung des CD 163- und CD 206-Markers auf der Zelloberfläche anhand der MFI. **B:** Quantitative Auswertung der Oberflächenexpression der Marker eines durchgeführten Experimentes mit M1-Makrophagen vor Hyperthermie ($n = 1$) bzw. drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit M1-Makrophagen 24 h nach Hyperthermie ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte der geometr. Mittel der MFI und deren Standardabweichungen.

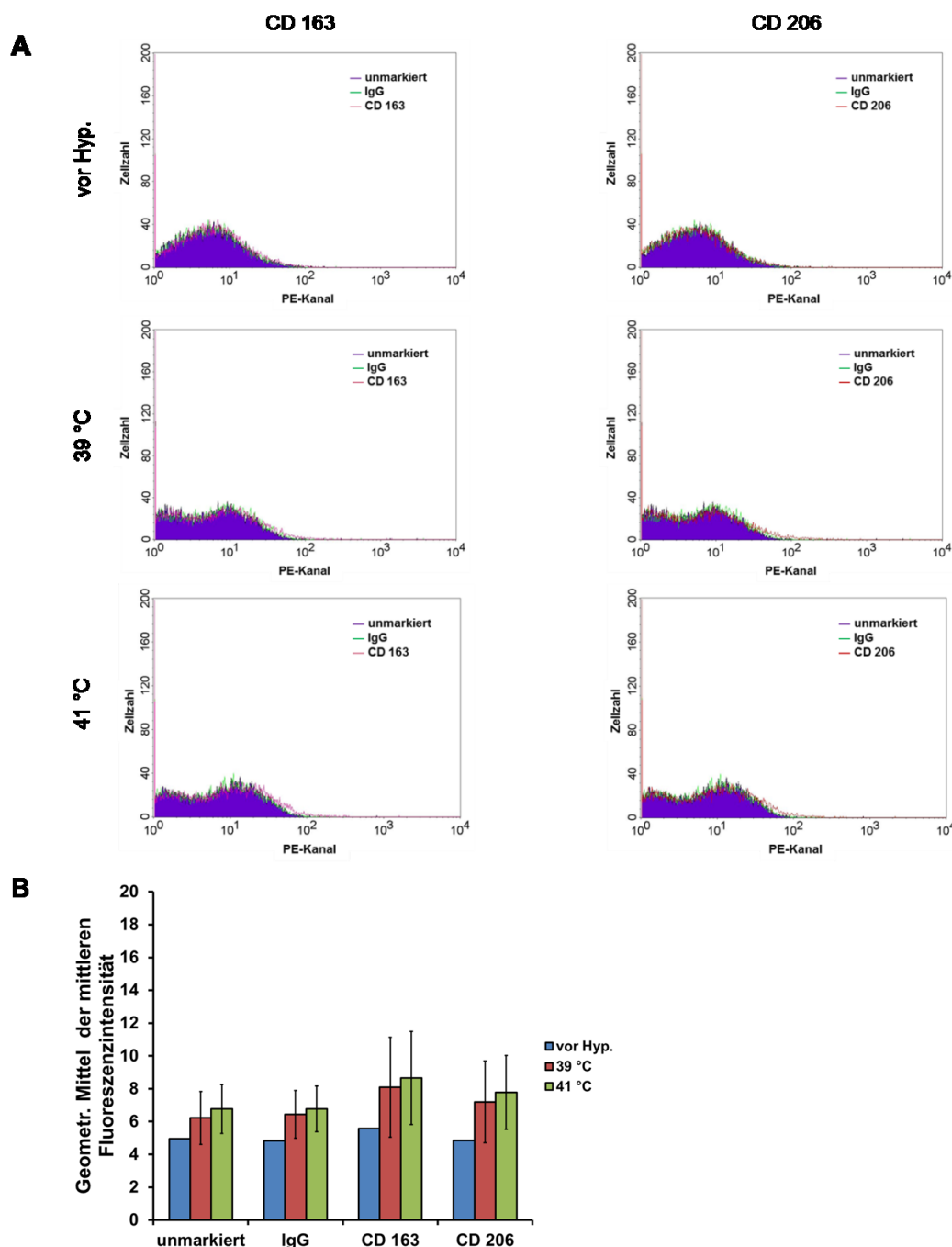


Abbildung 12: Analyse der Oberflächenexpression von CD 163 und CD 206 auf M1-Makrophagen vor und 48 h nach einer Brutschrankhyperthermie mittels Durchflusszytometrie. M1-Makrophagen wurden bei 39 °C und 41 °C für 60 min im Brutschrank inkubiert. 48 h nach der Hyperthermiebehandlung wurde die Oberflächenexpression der beiden für M2-Makrophagen typischen Marker mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei wurden für die Analyse 1×10^6 Zellen in 1000 μ l FACS-Puffer pro Ansatz verwendet, die entweder unmarkiert blieben, mit einem PE-gekoppelten Anti-CD 163 Antikörper, einem PE-gekoppelten Anti-CD 206 Antikörper oder der entsprechenden IgG-Isotypkontrolle inkubiert wurden. **A:** Repräsentative Darstellung des CD 163- und CD 206-Markers auf der Zelloberfläche anhand der MFI. **B:** Quantitative Auswertung der Oberflächenexpression der Marker eines durchgeführten Experimentes mit M1-Makrophagen vor Hyperthermie ($n = 1$) bzw. drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit M1-Makrophagen 48 h nach Hyperthermie ($n = 3$). Dargestellt sind die Mittelwerte der geometr. Mittel der MFI und deren Standardabweichungen.

7 Diskussion

Bei der Vielzahl von Therapieansätzen für die Behandlung chronischer Wunden stellt die Wirkung von Wärme auf das Wundheilungsgeschehen einen vielversprechenden Ansatz dar. Jedoch fehlt bisher ein umfassendes Verständnis der Wirkmechanismen einer Hyperthermie auf Zellen, die in die Wundheilung involviert sind. In der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* der Einfluss einer milden Hyperthermie auf die Kurzzeitvitalität von Endothelzellen und Makrophagen, welche im Wundheilungsprozess eine entscheidende Rolle spielen, demonstriert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine milde Hyperthermie auf M1-Makrophagen die Expression von Oberflächenmarkern, die charakteristisch für M2-Makrophagen sind, induziert.

7.1 HMEC-1-Zell-Wachstumskurve

Die Untersuchung des Wachstums- und damit des Proliferationsverhaltens der Zellen in Abhängigkeit der Zellzahl über einen Zeitraum von 96 h zeigte, dass während des gesamten Untersuchungszeitraums bei den eingesetzten Zellzahlen vitale Zellen mit metabolischer Aktivität vorlagen.

Eine Wachstumskurve wird generell in eine lag-Phase, eine logarithmische Phase, eine stationäre Phase und eine Absterbephase unterteilt. In der lag-Phase passt sich der Metabolismus der Zellen an die neuen Kultivierungsbedingungen an, weshalb das Zellwachstum in dieser Phase noch vermindert ist. In der vorliegenden Arbeit war die lag-Phase bei den Zeiträumen 48 h und 72 h bis zu einer Zellzahl von 1000 Zellen erkennbar. Bei der 24 h-Inkubation befanden sich die HMEC-1-Zellen bei allen eingesetzten Zellzahlen in dieser Phase. Ein weiterer Grund für das verminderte Wachstum der HMEC-1-Zellen in dieser Phase ist wahrscheinlich die vorherige Behandlung der Zellen mit Biotase. Die Ablösung der Zellen vom Substrat mit Hilfe dieses Enzyms und die anschließende Zentrifugation induzierten Zellstress, von dem sich die Zellen in der lag-Phase erholen. Die anschließende logarithmische Phase ist durch kontinuierliches Zellwachstum gekennzeichnet. Die Zellen haben optimale Kultivierungsbedingungen und ausreichend Nährstoffe um zu proliferieren. In dieser Wachstumsphase befanden sich die HMEC-1-Zellen nach 96 h bis zu einer Zellzahl von 2000 Zellen, was anhand der annähernden Linearität der Absorptionswerte erkennbar war.

Ebenfalls konnte diese Phase im Bereich von 1000 bis 8000 Zellen nach dem Zeitraum von 48 h und im Bereich von 1000 bis 3000 Zellen nach dem Zeitraum von 72 h festgestellt werden. Für den Fall, dass eine bestimmte Zelldichte erreicht ist oder ein Mangel an Nährstoffen vorliegt, vermindern die Zellen ihr Wachstum und damit die Proliferation. Dies ist charakteristisch für die stationäre Phase. Diese Phase war nach einer Inkubation von 48 h ab einer Zellzahl von 8000 Zellen, nach einer Inkubation von 72 h ab einer Zellzahl von 3000 Zellen und nach einer Inkubation von 96 h im Bereich von 2000 bis 8000 Zellen ersichtlich. Auf die stationäre Phase folgt schließlich die Absterbephase aufgrund von Nährstoffmangel-bedingtem Zelltod. Diese Phase trat bei der 96 h-Inkubation ab einer Zellzahl von 8000 Zellen auf.

7.2 HMEC-1-Zellen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität auf

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass HMEC-1-Zellen in einem Zeitraum bis zu 72 h nach einer Brutschrankhyperthermie bei 39 °C, 41 °C und 43 °C tendenziell eine erhöhte Vitalität aufwiesen. Temperaturen im Bereich von 39 °C bis 43 °C lösten somit einen proliferativen Effekt in den Zellen aus, wodurch möglicherweise die Angiogenese gefördert wird.

Eine Beeinflussung der Gefäßneubildung durch Anwendung einer Hyperthermie ist aus der Tumorforschung bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Tumoren nach einer 60-minütigen Hyperthermiebehandlung bei 42 °C und 46 °C eine erhöhte Vaskularisierung aufweisen (Hallasch et al. 2017). Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe um Rattan ebenfalls, dass eine einstündige Hyperthermie von 41 °C die Gefäßbildung von Endothelzellen fördert (Rattan et al. 2007, Rattan et al. 2009). Eine Vorbehandlung von HMEC-1-Zellen bei 41 °C für 60 min bewirkte hierbei *in vitro* eine Zunahme der Gefäßlänge um ca. 30 % (Rattan et al. 2007). Ein möglicher Grund für die in dieser Arbeit ermittelte erhöhte Vitalität der Endothelzellen könnte die durch milde Hyperthermie induzierte Bildung von Hitzeschockproteinen (HSPs) sein. HSPs scheinen eine Rolle bei der Ausbildung einer Thermotoleranz von Zellen zu spielen (Bettaieb und Averill-Bates 2005). Zudem konnte eine abgeschwächte Apoptose, welche normalerweise durch ROS und den FasL-Signalweg ausgelöst wird, in thermotoleranten Zellen festgestellt werden (Bettaieb und Averill-Bates 2008). Ebenfalls gibt es Hinweise, dass

beispielsweise HSP 90 die Gefäßbildung durch HUVEC-Zellen, welche ebenfalls Endothelzellen sind, fördert, indem es unter anderem die Genexpression der Stickstoffoxid-Synthase und damit die Bildung von Stickstoffoxid begünstigt (Sun und Liao 2004). Das Stickstoffoxid wirkt wiederum fördernd auf die Gefäßneubildung (Soneja et al. 2005).

Unerwarteter Weise zeigten in dieser Arbeit HMEC-1-Zellen, welche bei 43 °C behandelt wurden, über den gesamten Beobachtungszeitraum nach der Behandlung eine erhöhte Vitalität. Unerwartet dahingehend, da aus der Literatur bekannt ist, dass Temperaturen im Bereich von 42 °C bis 43 °C unter anderem durch Hitze-bedingten ER-Stress letale Effekte auf Zellen haben (Bettaieb und Averill-Bates 2015). Allerdings berichtet die Arbeitsgruppe um Roca, dass eine Behandlung von Endothelzellen bei 43 °C nicht die Vitalität beeinflusst, sondern die Fähigkeit dieser Zellen sich in kapillar-ähnliche Strukturen zu organisieren (Roca et al. 2003). Weiterhin konnte in der Literatur gezeigt werden, dass Endothelzellen nach einer 2-stündigen Hyperthermiebehandlung bei 43 °C keine veränderte Vitalität aufweisen (Orihara et al. 2002). Vermutlich führte in der vorliegenden Arbeit eine Hyperthermiebehandlung bei 43 °C über oben aufgeführte Mechanismen zu einer Thermotoleranz der HMEC-1-Zellen.

Letztendlich kann man schlussfolgern, dass Endothelzellen durch eine Hyperthermiebehandlung im milden Temperaturbereich eine erhöhte Vitalität und somit auch ein gesteigertes Proliferationsverhalten, was die Bildung von neuen Gefäßen begünstigen könnte, aufweisen. In Bezug auf die Heilung chronischer Wunden, könnte eine milde Hyperthermie im Wundareal möglicherweise eine Neoangiogenese fördern und damit den Einfluss von Endothelzellen im Wundheilungsprozess stärken.

7.3 HMEC-1-Zellen zeigen 14 Tage nach Anwendung einer milden Hyperthermie eine verringerte Vitalität

Eine milde Hyperthermie bei 39 °C und 41 °C verringerte die Anzahl an gebildeten Kolonien der HMEC-1-Zellen über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen nach der Behandlung. Dies deutet darauf hin, dass eine milde Hyperthermie über einen längeren Zeitraum zu einer Verminderung der Zellvitalität führt und damit hemmend auf die Proliferation der Zellen wirkt.

Scheinbar induziert eine 60-minütige milde Hyperthermie nur vorübergehend eine Thermotoleranz in den HMEC-1-Zellen, wodurch die kurzzeitig erhöhte Vitalität dieser Zellen zu erklären ist. Über einen längeren Zeitraum könnten jedoch Hitzebedingte zelltoxische Effekte, wie die durch ROS-Bildung und ER-Stress bedingte Apoptose, überwiegen (Bettaieb und Averill-Bates 2015, Betaieb und Averill-Bates 2008). Denkbar wäre, dass eine verlängerte Thermotoleranz ebenfalls die Vitalität der Zellen über einen längeren Zeitraum beeinflusst. Eine Verlängerung der Dauer der Hyperthermiebehandlung oder wiederholte Hyperthermiebehandlungen könnten hierbei eine Möglichkeit sein, die Thermotoleranz durch eine vermehrte Produktion von HSPs in der Zelle zu verlängern. Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Auswahl des Colony Forming Assays als Methode zur Erfassung der Langzeitvitalität von HMEC-1-Zellen. Durch die rein makroskopische Auswertung des Assays findet eine subjektive Beurteilung der Vitalität statt. Es wird subjektiv festgelegt, ab welcher Größe eine HMEC-1-Zellansammlung als Kolonie definiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde 1 mm Durchmesser der HMEC-1-Zellansammlung als Schwellenwert für eine zählbare Kolonie definiert. Um bei zukünftigen Experimenten mit HMEC-1-Colony Forming Assays eine objektivere Analyse der Assays durchzuführen, sollte auch die Möglichkeit einer mikroskopischen oder Computersoftware-basierten Auswertung in Betracht gezogen werden (Rafehi et al. 2011).

7.4 THP-1-Zell-Wachstumskurve

Anhand der Wachstumskurve konnte das Wachstumsverhalten von THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl über einen Zeitraum bis zu 96 h aufgezeigt werden. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes lagen bei allen eingesetzten Zellzahlen vitale Zellen mit metabolischer Aktivität vor.

Wie bereits in Abschnitt 7.1 erwähnt, wird eine Wachstumskurve prinzipiell in eine lag-Phase, eine logarithmische Phase, eine stationäre Phase und eine Absterbephase unterteilt. In der lag-Phase findet eine Anpassung des Zellmetabolismus an die neuen Kultivierungsbedingungen statt, weshalb in dieser Phase ein noch vermindertes Wachstum der Zellen vorliegt. In der vorliegenden Arbeit befanden sich die THP-1-Zellen nach einer Inkubation von 24 h und 48 h bei allen verwendeten Zellzahlen in der lag-Phase. Während bei der 72 h-Inkubation die lag-Phase bis zu einer Zellzahl von 4000 Zellen zu erkennen war,

konnte diese Phase nach 96 h bis zu einer Zellzahl von 2000 Zellen festgestellt werden. Die anschließende logarithmische Phase ist durch permanentes Zellwachstum gekennzeichnet. Den Zellen liegen in dieser Phase optimale Kultivierungsbedingungen und genügend Nährstoffe zur Proliferation zugrunde. Die logarithmische Phase des Wachstums war bei den THP-1-Zellen nach einem Zeitraum von 72 h ab einer Zellzahl von 4000 Zellen und nach einem Zeitraum von 96 h im Bereich von 2000 bis 10000 Zellen zu erkennen. Im Falle des Erreichens einer bestimmten Zelldichte oder eines Nährstoffmangels vermindern die Zellen ihr Wachstum und somit die Proliferation. Dies ist kennzeichnend für die stationäre Phase, welche bei den THP-1-Zellen nach einer Inkubation von 96 h ab einer Zellzahl von 10000 Zellen ersichtlich war. Die Absterbephase war bis einschließlich der maximal eingesetzten Zellzahl über einen Zeitraum von 96 h nicht zu erkennen.

7.5 Undifferenzierte THP-1-Zellen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität auf

THP-1-Zellen, die einer milden Hyperthermie von 39 °C und 41 °C ausgesetzt wurden, zeigten über einen Beobachtungszeitraum von 72 h nach der Behandlung eine erhöhte Vitalität. Demgegenüber wiesen THP-1-Zellen, welche bei 43 °C behandelt wurden, eine verminderte Vitalität über den gesamten Nachbeobachtungszeitraum auf.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur, in der milde Temperaturen eine Thermotoleranz der Zellen erzeugen und deren Überleben ermöglichen, während Temperaturen ab 43 °C zu Zellzyklusarrest und Apoptose führen (Park et al. 2005). Ein stimulierender Effekt milder Hyperthermie auf Monozyten konnte in vorangegangenen Studien belegt werden. Bei gesunden menschlichen Probanden, die einer Ganzkörperhyperthermie bei 39,5 °C über eine Dauer von 2 h ausgesetzt waren, wies man 2 h danach eine erhöhte Anzahl an Monozyten im Blut nach (Kappel et al. 1991). Weiterhin ist bekannt, dass Monozyten unter Einfluss einer milden Hyperthermie in einen aktiven Zustand mit erhöhter Expression des Komplementrezeptors CD 11b und des Endotoxinrezeptors CD 14 auf der Zelloberfläche übergehen (Zellner et al. 2002). Zudem scheint die Dauer der Hyperthermiebehandlung einen Einfluss auf die Vitalität von Monozyten zu haben. Während in den durchgeführten Experimenten der vorliegenden Arbeit

eine 60-minütige milde Hyperthermie die Vitalität der Zellen steigerte, konnte die Arbeitsgruppe um Pollheimer nach einer 300-minütigen Hyperthermie bei 41 °C eine deutliche Abnahme der Zellvitalität feststellen (Pollheimer et al. 2005).

7.6 Differenzierung von THP-1-Zellen in M1- und M2-Makrophagen

Bevor der Einfluss einer milden Hyperthermie auf die Vitalität von M1- und M2-Makrophagen untersucht wurde, war es notwendig THP-1-Zellen zunächst in M0-Makrophagen und anschließend in M1- und M2-Makrophagen zu differenzieren. Es konnte eine erfolgreiche Differenzierung in M1- und M2-Makrophagen gezeigt werden.

Während die Differenzierung in M1-Makrophagen durch den Nachweis einer deutlichen Expression von CD 86 auf der Zelloberfläche bestätigt werden konnte, lag zum Nachweis einer Differenzierung in M2-Makrophagen nur eine geringe Expression der Oberflächenmarker CD 163 und CD 206 auf den Zellen vor. Dennoch ist dieses Ergebnis valide, da in der Literatur eine ähnliche Expression von CD 206 auf der Oberfläche von M2-Makrophagen beschrieben wurde (Genin et al. 2015). Ebenfalls wurde die Oberflächenexpression von CD 163 durch die Arbeitsgruppe um Buchacher zum Nachweis einer gelungenen Differenzierung in M2-Makrophagen verwendet (Buchacher et al. 2015). Um zukünftig die Oberflächenexpression der beiden M2-Marker zum Differenzierungsnachweis zu erhöhen, könnte man die Zelldifferenzierung mit veränderten Zytokinkonzentrationen versuchen. Ebenfalls besteht die Möglichkeit weitere für M2-Makrophagen typische Oberflächenmarker wie beispielsweise Dectin-1 zum Nachweis der Differenzierung zu verwenden (Stoger et al. 2012). Zudem scheint eine Ko-Kultur von M1- und M2-Makrophagen mit Brustkrebszellen (MCF-7-Zellen) die Expression von CD 163 und CD 206 zu steigern (Yang et al. 2016). Außerdem könnte man für zukünftige Experimente die Möglichkeit in Betracht ziehen durch eine Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie den Anteil an M2-Makrophagen zu erhöhen, was durch die Arbeitsgruppe um Zhu anhand einer Steigerung der CD 163-positiven Zellen von ca. 20 % auf 84 % gezeigt werden konnte (Zhu et al. 2017).

7.7 M1-Makrophagen zeigen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine erhöhte Vitalität

Eine milde Hyperthermie erhöht die Vitalität von M1-Makrophagen im Nachbeobachtungszeitraum von 72 h. Hierbei wiesen Makrophagen, die bei 39 °C behandelt wurden, zum Zeitpunkt von 48 h nach der Behandlung eine um 12 % und 72 h nach der Behandlung mit 41 °C eine um 17 % gesteigerte Vitalität verglichen mit den Referenzzellen auf.

Eine gesteigerte Vitalität von proinflammatorischen M1-Makrophagen ist vermutlich auf eine Induktion von Hitzeschockproteinen in den Zellen zurückzuführen. Es ist bekannt, dass die Effekte der Hyperthermie mit der Induktion von HSPs in Makrophagen korrelieren (Lee und Repasky 2012). Besonders HSP 70 scheint hierbei für die Vermittlung thermaler Effekte entscheidend zu sein (Lee und Repasky 2012). Da HSP 70 möglicherweise eine hemmende Wirkung auf anti-Überlebenssignalwege, wie den SAPK/JNK-Signalweg, hat, spielt dieses Hitzeschockprotein eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer Thermotoleranz von Zellen (Park et al. 2005). Eine erhöhte Expression von HSP 70, HSP 90 und HSP 110 konnte durch die Arbeitsgruppe um Tulakupar in einem Zeitraum von 2 h bis 4 h nach Anwendung einer milden Hyperthermie in Makrophagen festgestellt werden (Tulapurkar et al. 2015). Ebenfalls scheint eine milde Hyperthermie die HIF-1 α -Expression in Makrophagen vermindern zu können (Jackson et al. 2006). Da HIF-1 α in der Lage ist, eine Zellapoptose zu induzieren, könnte somit eine Verminderung von HIF-1 α in der Zelle durch Anwendung einer milden Hyperthermie zu einem verbesserten Überleben der Zellen führen (Greijer und van der Wall 2004). Dies könnte eine weitere Erklärung für die erhöhte Vitalität der M1-Makrophagen nach der Hyperthermiebehandlung sein. Neben der Wirkung einer milden Hyperthermie in Makrophagen wurden stimulatorische Effekte in weiteren Immunzellen demonstriert. In Zellen des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise den neutrophilen Granulozyten, scheint eine milde Hyperthermie die Aktivierung der Zellen und deren Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (respiratorischer Burst) zu erhöhen (Ostberg et al. 2005). Humane dendritische Zellen zeigen eine Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle, wie beispielsweise CD 80, sowie des proinflammatorischen Zytokins TNF- α (Knippertz et al. 2011).

Ein erhöhter Anteil vitaler M1-Makrophagen nach einer milden Hyperthermiebehandlung lässt vermuten, dass auch die Bildung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen sowie von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen steigt. Bezieht man diesen Aspekt auf die Wundheilung, ist denkbar, dass eine milde Hyperthermie einen erhöhten Anteil der genannten Mediatoren in einer Wunde induziert. Dies wäre besonders in der inflammatorischen Phase der Wundheilung bedeutsam.

7.8 M2-Makrophagen weisen nach Anwendung einer milden Hyperthermie kurzzeitig eine veränderte Vitalität auf

In dieser Arbeit bewirkte eine milde Hyperthermie von 41 °C eine erhöhte Vitalität von M2-Makrophagen im Zeitraum von 48 h nach der Behandlung.

Die Erhöhung der Vitalität von antiinflammatorischen M2-Makrophagen könnte durch die intrazelluläre Expression von HSPs erklärbar sein. Eine erhöhte Expression von Hitzeschock Transkriptionsfaktor-1 (HSF-1), welcher ein Transkriptionsfaktor für HSPs ist, konnte durch Anwendung einer milden Hyperthermie in Makrophagen induziert werden (Lee et al. 2015). In der Literatur wurde zudem eine erhöhte Expression von HSP 70 in Makrophagen, die mit milder Hyperthermie behandelt wurden, beschrieben (Lee et al. 2012). Es ist bekannt, dass HSPs auch antiinflammatorische Funktionen in Makrophagen ausüben (Lee und Repasky 2012). Insbesondere intrazellulär vorkommendes HSP 70 scheint den NF- κ B-Signalweg und die Produktion inflammatorischer Zytokine zu hemmen (Lee und Repasky 2012).

Eine Vitalitätserhöhung von M2-Makrophagen durch die Anwendung einer milden Hyperthermie, könnte somit von Nutzen für die Wundheilung sein, da M2-Makrophagen antiinflammatorische Eigenschaften, wie die Produktion von IL-10, Arginase-1 und TGF- β , aufweisen (Bhattacharya und Aggarwal 2018). Vor allem in der späten Phase der Wundheilung, in der M2-Makrophagen vermutlich eine wichtige Rolle spielen, könnte dies von Bedeutung sein (Sindrilaru et al. 2011).

7.9 M1-Makrophagen zeigen nach Anwendung einer milden Hyperthermie eine tendenzielle Erhöhung von CD 163 und CD 206 auf der Zelloberfläche

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass M1-Makrophagen nach einer milden Hyperthermiebehandlung über einen Nachbeobachtungszeitraum von 48 h eine tendenziell erhöhte Expression der für M2-Makrophagen typischen Oberflächenmarker CD 163 und CD 206 aufweisen.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine milde Hyperthermie möglicherweise in der Lage ist eine Umwandlung von M1- in M2-Makrophagen zu induzieren. Proinflammatorische M1-Makrophagen wurden in einen Zustand überführt, der anhand der betrachteten Zelloberflächenmarker M2-Makrophagen ähnelt und somit eine vorwiegend antiinflammatorische Funktion besitzen könnte. Inwiefern diese Makrophagen tatsächlich die Funktionen von M2-Makrophagen aufweisen, müsste durch weiterführende Experimente untersucht werden. Dass proinflammatorische Funktionen von M1-Makrophagen durch eine milde Hyperthermie vermindert werden, wurde bereits in der Literatur beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Ensor konnte feststellen, dass humane Makrophagen nach Anwendung einer milden Hyperthermie weniger TNF- α produzieren als unbehandelte Makrophagen (Ensor et al. 1994). Ebenfalls konnte eine verminderte TNF- α - und IL-1 β -Produktion bei mit LPS stimulierten Makrophagen nach einer milden Hyperthermiebehandlung nachgewiesen werden (Fairchild et al. 2000). Zudem scheinen auch HSPs, welche durch Anwendung einer milden Hyperthermie verstärkt exprimiert werden, antiinflammatorische Effekte zu bewirken (Lee und Repasky 2012). Es konnte festgestellt werden, dass HSP 70 in LPS-stimulierten Makrophagen in der Lage ist, die TNF- α und IL-1-Produktion der Zellen zu vermindern (Shi et al. 2006). Ebenfalls scheint eine milde Hyperthermie die HIF-1 α -Expression in Makrophagen reduzieren zu können (Jackson et al. 2006). In der Literatur wurde beschrieben, dass HIF-1 α an der Polarisierung von Makrophagen in den M1-Phänotyp beteiligt ist (Malyshev und Malyshev 2015). Wenn nun HIF-1 α im Makrophagen durch Hyperthermie vermindert wird, könnte die durch HIF-1 α mitbedingte M1-Polarisierung abgeschwächt werden und möglicherweise ein Übergang in den antiinflammatorischen M2-Phänotyp beginnen. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit eine veränderte

Autofluoreszenz der M1-Makrophagen nach der Hyperthermiebehandlung mittels Durchflusszytometrie festgestellt werden. Dies könnte auf morphologische Veränderungen der Zellen zurückzuführen sein. Durch die Arbeitsgruppe um Sugimoto wurde bereits beschrieben, dass Hitze die Morphologie von Zellen verändert (Sugimoto et al. 2012). In zukünftigen Experimenten sollte deshalb die Zellmorphologie vor und nach einer Hyperthermiebehandlung mittels Mikroskop bewertet werden.

Letztendlich könnte eine durch milde Hyperthermie induzierte Umwandlung von M1- in M2-Makrophagen für den Heilungsprozess von chronischen Wunden von Nutzen sein. Chronische Wunden verharren in der inflammatorischen Phase der Wundheilung mit einer persistenten Aktivierung von M1-Makrophagen (Zhao et al. 2016, Sindrilaru und Scharffetter-Kochanek 2013). Eine Umwandlung dieser proinflammatorischen M1-Makrophagen in antiinflammatorische M2-Makrophagen durch Anwendung einer milden Hyperthermie könnte somit einen Übergang von der inflammatorischen in die proliferative Phase des Wundheilungsprozesses fördern und dadurch die gesamte Wundheilung beschleunigen.

8 Schlussfolgerungen

Da die Heilung von chronischen Wunden trotz bisheriger unterschiedlicher Therapieansätze schwierig und langwierig ist, besteht ein Bedarf an weiteren Behandlungsmöglichkeiten. Die Anwendung von Wärme stellt hierbei einen möglichen Ansatz zur Behandlung von chronischen Wunden dar. Obwohl die Therapie chronischer Wunden mit Wärme bereits einen Gegenstand der klinischen Forschung darstellt, ist der Einfluss von Wärme auf Zellen, welchen im Wundheilungsprozess eine wichtige Bedeutung zukommt, weitgehend unbekannt. Um die Rolle der Wärmeanwendung in der Wundbehandlung zu stärken, gilt es somit zunächst die Effekte einer Wärmebehandlung auf Zellen im Wundheilungsgeschehen zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine milde Hyperthermie bei 39 °C und 41 °C kurzzeitig zu einer tendenziell erhöhten Vitalität von HMEC-1-Zellen (Endothelzelllinie) führt. Dies lässt, übertragen auf das Wundgeschehen, vermuten, dass eine Wärmeanwendung zu einer gesteigerten Proliferation von Endothelzellen und folglich zu einer vermehrten Gefäßbildung durch diese Zellen in der Wunde führen könnte. Durch eine somit gesteigerte Durchblutung der Wunde und einer damit einhergehenden verbesserten Versorgung der Zellen mit Nährstoffen könnte die Wundheilung beschleunigt werden. Als nächster Schritt sollte deshalb in zukünftigen Experimenten der Einfluss von Wärme auf die Fähigkeit der Endothelzellen zur Bildung neuer Gefäße mit Hilfe von Gefäßbildungsassays untersucht werden.

Ebenfalls konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass THP-1-Zellen (monozytische Zelllinie) und daraus differenzierte M1- und M2-Makrophagen nach Anwendung einer milden Hyperthermie bei 39 °C und 41 °C kurzzeitig eine Vitalitätserhöhung aufzeigen. Eine durch Wärmeanwendung bedingte Steigerung der Proliferation von Monozyten und den daraus differenzierten M1- und M2-Makrophagen könnte somit einen günstigen Einfluss auf die während des Wundheilungsgeschehens ablaufenden inflammatorischen Prozesse haben. Eine erhöhte Anzahl von M1-Makrophagen könnte vor allem in der frühen Phase der Wundheilung zur Steuerung von proinflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen, wohingegen sich eine erhöhte Anzahl an M2-Makrophagen in den

späteren Phasen der Wundheilung positiv auf antiinflammatorische Vorgänge auswirken könnte. Folglich sollte das Ziel zukünftiger Experimente sein, den Einfluss einer milden Hyperthermie auf die von M1- und M2-Makrophagen freigesetzten pro- und antiinflammatorischen Zytokinmuster zu untersuchen.

Abschließend konnte in der Arbeit eine tendenzielle Erhöhung der für M2-Makrophagen typischen Oberflächenmarker CD 163 und CD 206 auf M1-Makrophagen nach einer milden Hyperthermiebehandlung bei 39 °C und 41 °C nachgewiesen werden. Eine milde Hyperthermie könnte somit in der Lage sein, proinflammatorische M1-Makrophagen in antiinflammatorische M2-Makrophagen umzuwandeln, was verstärkte Inflammationsprozesse in chronischen Wunden dämpfen und schließlich die Wundheilung beschleunigen könnte. Gegenstand folgender Versuche sollte demnach die Analyse weiterer für M2-Makrophagen typischer Oberflächenmarker auf M1-Makrophagen nach einer milden Hyperthermiebehandlung sein, um eine Umwandlung in M2-Makrophagen bestätigen zu können.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Ahmed K, Zaidi SF. 2013. Treating cancer with heat: hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis. *J Pak Med Assoc*, 63 (4):504-508.
- Bettaieb A, Averill-Bates DA. 2005. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *J Cell Physiol*, 205 (1):47-57.
- Bettaieb A, Averill-Bates DA. 2008. Thermotolerance induced at a fever temperature of 40 degrees C protects cells against hyperthermia-induced apoptosis mediated by death receptor signalling. *Biochem Cell Biol*, 86 (6):521-538.
- Bettaieb A, Averill-Bates DA. 2015. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta*, 1853 (1):52-62.
- Bettaieb A, Wrzal PK, Averill-Bates DA. 2013. Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. In: Rangel L, Hrsg. *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. Rijeka: InTech, Ch. 12.
- Bhattacharya S, Aggarwal A. 2018. M2 macrophages and their role in rheumatic diseases. *Rheumatol Int*.
- Boateng J, Catanzano O. 2015. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing--A Review. *J Pharm Sci*, 104 (11):3653-3680.
- Bowling FL, Rashid ST, Boulton AJ. 2015. Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 11 (10):606-616.
- Buchacher T, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Fischer MB, Weber V. 2015. M2 Polarization of Human Macrophages Favors Survival of the Intracellular Pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *PLoS One*, 10 (11):e0143593.
- Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. 2014. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*, 23 (1):37-45.
- Chanput W, Mes JJ, Savelkoul HF, Wichers HJ. 2013. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct*, 4 (2):266-276.
- Chen J, Cheng GH, Chen LP, Pang TY, Wang XL. 2013. Prediction of chemotherapeutic response in unresectable non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (5):3057-3062.
- Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. 2007. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol*, 127 (5):1018-1029.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30 (7):1073-1081.
- Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. 2012. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*, 25 (7):304-314.
- DeNardo GL, DeNardo SJ. 2008. Update: Turning the heat on cancer. *Cancer Biother Radiopharm*, 23 (6):671-680.
- Dhivya S, Padma VV, Santhini E. 2015. Wound dressings - a review. *Biomedicine (Taipei)*, 5 (4):22.

- Diegelmann RF, Evans MC. 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 9:283-289.
- Dos Santos-Silva MA, Trajano ET, Schanuel FS, Monte-Alto-Costa A. 2017. Heat delays skin wound healing in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, 242 (3):258-266.
- Dreifke MB, Jayasuriya AA, Jayasuriya AC. 2015. Current wound healing procedures and potential care. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 48:651-662.
- Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. 2014. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*, 6 (265):265sr266.
- Ensor JE, Wiener SM, McCreka KA, Viscardi RM, Crawford EK, Hasday JD. 1994. Differential effects of hyperthermia on macrophage interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha expression. *Am J Physiol*, 266 (4 Pt 1):C967-974.
- Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. 2014. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 105 (2):141-150.
- Fairchild KD, Viscardi RM, Hester L, Singh IS, Hasday JD. 2000. Effects of hypothermia and hyperthermia on cytokine production by cultured human mononuclear phagocytes from adults and newborns. *J Interferon Cytokine Res*, 20 (12):1049-1055.
- Ferrante CJ, Leibovich SJ. 2012. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 1 (1):10-16.
- Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. 2008. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol*, 58 (2):185-206.
- Game FL, Jeffcoate WJ. 2016. Dressing and Diabetic Foot Ulcers: A Current Review of the Evidence. *Plast Reconstr Surg*, 138 (3 Suppl):158S-164S.
- Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. 2015. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 15:577.
- Gosain A, DiPietro LA. 2004. Aging and wound healing. *World J Surg*, 28 (3):321-326.
- Greijer AE, van der Wall E. 2004. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*, 57 (10):1009-1014.
- Guo S, DiPietro LA. 2010. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*, 89 (3):219-229.
- Hallasch S, Frick S, Jung M, Hilger I. 2017. How gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) and alphavbeta3 integrin expression reflect reorganization features of tumors after hyperthermia treatments. *Sci Rep*, 7 (1):6916.
- Han G, Ceilley R. 2017. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther*, 34 (3):599-610.
- Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. 2017. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci*, 18 (7).
- Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 43 (1):33-56.
- Hilger I. 2013. In vivo applications of magnetic nanoparticle hyperthermia. *Int J Hyperthermia*, 29 (8):828-834.
- Hoffmann G, Hartel M, Mercer JB. 2016. Heat for wounds - water-filtered infrared-A (wIRA) for wound healing - a review. *Ger Med Sci*, 14:Doc08.

- Huang C, Leavitt T, Bayer LR, Orgill DP. 2014. Effect of negative pressure wound therapy on wound healing. *Curr Probl Surg*, 51 (7):301-331.
- Jackson IL, Batinic-Haberle I, Sonveaux P, Dewhirst MW, Vujaskovic Z. 2006. ROS production and angiogenic regulation by macrophages in response to heat therapy. *Int J Hyperthermia*, 22 (4):263-273.
- Kappel M, Stadeager C, Tvede N, Galbo H, Pedersen BK. 1991. Effects of in vivo hyperthermia on natural killer cell activity, in vitro proliferative responses and blood mononuclear cell subpopulations. *Clin Exp Immunol*, 84 (1):175-180.
- Karin M, Lawrence T, Nizet V. 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*, 124 (4):823-835.
- Kim MH. 2016. Nanoparticle-Based Therapies for Wound Biofilm Infection: Opportunities and Challenges. *IEEE Trans Nanobioscience*, 15 (3):294-304.
- Knippertz I, Stein MF, Dorrie J, Schaft N, Muller I, Deinzer A, Steinkasserer A, Nettelbeck DM. 2011. Mild hyperthermia enhances human monocyte-derived dendritic cell functions and offers potential for applications in vaccination strategies. *Int J Hyperthermia*, 27 (6):591-603.
- Korber A, Klode J, Al-Benna S, Wax C, Schadendorf D, Steinstraesser L, Dissemond J. 2011. Etiology of chronic leg ulcers in 31,619 patients in Germany analyzed by an expert survey. *J Dtsch Dermatol Ges*, 9 (2):116-121.
- Kranke P, Bennett M, Roeckl-Wiedmann I, Debus S. 2004. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD004123.
- Kuroda M, Sakaue H. 2017. Adipocyte Death and Chronic Inflammation in Obesity. *J Med Invest*, 64 (3.4):193-196.
- Lee CT, Repasky EA. 2012. Opposing roles for heat and heat shock proteins in macrophage functions during inflammation: a function of cell activation state? *Front Immunol*, 3:140.
- Lee CT, Zhong L, Mace TA, Repasky EA. 2012. Elevation in body temperature to fever range enhances and prolongs subsequent responsiveness of macrophages to endotoxin challenge. *PLoS One*, 7 (1):e30077.
- Lee CT, Kokolus KM, Leigh ND, Capitano M, Hylander BL, Repasky EA. 2015. Defining immunological impact and therapeutic benefit of mild heating in a murine model of arthritis. *PLoS One*, 10 (3):e0120327.
- Levi-Polyachenko N, Jacob R, Day C, Kuthirummal N. 2016. Chitosan wound dressing with hexagonal silver nanoparticles for hyperthermia and enhanced delivery of small molecules. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 142:315-324.
- Li J, Chen J, Kirsner R. 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*, 25 (1):9-18.
- Malyshev I, Malyshev Y. 2015. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage "Switch" Phenotype. *Biomed Res Int*, 2015:341308.
- Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. 2007. Impaired wound healing. *Clin Dermatol*, 25 (1):19-25.
- Mercer JB, Nielsen SP, Hoffmann G. 2008. Improvement of wound healing by water-filtered infrared-A (wIRA) in patients with chronic venous stasis ulcers of the lower legs including evaluation using infrared thermography. *Ger Med Sci*, 6:Doc11.

- Okonkwo UA, DiPietro LA. 2017. Diabetes and Wound Angiogenesis. *Int J Mol Sci*, 18 (7).
- Orihara K, Biro S, Hamasaki S, Eto H, Miyata M, Ikeda Y, Tei C. 2002. Hyperthermia at 43 degrees C for 2h inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells, but not endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, 34 (9):1205-1215.
- Ostberg JR, Ertel BR, Lanphere JA. 2005. An important role for granulocytes in the thermal regulation of colon tumor growth. *Immunol Invest*, 34 (3):259-272.
- Park HG, Han SI, Oh SY, Kang HS. 2005. Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci*, 62 (1):10-23.
- Pollheimer J, Zellner M, Eliassen MM, Roth E, Oehler R. 2005. Increased susceptibility of glutamine-depleted monocytes to fever-range hyperthermia: the role of 70-kDa heat shock protein. *Ann Surg*, 241 (2):349-355.
- Qin Z. 2012. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 221 (1):2-11.
- Rafehi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. 2011. Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp*, (49).
- Rattan SI, Sejersen H, Fernandes RA, Luo W. 2007. Stress-mediated hormetic modulation of aging, wound healing, and angiogenesis in human cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1119:112-121.
- Rattan SI, Fernandes RA, Demirovic D, Dymek B, Lima CF. 2009. Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation. *Dose Response*, 7 (1):90-103.
- Roca C, Primo L, Valdembri D, Cividalli A, Declerck P, Carmeliet P, Gabriele P, Bussolino F. 2003. Hyperthermia inhibits angiogenesis by a plasminogen activator inhibitor 1-dependent mechanism. *Cancer Res*, 63 (7):1500-1507.
- Rodero MP, Khosrotehrani K. 2010. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol*, 3 (7):643-653.
- Rosenfeld ME. 2013. Inflammation and atherosclerosis: direct versus indirect mechanisms. *Curr Opin Pharmacol*, 13 (2):154-160.
- Sapareto SA, Dewey WC. 1984. Thermal dose determination in cancer therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 10 (6):787-800.
- Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, Gottrup F, Gurtner GC, Longaker MT. 2009. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen*, 17 (6):763-771.
- Shi Y, Tu Z, Tang D, Zhang H, Liu M, Wang K, Calderwood SK, Xiao X. 2006. The inhibition of LPS-induced production of inflammatory cytokines by HSP70 involves inactivation of the NF-kappaB pathway but not the MAPK pathways. *Shock*, 26 (3):277-284.
- Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K. 2013. Disclosure of the Culprits: Macrophages-Versatile Regulators of Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2 (7):357-368.
- Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, Hainzl A, Schatz S, Qi Y, Schlecht A, Weiss JM, Wlaschek M, Sunderkotter C, Scharffetter-Kochanek K. 2011. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest*, 121 (3):985-997.

- Soneja A, Drews M, Malinski T. 2005. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep*, 57 Suppl:108-119.
- Stoger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E, de Winther MP. 2012. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 225 (2):461-468.
- Straub RH, Schradin C. 2016. Chronic inflammatory systemic diseases: An evolutionary trade-off between acutely beneficial but chronically harmful programs. *Evol Med Public Health*, 2016 (1):37-51.
- Sugimoto N, Shido O, Matsuzaki K, Ohno-Shosaku T, Hitomi Y, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Nakamura H, Koizumi S, Yachie A, Umehara H. 2012. Cellular heat acclimation regulates cell growth, cell morphology, mitogen-activated protein kinase activation, and expression of aquaporins in mouse fibroblast cells. *Cell Physiol Biochem*, 30 (2):450-457.
- Sun J, Liao JK. 2004. Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24 (12):2238-2244.
- Tulapurkar ME, Ramarathnam A, Hasday JD, Singh IS. 2015. Bacterial lipopolysaccharide augments febrile-range hyperthermia-induced heat shock protein 70 expression and extracellular release in human THP1 cells. *PLoS One*, 10 (2):e0118010.
- Wong VW, Gurtner GC. 2012. Tissue engineering for the management of chronic wounds: current concepts and future perspectives. *Exp Dermatol*, 21 (10):729-734.
- Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM. 2002. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 3 (8):487-497.
- Yang M, Ma B, Shao H, Clark AM, Wells A. 2016. Macrophage phenotypic subtypes diametrically regulate epithelial-mesenchymal plasticity in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 16:419.
- Zellner M, Hergovics N, Roth E, Jilma B, Spittler A, Oehler R. 2002. Human monocyte stimulation by experimental whole body hyperthermia. *Wien Klin Wochenschr*, 114 (3):102-107.
- Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. 2016. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci*, 17 (12).
- Zhu Z, Ding J, Ma Z, Iwashina T, Tredget EE. 2017. Alternatively activated macrophages derived from THP-1 cells promote the fibrogenic activities of human dermal fibroblasts. *Wound Repair Regen*, 25 (3):377-388.

10 Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Repräsentative Darstellung der Temperaturverläufe während der Brutschrankhyperthermie.	22
Abbildung 2: Repräsentative Darstellung der Wachstumskurve von HMEC-1-Zellen.	26
Abbildung 3: Repräsentative Darstellung des Effektes einer Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von HMEC-1-Zellen über einen Nachbeobachtungszeitraum von 72 h.	27
Abbildung 4: Effekt einer milden Brutschrankhyperthermie auf die Langzeitvitalität von HMEC-1-Zellen.	28
Abbildung 5: Repräsentative Darstellung der Wachstumskurve von THP-1-Zellen.	30
Abbildung 6: Effekt einer Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von undifferenzierten THP-1-Zellen über einen Nachbeobachtungszeitraum von 72 h.	31
Abbildung 7: Analyse der Oberflächenexpression von CD 86 auf M0- und M1-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie.	33
Abbildung 8: Analyse der Oberflächenexpression von CD 163 und CD 206 auf M0- und M2-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie.	34
Abbildung 9: Effekt einer milden Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von M1-Makrophagen über einen Nachbeobachtungszeitraum von 72 h. ...	35
Abbildung 10: Effekt einer milden Brutschrankhyperthermie auf die Vitalität von M2-Makrophagen über einen Nachbeobachtungszeitraum von 72 h.	36
Abbildung 11: Analyse der Oberflächenexpression von CD 163 und CD 206 auf M1-Makrophagen vor und 24 h nach einer Brutschrankhyperthermie mittels Durchflusszytometrie.	38
Abbildung 12: Analyse der Oberflächenexpression von CD 163 und CD 206 auf M1-Makrophagen vor und 48 h nach einer Brutschrankhyperthermie mittels Durchflusszytometrie.	39

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte sowie deren Hersteller.....	14
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller	15
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller	15
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer sowie deren Zusammensetzung ...	16
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper mit der Spezies des Spendertiers, der Markierung, der für die Durchflusszytometrie notwendigen Verdünnung und deren Hersteller.....	16
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Software-Programme und deren Hersteller	17
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Zelllinien, der Zellart und deren Herkunft	17
Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, deren Medium und deren initialer Passagezahl.....	18
Tabelle 9: Darstellung der Zusammensetzung der Coomassie Brillant Blau- Färbelösung.....	24
Tabelle 10: Darstellung der Kodierung der p-Werte	24

10.3 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Allen, die mich bei der Anfertigung meiner medizinischen Dissertation unterstützt haben, herzlichst bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ingrid Hilger, die mir die Anfertigung der Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat, für die herausragende Betreuung bedanken. Von ihr wurde mir von Beginn an ein strukturierter Leitfaden zur Bearbeitung meines Themas vorgelegt und ich konnte durch ihre Hilfe die wissenschaftliche Denk- und Arbeitsweise erlernen. Bei auftretenden Fragen war sie ein dauerhafter Ansprechpartner und konnte mich durch ihre wissenschaftliche Herangehensweise an Probleme und ihren stets positiven Zuspruch zu einer zügigen, aber doch präzisen Arbeitsweise anspornen.

Weiterer Dank gebührt Frau Dr. Susann Piehler, die mir bei im Laufe der Dissertation auftretenden Problemen zur Seite stand und durch konstruktive Kritik in vielen Situationen weiterhalf.

Ich danke Prof Dr. Udo Markert für die Übernahme der Zweitbetreuung meiner Dissertation.

Herrn Dr. Martin Förster danke ich für die Einweisung in die Handhabung des FACS-Gerätes und die Möglichkeit das FACS-Gerät der Klinik für Innere Medizin I zu nutzen.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Ulf Teichgräber für die Möglichkeit, am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie promovieren zu dürfen.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team der AG Experimentelle Radiologie. Speziell hervorzuheben sind hierbei Frau Dr. Felista Tansi, Frau Elena Müller, Frau Julia Göring und Frau Susann Burgold, die ständig ein offenes Ohr für meine Fragen hatten. Zudem danke ich Frau Lena Wucherpfennig, Herrn Hussam Hidarh und Herrn Mohammad Dabaghi für die schöne Zeit im Labor.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung mein Medizinstudium und die Erstellung der Dissertation nicht möglich gewesen wären.

10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. rer. biol. hum. Hilger und Frau Dr. rer. nat. Piehler

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Julius Maximilian Ehnert