



Going further
for health

« *Verstärkung der Wachstums-
faktoraktivität – Auswirkungen
auf die Epithelisierungsphase
bei der Wundheilung* »

Mat. Nr. 847 116 (02/16)



052 674 31 11
info@ivf.hartmann.info
www.ivf.hartmann.info

IVF HARTMANN AG
Victor-von-Brunns-Strasse 28
Postfach 634
CH-8212 Neuhausen



HydroTherapy
Wirksam. Und Einfach.



Übersicht

In diesem Artikel geht es hauptsächlich um die mittlere Phase der Wundheilung mit der Epithelisierung und um eine neue Technologie auf Polymerbasis, die die endogene Aktivität von Wachstumsfaktoren anregen und die Epithelisierung beschleunigen kann.

Bei der Wundheilung werden die Zellfunktionen durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und lösliche Mediatoren reguliert und koordiniert. In der Entzündungsphase überwiegen entzündungsfördernde Zytokine. Später, während der Bildung von Granulationsgewebe und Epithelisierung, wechselt das Wundmilieu von Entzündung zu Angiogenese, Bildung von Bindegewebe sowie Vermehrung und Migration von Epithelzellen^[1]. Daher produzieren Zellen in der Granulationsphase andere Wachstumsfaktoren als in der frühen Entzündungsphase.

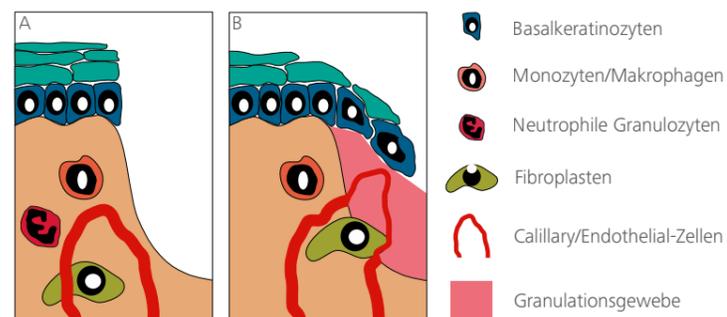
Mit dem ersten Ereignis der Wundheilung, der Aktivierung von Gerinnung und Thrombozyten werden von den Thrombozyten am Ort der Verletzung hohe Konzentrationen von vorgefertigten Wachstumsfaktoren abgegeben^[2]. Während der anschließenden Entzündungsphase synthetisieren Neutrophile und Makrophagen entzündungsfördernde Zytokine wie Interleukine und Tumornekrosefaktor α und setzen diese frei. Gleichzeitig wird die Entzündung durch die Freisetzung von entzündungshemmenden Zytokinen wie Interleukin-1-Rezeptorantagonist und

Interleukin 10 durch einen Teil der einwandernden Makrophagen eingedämmt^[3]. Entzündungshemmende Zytokine sind erforderlich, um die Entzündung einzudämmen und die Granulation einzuleiten. Diese Phase wird von Wachstumsfaktoren dominiert, die die Produktion von Bindegewebe (Mitglieder der Familie des transformierenden Wachstumsfaktors β , Bindegewebs-Wachstumsfaktor), die Angiogenese (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) anregen und Wachstumsfaktoren, die die Proliferation und Migration von Keratinozyten fördern (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2, 7, 10, transformierender Wachstumsfaktor α , Hepatozyten-Wachstumsfaktor). Schliesslich erfolgt der epitheliale Wundverschluss, die epidermale Barriere wird wiederhergestellt und die Wundheilung abgeschlossen. In den nächsten Wochen bis Monaten wird die frische Narbe umgebildet, bis eine reife Narbe mit veränderter Gewebetextur und reduzierter Kapillardichte entstanden ist^[4]. Abbildung 1 zeigt vereinfacht den Ablauf der Wachstumsfaktor-Expression bei der normalen Wundheilung.

Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

Wachstumsfaktoren und Zytokine sind Proteine, die von Zellen synthetisiert werden. Die Wirkungen von Wachstumsfaktoren werden über zahlreiche Mechanismen gesteuert, um auch in einem komplexen Mikromilieu gewebe- oder zellspezifische Reaktionen abzurufen.

Die De-novo-Synthese von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wird strikt reguliert, nachdem die Zelle die entsprechenden Reize erhalten hat. Ein anderer Mechanismus ist die kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den intrazellulären Organellen. In diesem Fall werden Wachstumsfaktoren im Voraus produziert, in der Zelle in intrazellulären Granula gespeichert und bei Aktivierung innerhalb von Minuten freigesetzt. Thrombozyten sind ein hervorragendes Beispiel. Wenn sie aktiviert werden (z. B. bei der Blutstillung) wird eine komplexe Mischung aus gespeicherten Wachstumsfaktoren in den Extrazellulärraum abgegeben^[5] (Tabelle 1). Im Allgemeinen



	Entzündungsphase (A)	Granulationsphase (B)
Keratinozyten	IL-1 α , IL-1RA, IL-6	FGF22, TNF α , (IL-1 α)
Monozyten	IL-1 β , TNF α , IL-1RA, IL-6	IL-10, VEGF, TNF α
Neutrophile Granulozyten	IL-1 β , TNF α , Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	
Fibroblasten	IL-6, (FGF7), (GM-CSF)	FGF7, FGF10, TGF β , HGF, GM-CSF
Endotheliale Zellen	IL-6, (FGF7), (GM-CSF)	FGF7, FGF10, TGF β , HGF, GM-CSF

Abbildung 1

Zelluläre und molekulare Interaktionen während der Entzündung und Bildung von Granulationsgewebe bei der Wundheilung

Die frühe Entzündungsphase (A) ist durch den Zustrom von Entzündungszellen wie Neutrophile und Makrophagen gekennzeichnet. Das Zytokin-Mikromilieu wird von Interleukin 1 (IL-1 α , -1 β), Tumornekrosefaktor (TNF) α , reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der beginnenden Produktion von entzündungshemmenden Faktoren wie Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) beherrscht. Später, nach Bildung von Granulationsgewebe (B), wird das Mikromilieu durch Wachstumsfaktoren wie den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) β , die Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-Familie, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) und den Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden-Faktor (GM-CSF) beherrscht. In beiden Stadien liegt ein zellspezifisches Expressionsmuster vor.

Tabelle 1.

Faktoren, die von aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden (angepasst von^[5])

Interleukin (IL)-1 α
Interleukin (IL)-1 β (Spuren)
Tumornekrosefaktor (TNF)- α
Interleukin (IL)-6 (Spuren)
Interleukin (IL)-7
Interleukin (IL)-8
Interleukin (IL)-10 (Spuren)
Interferon (IFN)- γ
Transformierender Wachstumsfaktor (TGF)- β 1
Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (bFGF)
Transformierender Wachstumsfaktor (TGF)- α
Thrombozytärer Wachstumsfaktor (PDGF)-AA
Thrombozytärer Wachstumsfaktor (PDGF)-AB/BB
Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)
Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF)1
Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF)2
Bindungsprotein des insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF-BP)3
Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)
CXCL1/2/3 (GRO)
CCL3/MIP-1 α
CCL4/MIP-1 β
CCL5/RANTES
Löslicher CD40-Ligand (sCD40L)
Lösliches endotheliales Adhäsionsprotein 1 (sVCAM-1)
Lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (sICAM-1)
Plättchenfaktor 4 (PF4)
beta-Thromboglobulin (beta-TG)

ist die Konzentration der freigesetzten Wachstumsfaktoren im Extrazellulärmilieu sehr gering. Ihre hohe Wirkstärke ist durch ihre hohe Bindungsaffinität für spezifische Wachstumsfaktor- oder Zytokinrezeptoren bedingt. Die meisten dieser Rezeptoren befinden sich auf der Zelloberfläche. Mediatoren aktivieren ihre entsprechenden Rezeptoren durch Veränderung der dreidimensionalen Struktur und/oder Cluster-Bildung, sodass das wachstumsfaktor- oder zytokinspezifische Signal ins Zellinnere weitergegeben wird. Hier verarbeitet das intrazelluläre Signalsystem alle eingehenden Signale und entscheidet über die spezifische Reaktion der Zelle. Auf Rezeptorebene herrscht eine gewisse Freizügigkeit. Einige Zytokine und Rezeptoren können mehrere unterschiedliche Rezeptoren aktivieren. Andere Wachstumsfaktor- und Zytokinrezeptorpaare sind hochspezifisch und einzigartig. In biologischen Systemen kann die Expression von Rezeptoren reguliert werden. In einer Zellpopulation gibt es möglicherweise Zellen, die einen bestimmten Rezeptor sehr stark exprimieren, sodass diese Zellen extrem auf ihren entsprechenden Wachstumsfaktor ansprechen. Andere Zellen exprimieren den Rezeptor nicht oder nur sehr gering, sodass diese Zellen wenig oder überhaupt nicht ansprechen. Darüber hinaus stossen einige

Zellen Rezeptoren ab. Dabei werden Rezeptoren kontrolliert und proteaseabhängig von der Zelloberfläche entfernt, sodass die Zelle nicht mehr auf die entsprechenden Wachstumsfaktoren oder Zytokine reagiert. Eine vierte Ebene bei der Regulierung von Effekten von Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen betrifft die Bindung an die Extrazellulärmatrix. In diesem Fall werden Wachstumsfaktoren produziert, freigesetzt und mit hoher Affinität an Moleküle der Extrazellulärmatrix des Bindegewebes gebunden. Auf diese Weise werden Wachstumsfaktoren und ihre Aktivitäten sehr elegant auf bestimmte Bereiche in einem Organ oder Gewebekompartiment beschränkt. Diese Wachstumsfaktoren können inaktiv sein und nur aktiv werden, wenn sie durch Gewebeumbau oder Proteasen, die Matrixmoleküle abbauen, aus ihren Matrixspeichern freigesetzt werden^[6]. Bemerkenswert ist, dass einige Aktivitäten der Wachstumsfaktoren durch Interaktion mit den Matrixmolekülen oder ihren Abbauprodukten potenziert werden können (z. B. Vermittlung einer besseren Bindung an ihre Zellrezeptoren, Co-Stimulation^[7,8]). Ihre Aktivität kann auch vor dem Abbau geschützt werden (z. B. durch extrazelluläre Proteasen^[9]).

Insgesamt sind Wachstumsfaktoren und Zytokine ein wesentlicher Teil der Kommunikation zwischen Zellen. Die spezifische Kommunikation über Wachstumsfaktoren und Zytokine kann auf mehreren Ebenen durch folgende Prozesse gesteuert werden:

- Regulierung der De-novo-Synthese
- Sekretion von vorgeformten Wachstumsfaktoren oder Zytokinen aus intrazellulären Speichern
- Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Reservoirs der extrazellulären Matrix
- Kontrolle der Zielzellempfindlichkeit über die Rezeptorexpression und -reduktion
- Integration mehrerer intrazellulärer Signalwege.

Räumliche Expression von Wachstumsfaktoren – epitheliale-mesenchymale Interaktionen

Bei der Wundheilung organisiert die Kommunikation zwischen Zellen die Wundheilung. In der Entzündungsphase dominieren Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen) die Kommunikation über IL-1 und TNF α . Später besiedeln andere Monozyten/Makrophagen das primitive Granulationsgewebe^[3]. Die Expression von entzündungshemmendem IL-10, die Angiogenese, einschliesslich vaskulärem endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), und Mitglieder der TGF β -Familie, fördern die Produktion von neuer Extrazellulärmatrix und die Angiogenese.

Bei Keratinozyten und Mesenchymzellen (Fibroblasten und Endothelzellen) ist ein interessantes Muster für die Wechselwirkung von Zellen untereinander zu beobachten; Keratinozyten und die zugrunde liegenden Fibroblasten interagieren eng über parakrine Mediatorschleifen^[9]. Keratinozyten geben Faktoren wie IL-1 α ab, die die Expression von Wachstumsfaktoren bei Fibroblasten fördern (z. B. FGF7, HGF), die sich wiederum auf die Proliferation und Migration von Ke-

ratiocyten auswirken^[10,11]. Dieses Verstärkungssystem ist sehr potent und äusserst effektiv. Beispielsweise führt die Blockierung der HGF-Funktion im genetischen Tiermodell zu schweren Wundheilungsstörungen^[12]. In anderen Fällen wurde klar, dass ein Mangel an bestimmten Wachstumsfaktoren oder Zytokinen durch ähnliche oder überlappende Wachstumsfaktoreffekte kompensiert werden kann (Redundanz)^[13-15]. Übertragen auf den Menschen bedeutet eine Wundheilungsstörung, dass mehrere Sicherheits- und Sicherungsmechanismen den Verlust des normalen physiologischen Gewebereparaturmechanismus nicht kompensieren können.

Epithelisierung – Grundmechanismus

Der epitheliale Wundverschluss ist die wichtigste Komponente und letztendlich das Ziel bei der Wiederherstellung der Hautbarriere. Die Epithelisierung erfordert die Proliferation und Migration von Keratinozyten. Beide Prozesse werden von Wachstumsfaktoren, Komponenten der Extrazellulärmatrix und ausgewogener Proteasenexpression angetrieben. Grob vereinfacht stellen Moleküle der Extrazellulärmatrix Anreize dar, die in Kombination mit der richtigen Wachstumsfaktormischung die Migration von Keratinozyten stimulieren^[16,17]. Die wichtige Rolle der Proteasen wurde in genetischen Tiermodellen deutlich, bei denen einzelne Proteasen fehlten und die epitheliale Wundheilung verzögert war^[18]. Die Rolle der Wachstumsfaktoren steht im Mittelpunkt intensiver Forschungen, deren Ziel die Stimulation der Epithelisierung mit lokaler Applikation von Wachstumsfaktoren ist. Bei der normalen Heilung tragen zahlreiche verschiedene Wachstumsfaktoren zur Epithelialisierung bei (Tabelle 2). Offensichtlich tragen verschiedene Wachstumsfaktoren aus unterschiedlichen Zellquellen zur Migration von Epithelzellen bei. Andererseits kann man durchaus mutmassen, dass es einen Synergismus zwischen einzelnen Faktoren gibt, der eine solide biologische Reaktion in Richtung der komplexen Mischung in vivo bewirkt^[19].

Morphologisch beginnt die Epithelialisierung von den Wundrändern und von noch lebensfähigen Hautanhangsgebilden in oberflächlichen Wunden/ Gewebedefekten. Wenn Keratinozyten die geeigneten Wachstumsfaktorreize erhalten, beginnen sie zu wandern und verschliessen die Wunde. Bei einer tiefen Wunde oder fehlenden Hautanhangsgebilden mit Keratinozyten dauert die Epithelialisierung von den Wundrändern bis zum Verschluss deutlich länger. Die Migrationsdistanzen werden grösser, und der lange Epithelialisierungsprozess ist anfällig für Störungen und eine verzögerte Heilung.

Konzepte zur Förderung der Epithelisierung

Aus klinischer Sicht ist die Epithelisierung anscheinend ein vernachlässigtes Thema wie eine aktuelle Umfrage bei 236 klinischen Experten ergab. Über 70 % der Experten waren der Meinung, dass die Epithelisierung in der klinischen Praxis nicht ausreichend beachtet wird^[20]. Zur Beschleunigung der Epithelialisierung

können chirurgische Eingriffe wie Meshgraft-Spalthauttransplantationen, Lappenoperationen und experimentelle Behandlungen wie die autologe/ allogene Keratocytentransplantation eingesetzt werden. Angesichts der zahlreichen Patienten mit komplexen Wunden ist es verständlich, dass insbesondere im ambulanten Sektor und in Pflegeheimen nur ein geringer Teil dieser Operationen zur Verfügung stehen. In präklinischen und einigen klinischen Studien wurden neue Konzepte wie die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren mit teilweise vielversprechenden Ergebnissen untersucht. Dennoch hat, abgesehen von Becaplermin (PDGF-BB), kein Präparat den Weg in die klinische Routine gefunden. Auch bei Becaplermin gab es bei klinischen Studien Hinweise darauf, dass, je nach applizierter Gesamtdosis, das Risiko für systemische Malignome signifikant steigt, sodass die FDA Warnhinweise in der medizinischen Gebrauchsanleitung veröffentlicht hat^[21].

Die Anwendung von autologen Keratinozyten oder zweischichtigen Hautersatzpräparaten wurde eingehend untersucht^[22]. Während in den USA einige Produkte zugelassen wurden und erstattet werden, ist die Zulassungs- und Erstattungsfrage in Europa (Schweiz ausgenommen) negativ, sodass diese Therapien routinemässig nicht verfügbar sind. Insgesamt hängt die Förderung der Epithelisierung, abgesehen von operativen Techniken, nur vom Mikromilieu des gesunden Granulationsgewebes ab, das die richtigen Anreize für die Keratinozytenmigration bietet. Es gibt keine speziellen nichtoperativen Therapiemöglichkeiten für die Beschleunigung des epithelialen Wundverschlusses, die routinemässig angewendet werden können.

Durch hydratisierte Polyurethane werden Wachstumsfaktoren in komplexen biologischen Flüssigkeiten angereichert

Eine neue Hypothese zur Beschleunigung der Wundheilung ging von der Frage aus: «Kann man die Aktivität endogener Wachstumsfaktoren steigern, die bereits im Wundbett vorhanden sind?» Bei diesem Konzept wird argumentiert, dass bei guter Präparation des Wundbetts mit gesundem Granulationsgewebe die Wachstumsfaktoren in der richtigen Mischung vorhanden sind. Die Verstärkung ihrer Aktivität könnte die weitere Gewebekonstruktion und den epithelialen Wundverschluss fördern.

Verschiedene Polymere wurden in Betracht gezogen. Hydratisierte Polyurethane sind offenbar am besten geeignet. Polyurethane werden häufig in Medizinprodukten eingesetzt. Eine spezielle Klasse bilden die hydratisierten Polyurethane. Prinzipiell reagieren chemische Vorläufer und bilden ein weiches, klares, wasserhaltiges Polyurethangel, das zu Verbänden geformt oder beispielsweise mit üblichen Polyurethan-Schaumverbänden kombiniert werden kann. Diese hydratisierten Polyurethane haben zwei Funktionen. Sie absorbieren Flüssigkeit, geben aber auch je nach Bedarf der Umgebung Wasser/Feuchtigkeit ab. In komplexen biologischen Flüssigkeiten wird Wasser sofort resorbiert, während grosse Moleküle das engmaschige Molekülsieb nicht durchdringen.

Tabelle 2.

Wachstumsfaktor	Rezeptor	Zellquelle	Keratinozyt	
			Proliferation	Migration
Epidermale Wachstumsfaktorfamilie				
- Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Epidermaler Wachstumsfaktor-rezeptor (EGFR)	Thrombozyten, Makrophagen, Fibroblasten	ja ^[29]	ja ^[30]
- Transformierender Wachstumsfaktor (TGF) α	Epidermaler Wachstumsfaktor-rezeptor (EGFR)	Keratinozyten, Fibroblasten, Makrophagen, Thrombozyten, Leukozyten	ja ^[31]	ja ^[32,33]
- Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor (HB-EGF)	epidermaler Wachstumsfaktor-rezeptor (EGFR), HER2, 3	Keratinozyten, Fibroblasten	ja ^[34]	ja ^[35,36]
Betacellulin				
- Epiregulin	Epidermaler Wachstumsfaktor-rezeptor (EGFR), HER2, 3	Keratinozyten, Fibroblasten	ja ^[37]	ja ^[38,39]
- Neuregulin	HER2, 3	Keratinozyten, Fibroblasten		ja ^[40,41]
Insulin-Familie				
- Insulin	Insulinrezeptor, Rezeptor des insulinähnlichen Wachstumsfaktors 1	β-Zellen des Pankreas	oui ^[42]	oui ^[43]
- Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF)-1	Rezeptor des insulinähnlichen Wachstumsfaktors 1, Insulinrezeptor	Fibroblasten, Thrombozyten, Melanozyten, Hepatozyten	ja ^[30]	ja ^[30]
Fibroblasten-Wachstumsfaktor				
- Fibroblasten-Wachstumsfaktor (aFGF)-1	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-rezeptor 1c, 2c, 2b, 3c	Fibroblasten	ja ^[44]	ja ^[45,46]
- Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF)-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-rezeptor 1c, 2c	Fibroblasten	ja ^[47]	ja ^[48,49]
- Fibroblasten-Wachstumsfaktor-7 (KGF-1)	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-rezeptor 2b	Fibroblasten, Mesenchymzellen	ja ^[50,51]	ja ^[52,53]
- Fibroblasten-Wachstumsfaktor-10 (KGF2)	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-rezeptor 2b	Fibroblasten, Mesenchymzellen	ja ^[54]	ja ^[54,55]
- Fibroblasten-Wachstumsfaktor-22 (FGF22)	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-rezeptor 2b	Keratinozyten	ja ^[56,57]	nein ^[56,57]
- Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) A	Vaskulärer endothelialer Rezeptor 1, 2	Keratinozyten, Makrophagen	ja ^[58]	ja ^[58,59]
Hepatozyten-Wachstumsfaktorfamilie				
- Hepatozyten-Wachstumsfaktor [HGF]	c-Met	Fibroblasten, Mesenchymzellen, Keratinozyten	ja ^[26]	ja ^[12,27]
- Makrophagen stimulierendes Protein [MSP]	Ron	Hepatozyten	ja ^[60]	ja ^[60,61]
Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor [GM-CSF]	Rezeptor des Granulozyten-Makrophagen-stimulierenden Faktors [GM-CSFR]	Fibroblasten, Mesenchymzellen, Keratinozyten, Makrophagen, Leukozyten	oui ^[62]	oui ^[63]
High-Mobility-Group-Protein β1 [HMGB1]	mehrere	Leukozyten, Makrophagen	ja ^[64]	ja ^[65]
Hitzeschockprotein 90 [HSP90]	LDL-Rezeptor-Related Protein 1 [LRP-1]	Keratinozyten	ja ^[66]	ja ^[67,68]
Chemokine				
- CXCL1/Gro-α	CXCR2	Keratinozyten	ja ^[69]	ja ^[69,70]
- CXCL8/IL-8	CXCR1, 2	Keratinozyten	ja ^[69]	ja ^[69,70]
- CXCL10/IP-10	CXCR3	Keratinozyten		ja ^[69,71]
- CXCL11/I-TAC	CXCR3	Keratinozyten		ja ^[71,72]
- CXCL12/SDF-1	CXCR4	Makrophagen	ja ^[69]	ja ^[69]
- CCL14/HCC-1	CCR1	Keratinozyten		ja ^[69]
- CCL17/TARC	CCR4	Keratinozyten		ja ^[73]
- CCL22/MDC	CCR4	Makrophagen		ja ^[69]
- CCL27/CTACK	CCR10	Keratinozyten		ja ^[69,73]
Acetylcholin	nAChR, mAChR	Zellen des peripheren Nervensystems, Keratinozyten		ja ^[74-77]

Angepasst von Seeger und Paller^[19]

Dieser Effekt wurde in der Materialkunde als «molecular crowding» (Molekülanreicherung) beschrieben^[23]. Prinzipiell wird Wasser aus komplexen biologischen Flüssigkeiten in eine Makromolekülstruktur absorbiert. Proteine in dieser Flüssigkeit werden angereichert, und im Fall von Enzymen steigt ihre Aktivität^[24]. Kollagen wird besser in Bindegewebe eingebunden^[25] oder angereichert. Wachstumsfaktoren sind aktiver (siehe unten). Diese Aktivitäten können insgesamt die Wundheilung beschleunigen, wie es bei präklinischen Tierversuchen zur Wundheilung zu beobachten war.

Proteinanreicherung von komplexen biologischen Flüssigkeiten

Um diese Hypothese zu testen, wurde verdünntes Serum mit hydratisierten Polyurethanen bebrütet. Der Versuchsaufbau ist in den Abbildungen 2 A-C dargestellt. Wasser wurde zeitabhängig absorbiert. Das Gewicht von hydratisierten Polyurethanen stieg an, und das Volumen der nicht absorbierten Flüssigkeit nahm ab (Abbildung 2D). Bei der Proteinkonzentration (verdünntes Serum) nach 24 Stunden Bebrüten mit hydratisierten Polyurethanen war unabhängig vom unterschiedlichen Molekulargewicht/der Proteingröße (Abbildung 2F) in der nicht

absorbierten Flüssigkeit ein eindeutiger Anstieg auf 235 % der Konzentration zu Beginn zu verzeichnen (Abbildung 2E).

In den nächsten Versuchen wurde der Anreicherungseffekt für Wachstumsfaktoren untersucht. Es wurden der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) und Wachstumsfaktoren, die aus Thrombozyten freigesetzt werden (Thrombozyten-Releasate), untersucht. Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor ist ein sehr potentes Mitogen für Keratinozyten^[26] und wurde unabhängig davon als Streufaktor entdeckt, weil er die Migration von Keratinozyten einleiten kann^[27]. Thrombozyten-Releasate ist eine komplexe Mischung aus Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen, die die Fibroblasten-Proliferation sehr wirksam anregt^[5,28]. Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor wurde zu verdünntem Serum hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Ausgangskonzentration mit der Konzentration nach Bebrüten mit hydratisierten Polyurethanen verglichen. Bei diesen Versuchen haben hydratisierte Polyurethane die Konzentration des Hepatozyten-Wachstumsfaktors auf 290 % erhöht. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von Thrombozyten-Releasate wurde ein Bioassay als primärer Endpunkt verwendet, um die Anreicherungseffekte für Wachstumsfaktoren von hydratisierten Polyurethanen abzuschätzen.

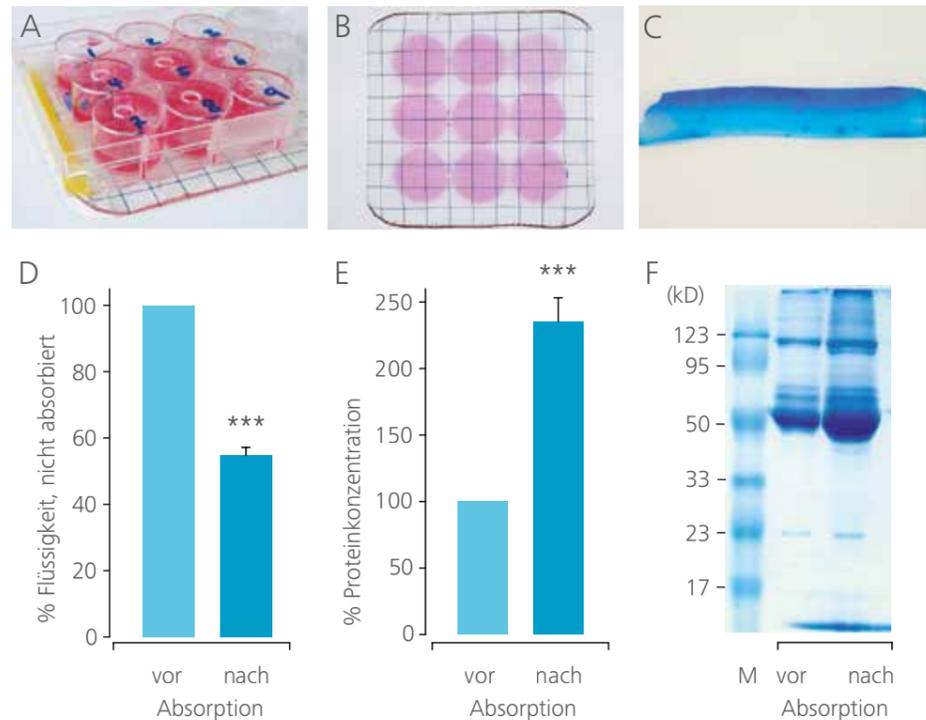


Abbildung 2

Selektive Absorption von hydratisierten Polyurethanen

Die Technologieplattform der hydratisierten Polyurethane hat ganz spezielle Eigenschaften. Bei Bebrütung mit wässrigen Flüssigkeiten (A, B) wird Wasser bevorzugt absorbiert. Für Proteine gefärbte Querschnitte des Polymers nach Bebrütung mit proteinhaltigen Flüssigkeiten haben gezeigt, dass die Proteine nach 24 Stunden nur in die ganz oberflächlichen Anteile des Polymers eingedrungen sind (C, blaue Färbung). Beim mittleren und unteren Anteil war die Färbung kaum stärker als die Hintergrundfärbung. In (D) ist die Volumenbestimmung nach Bebrüten (24 Stunden) mit hydratisierten Polyurethanen dargestellt. Das Volumen nahm auf 55 % des Ausgangsvolumens ab ($p < 0,001$). Die Proteinkonzentration stieg in der nicht absorbierten Flüssigkeit auf 235 % ($p < 0,001$). Die Analyse der Größenverteilung nach Bebrüten auf 10%-SDS-Polyacrylamidgelen ergab einen gleichförmigen relativen Anstieg der Proteine, unabhängig von ihrem Molekulargewicht (F).

Biologische Folgen der Anreicherung von Wachstumsfaktoren durch hydratisierte Polyurethane

Während Proteine und Wachstumsfaktoren aufgrund der selektiven Absorptionseigenschaft von hydratisierten Polyurethanen angereichert wurden, blieb die entscheidende Frage, ob dies zu gesteigerten biologischen Effekten führt, offen. Für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor wurde die Aktivität in Kratztests mit der HaCaT-Keratinozyten-Zelllinie untersucht. Bei diesem Test werden die Keratinozyten so kultiviert, dass sie zusammenfließen. Mit einer Pipettenspitze wird die vereinigte Einzelschicht verletzt (angeritzt). Die Zellen wandern, um den Kratzer zu schließen. Wir haben den freigelegten Bereich nach 6 Stunden untersucht. Durch die kurze Beobachtungszeit wird der konkurrierende Effekt der Zellvermehrung auf ein Minimum beschränkt. Jede Reduktion des Defektbereichs ist durch Migration und nicht durch Zellvermehrung bedingt. Der Defekt bei Kontrollkulturen wurde mit 100 % festgesetzt (Abbildung 3A). Bei Hinzufügen von Hepatozyten-Wachstumsfaktor wurde der Oberflächendefekt auf 69 % reduziert (Abbildung 3B). Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass der Hepatozyten-Wachstumsfaktor den epithelialen Wundverschluss in vitro beschleunigt hat. Wenn Hepatozyten-Wachstumsfaktor vor dem Test mit hydratisierten Polyurethanen bebrütet wurde, wurde der Epitheldefekt auf lediglich 26 % reduziert. Hierbei handelt es sich um eine massive Migrationsreaktion der Keratinozyten (Abbildung 3C).

Beim Thrombozyten-Releasate wurde die Fibroblasten-Proliferation bestimmt. Die Fibroblasten-Proliferation ist gegenüber den nicht mit hydratisierten Polyurethanen bebrüteten Kontrollen dosisabhängig auf bis zu 170 % angestiegen (Abbildung 4).

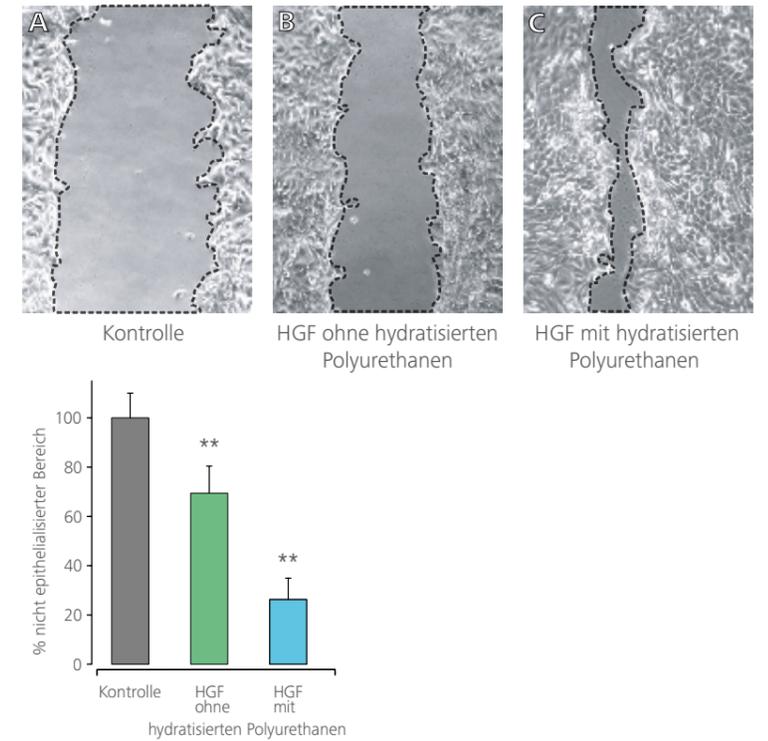


Abbildung 3

Bioaktivität von Wachstumsfaktoren, die mit hydratisierten Polyurethanen behandelt wurden

Zusammenhängende Zellkulturen von HaCaT-Keratinozyten wurden in vitro verletzt. Nach dem Zerkratzen mit einer Pipettenspitze wies der entsprechende freigelegte Bereich einen Gewebedefekt auf, der langsam reepithelialisiert wurde (A, rechter Rand); der freigelegte Bereich wurde auf 100 % festgesetzt. Bei Hinzufügen von Hepatozyten-Wachstumsfaktor zum Kulturmedium wanderten die Keratinozyten schneller und schlossen den Defekt besser; der Defekt betrug 69 % des Defekts der Kontrollen (B) ($p < 0,01$). Wenn das Medium mit Hepatozyten-Wachstumsfaktor mit hydratisierten Polyurethanen bebrütet wurde, wurde der Defekt auf lediglich 26 % reduziert ($p < 0,01$). In der Abbildung sind die Werte dargestellt. Diese Versuche haben eindeutig gezeigt, dass die Bioaktivität des Hepatozyten-Wachstumsfaktors erhalten blieb.

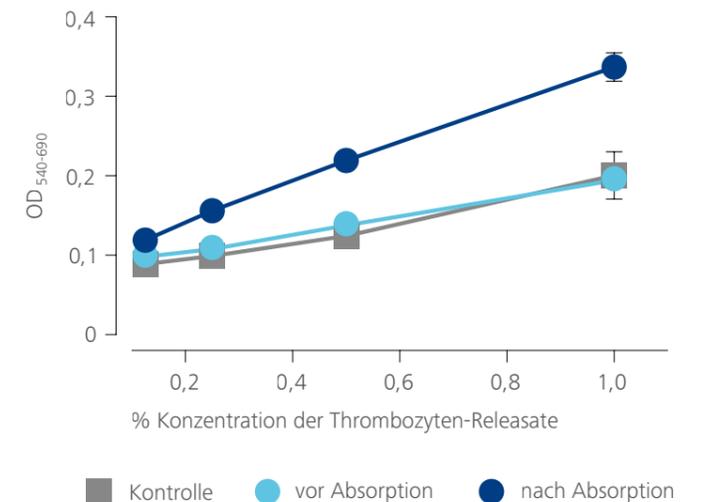


Abbildung 4

Wachstumsreaktion von menschlichen Fibroblasten auf Thrombozyten-Releasate, das mit hydratisierten Polyurethanen behandelt wurde

Primäre menschliche Fibroblasten wurden in 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät (20.000 Zellen/Well). Nach 24 Stunden wurden die Zellen in DMEM gewaschen, und das Medium wurde gegen das Testmedium (DMEM, 0,1 % FCS) ausgetauscht, das verschiedene Konzentrationen von gepooltem Thrombozyten-Releasate (bzw. FCS für die Kontrollen) enthielt, die auf der X-Achse angegeben sind. Nach 4 Tagen wurde die Zellproliferation mittels Neutralrot-Test bestimmt. Hellblaue Kreise stehen für Medium mit unbehandeltem Thrombozyten-Releasate, dunkelblaue Kreise stehen für Thrombozyten-Releasate, das mit hydratisierten Polyurethanen behandelt wurde, graue Rechtecke entsprechen der Mediumkontrolle. Nach der Behandlung des Thrombozyten-Releasates mit hydratisierten Polyurethanen kommt es zu einer deutlichen gesteigerten Proliferationsanregung ($p < 0,01$).

Präklinische Studien zur Wundheilung bestätigen eine bessere Epithelisierung

An einem grossen Tiermodell zur Wundheilung wurde untersucht, ob hydratisierte Polyurethane den epithelialen Wundverschluss beschleunigen können. Spalthaut-Entnahmestellen heilen schnell. Jeder Effekt, der über die genau abgestimmte normale Wundheilung hinausgeht, muss robust und stark sein. Zwei Spalthaut-Entnahmestellen bei 5 Schweinen wurden jeweils mit einer Kontaktschicht, die hydratisierte Polyurethane enthielt, oder mit einer inerten Silikon-Kontaktschicht behandelt. Die Wundheilung erfolgte bis Tag 4. Dann wurden die Wunden präpariert und für die histologische Untersuchung verarbeitet. Um die Wirkungen der Kontaktschichten zu vergleichen, wurde die Länge der vorgewachsenen Epithelspitze bestimmt.

Bei diesen Versuchen haben hydratisierte Polyurethane die Epithelmigration angeregt. Sie betrug $3,99 \pm 0,51$ mm gegenüber $3,23 \pm 0,43$ mm bei den inerten Silikon ($p = 0,015$). Prozentual betrug die Epithelisierungsstrecke 123,5 % von der des Verbands mit der inerten Silikon-Kontaktfläche (Abbildung 5).

Bedeutung für die menschliche Wundheilung

Diese In-vitro-Ergebnisse und präklinischen In-vivo-Ergebnisse unterstreichen einen neuen Therapieansatz: molecular crowding^[23]. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass bei Verwendung in Wundverbänden eine bessere oder schnellere Heilung erzielt werden kann. Die Technologie geht weit über eine einfache Feuchtigkeitskontrolle hinaus. Biologisch aktive Bestandteile der Wunde werden verstärkt. Diese Arbeit bedeute eine Erweiterung von früheren Arbeiten und hat gezeigt, dass verbesserte biochemische Enzymreaktionen die Matrix-Ablagerung und -Produktion durch Fibroblasten steigern. Eine Voraussetzung ist, dass grosse Moleküle wie Wachstumsfaktoren von der Absorption ausgeschlossen werden, während Wasser an das Netz der grossen Moleküle gebunden wird. Dies erfolgt spezifisch, d. h. nicht alle Makromoleküle sind gleich wirksam^[25].

Aus klinischer Sicht können die hier vorgestellten grundlegenden Ergebnisse in einer Phase der passiven Therapien, bei denen lediglich die überschüssige Flüssigkeit kontrolliert wird, die Wundheilung wesentlich voranbringen. Sobald sich eine produktive Granulation eingestellt hat, sind die für die Heilung erforderlichen Wachstumsfaktoren vorhanden. In diesem Stadium kann die globale Bioaktivität dieser Faktoren im Wundmilieu verbessert werden, um die Heilung zu beschleunigen. Diese Technologie könnte die klinische Praxis verbessern. Die gilt umso mehr, wenn man berücksichtigt, dass es nur wenige nicht chirurgische Möglichkeiten zur Beschleunigung der Epithelisierung gibt.

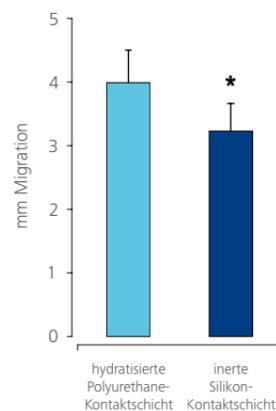
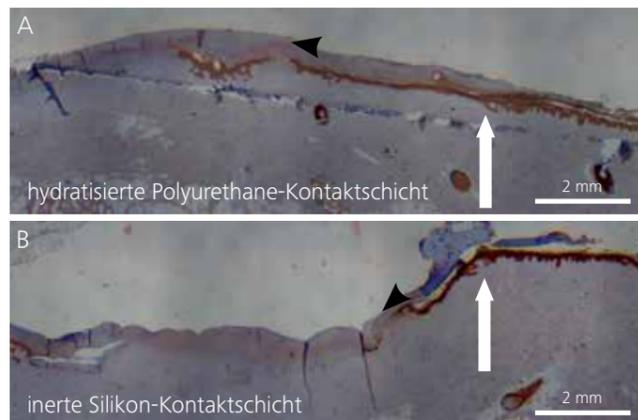


Abbildung 5

Schnellere Epithelisierung in vivo bei einem Schweinemodell mit Wundheilung bei Spalthautwunden

Bei 5 Schweinen wurden Spalthautwunden am Rücken erzeugt. Zwei Wunden wurden bei jedem Schwein mit einer Kontaktschicht, die hydratisierte Polyurethane enthielt, bzw. mit einer inerten Silikon-Kontaktschicht behandelt. Die 4 Wunden bei jedem Schwein heilten 4 Tage lang. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der histologischen Bestimmung der Spitze des Migrationsepithels (schwarz gepunktete Linie). In repräsentativen Querschnitten von mit Pan-Keratin angefärbten Wunden erscheint das Epithel braun. In (A) wanderte die Epithelspitze von Wunden, die mit einer Kontaktschicht mit hydratisierten Polyurethanen behandelt wurde, vom Wundrand aus (weisse Pfeile) wesentlich weiter als bei Wunden, die mit einer Kontaktschicht aus inertem Silikon behandelt wurden (B) ($p = 0,015$).

Literatur:

- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT: Wound repair and regeneration. *Nature* 2008, 453:314–321.
- Martínez CE, Smith PC, Palma Alvarado VA: The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update. *Front Physiol* 2015, 6:290.
- Willenborg S, Lucas T, van Loo G, Knipper JA, Krieg T, Haase I, Brachvogel B, Hammerschmidt M, Nagy A, Ferrara N, Pasparakis M, Eming SA: CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood* 2012, 120:613–625.
- Xue M, Jackson CJ: Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care* 2015, 4:119–136.
- Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, Mailänder V, Lotfi R, Ignatius A, Sensebé L, Bourin P, Schrezenmeier H, Rojewski MT: Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy* 2012, 14:540–554.
- Rifkin DB: Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem* 2005, 280:7409–7412.
- Nieto L, Canales Á, Fernández IS, Santillana E, González-Corrochano R, Redondo-Horcajo M, Cañada FJ, Nieto P, Martín-Lomas M, Giménez-Gallego G, Jiménez-Barbero J: Heparin modulates the mitogenic activity of fibroblast growth factor by inducing dimerization of its receptor. a 3D view by using NMR. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 2013, 14:1732–1744.
- Liekens S, Leali D, Neyts J, Esnouf R, Rusnati M, Dell'Era P, Maudgal PC, De Clercq E, Presta M: Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, signaling, and mitogenic activity by heparin-mimicking polysulfonated compounds. *Mol Pharmacol* 1999, 56:204–213.
- Maas-Szabowski N, Shimotoyodome A, Fusenig NE: Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci* 1999, 112 (Pt 12):1843–1853.
- Smola H, Thiekötter G, Fusenig NE: Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J Cell Biol* 1993, 122:417–429.
- Grøn B, Stoltze K, Andersson A, Dabelsteen E: Oral fibroblasts produce more HGF and KGF than skin fibroblasts in response to co-culture with keratinocytes. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2002, 110:892–898.
- Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, Wehland J, Birchmeier C, Birchmeier W: c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* 2007, 177:151–162.
- Guo L, Degenstein L, Fuchs E: Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev* 1996, 10:165–175.
- Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT: The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 1994, 266:819–822.
- Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C: Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:5672–5677.
- Henry G, Li W, Garner W, Woodley DT: Migration of human keratinocytes in plasma and serum and wound re-epithelialisation. *Lancet Lond Engl* 2003, 361:574–576.
- Li W, Henry G, Fan J, Bandyopadhyay B, Pang K, Garner W, Chen M, Woodley DT: Signals that initiate, augment, and provide directionality for human keratinocyte motility. *J Invest Dermatol* 2004, 123:622–633.
- Pilcher BK, Wang M, Qin XJ, Parks WC, Senior RM, Welgus HG: Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. *Ann N Y Acad Sci* 1999, 878:12–24.
- Seeger MA, Paller AS: The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. *Adv Wound Care* 2015, 4:213–224.
- Smola H: Survey of 236 wound care specialists on their perception of epithelialization in clinical practice. Data on file.
- Safety Alerts for Human Medical Products - Regranex (becaplermin) Gel [http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm094968.htm]
- Auger FA, Berthod F, Moulin V, Pouliot R, Germain L: Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnol Appl Biochem* 2004, 39(Pt 3):263–275.
- Foffi G, Pastore A, Piazza F, Temussi PA: Macromolecular crowding: chemistry and physics meet biology (Ascona, Switzerland, 10-14 June 2012). *Phys Biol* 2013, 10:040301.
- Pastor I, Pitulice L, Balcells C, Vilaseca E, Madurga S, Isvoran A, Cascante M, Mas F: Effect of crowding by Dextran in enzymatic reactions. *Biophys Chem* 2014, 185:8–13.
- Rashid R, Lim NSJ, Chee SML, Png SN, Wohland T, Raghunath M: Novel use for polyvinylpyrrolidone as a macromolecular crowder for enhanced extracellular matrix deposition and cell proliferation. *Tissue Eng Part C Methods* 2014, 20:994–1002.
- Sato C, Tsuboi R, Shi CM, Rubin JS, Ogawa H: Comparative study of hepatocyte growth factor/scatter factor and keratinocyte growth factor effects on human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1995, 104:958–963.
- Adams JC, Furlong RA, Watt FM: Production of scatter factor by ndk, a strain of epithelial cells, and inhibition of scatter factor activity by suramin. *J Cell Sci* 1991, 98 (Pt 3):385–394.

28. Fekete N, Rojewski MT, Lotfi R, Schrezenmeier H: Essential components for ex vivo proliferation of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2014, 20:129–139.
29. Bhora FY, Dunkin BJ, Batzri S, Aly HM, Bass BL, Sidawy AN, Harmon JW: Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin. *J Surg Res* 1995, 59:236–244.
30. Haase I, Evans R, Pofahl R, Watt FM: Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci* 2003, 116(Pt 15):3227–3238.
31. Takahashi H, Tsuji H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: Cell proliferation and cytokine induction by TNF- α of psoriatic keratinocytes are not different from normal keratinocytes in vitro. *Indian J Dermatol* 2009, 54:237.
32. Li Y, Fan J, Chen M, Li W, Woodley DT: Transforming growth factor- α : a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 2006, 126:2096–2105.
33. Kim I, Mogford JE, Chao JD, Mustoe TA: Wound epithelialization deficits in the transforming growth factor- α knockout mouse. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2001, 9:386–390.
34. Wang Z, Wang Y, Farhangfar F, Zimmer M, Zhang Y: Enhanced keratinocyte proliferation and migration in co-culture with fibroblasts. *PLoS One* 2012, 7:e40951.
35. Stoll SW, Rittié L, Johnson JL, Elder JT: Heparin-binding EGF-like growth factor promotes epithelial-mesenchymal transition in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2012, 132:2148–2157.
36. Johnson NR, Wang Y: Controlled delivery of heparin-binding EGF-like growth factor yields fast and comprehensive wound healing. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2013, 166:124–129.
37. Yoshikawa M, Kojima H, Yaguchi Y, Okada N, Saito H, Moriyama H: Cholesteatoma fibroblasts promote epithelial cell proliferation through overexpression of epiregulin. *PLoS One* 2013, 8:e66725.
38. Draper BK, Komurasaki T, Davidson MK, Nanney LB: Topical epiregulin enhances repair of murine excisional wounds. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2003, 11:188–197.
39. Draper BK, Komurasaki T, Davidson MK, Nanney LB: Epiregulin is more potent than EGF or TGF α in promoting in vitro wound closure due to enhanced ERK/MAPK activation. *J Cell Biochem* 2003, 89:1126–1137.
40. Schelfhout VRJ, Coene ED, Delaey B, Waeytens AAT, De Rycke L, Deleu M, De Potter CR: The role of heregulin- α as a motility factor and amphiregulin as a growth factor in wound healing. *J Pathol* 2002, 198:523–533.
41. Kim J-S, Bak E-J, Lee B-C, Kim Y-S, Park J-B, Choi I-G: Neuregulin induces HaCaT keratinocyte migration via Rac1-mediated NADPH-oxidase activation. *J Cell Physiol* 2011, 226:3014–3021.
42. Schüppel M, Kürschner U, Kleuser U, Schäfer-Korting M, Kleuser B: Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P2 receptor subtype. *J Invest Dermatol* 2008, 128:1747–1756.
43. Liu Y, Petreaca M, Yao M, Martins-Green M: Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. *BMC Cell Biol* 2009, 10:1.
44. Shipley GD, Keeble WW, Hendrickson JE, Coffey RJ, Pittelkow MR: Growth of normal human keratinocytes and fibroblasts in serum-free medium is stimulated by acidic and basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1989, 138:511–518.
45. Mellin TN, Cashen DE, Ronan JJ, Murphy BS, DiSalvo J, Thomas KA: Acidic fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing in diabetic mice. *J Invest Dermatol* 1995, 104:850–855.
46. Tsuboi R, Sato C, Shi CM, Ogawa H: Stimulation of keratinocyte migration by growth factors. *J Dermatol* 1992, 19:652–653.
47. Shipley GD, Keeble WW, Hendrickson JE, Coffey RJ, Pittelkow MR: Growth of normal human keratinocytes and fibroblasts in serum-free medium is stimulated by acidic and basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1989, 138:511–518.
48. Kibe Y, Takenaka H, Kishimoto S: Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin. *Br J Dermatol* 2000, 143:720–727.
49. Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O: Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2006, 14:457–462.
50. Marchese C, Rubin J, Ron D, Faggioni A, Torrisi MR, Messina A, Frati L, Aaronson SA: Human keratinocyte growth factor activity on proliferation and differentiation of human keratinocytes: differentiation response distinguishes KGF from EGF family. *J Cell Physiol* 1990, 144:326–332.
51. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA: Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 1989, 245:752–755.
52. Tsuboi R, Sato C, Kurita Y, Ron D, Rubin JS, Ogawa H: Keratinocyte growth factor (FGF-7) stimulates migration and plasminogen activator activity of normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1993, 101:49–53.
53. Marti GP, Mohebi P, Liu L, Wang J, Miyashita T, Harmon JW: KGF-1 for wound healing in animal models. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2008, 423:383–391.
54. Radek KA, Taylor KR, Gallo RL: FGF-10 and specific structural elements of dermatan sulfate size and sulfation promote maximal keratinocyte migration and cellular proliferation. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2009, 17:118–126.
55. Soler PM, Wright TE, Smith PD, Maggi SP, Hill DP, Ko F, Jimenez PA, Robson MC: In vivo characterization of keratinocyte growth factor-2 as a potential wound healing agent. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 1999, 7:172–178.
56. Jarosz M, Robbez-Masson L, Chioni A-M, Cross B, Rosewell I, Grose R: Fibroblast growth factor 22 is not essential for skin development and repair but plays a role in tumorigenesis. *PLoS One* 2012, 7:e39436.
57. Beyer TA, Werner S, Dickson C, Grose R: Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. *Exp Cell Res* 2003, 287:228–236.
58. Wilgus TA, Matthies AM, Radek KA, Dovi JV, Burns AL, Shankar R, DiPietro LA: Novel function for vascular endothelial growth factor receptor-1 on epidermal keratinocytes. *Am J Pathol* 2005, 167:1257–1266.
59. Roth D, Piekarek M, Paulsson M, Christ H, Bloch W, Krieg T, Davidson JM, Eming SA: Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *Am J Pathol* 2006, 168:670–684.
60. Wang MH, Dlugosz AA, Sun Y, Suda T, Skeel A, Leonard EJ: Macrophage-stimulating protein induces proliferation and migration of murine keratinocytes. *Exp Cell Res* 1996, 226:39–46.
61. Santoro MM, Gaudino G: Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelialization during wound healing. *Exp Cell Res* 2005, 304:274–286.
62. Kawada A, Hiruma M, Noguchi H, Ishibashi A, Motoyoshi K, Kawada I: Granulocyte and macrophage colony-stimulating factors stimulate proliferation of human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1997, 289:600–602.
63. Fang Y, Gong S-J, Xu Y-H, Hambly BD, Bao S: Impaired cutaneous wound healing in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor knockout mice. *Br J Dermatol* 2007, 157:458–465.
64. Ranzato E, Patrone M, Pedrazzi M, Burlando B: HMGB1 promotes scratch wound closure of HaCaT keratinocytes via ERK1/2 activation. *Mol Cell Biochem* 2009, 332:199–205.
65. Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, De Mori R, Guerra L, Maurelli R, Panacchia L, Di Giacomo F, Palumbo R, Di Campli C, Uccioli L, Biglioli P, Bianchi ME, Capogrossi MC, Germani A: High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing. *J Invest Dermatol* 2008, 128:1545–1553.
66. Zhang Y, Bai X, Wang Y, Li N, Li X, Han F, Su L, Hu D: Role for heat shock protein 90 α in the proliferation and migration of HaCaT cells and in the deep second-degree burn wound healing in mice. *PLoS One* 2014, 9:e103723.
67. Woodley DT, Fan J, Cheng C-F, Li Y, Chen M, Bu G, Li W: Participation of the lipoprotein receptor LRP1 in hypoxia-HSP90 α autocrine signaling to promote keratinocyte migration. *J Cell Sci* 2009, 122(Pt 10):1495–1498.
68. Tsen F, Bhatia A, O'Brien K, Cheng C-F, Chen M, Hay N, Stiles B, Woodley DT, Li W: Extracellular heat shock protein 90 signals through subdomain II and the NPVY motif of LRP-1 receptor to Akt1 and Akt2: a circuit essential for promoting skin cell migration in vitro and wound healing in vivo. *Mol Cell Biol* 2013, 33:4947–4959.
69. Kroeze KL, Boink MA, Sampat-Sardjoeopersad SC, Waaijman T, Scheper RJ, Gibbs S: Autocrine regulation of re-epithelialization after wounding by chemokine receptors CCR1, CCR10, CXCR1, CXCR2, and CXCR3. *J Invest Dermatol* 2012, 132:216–225.
70. Devalaraja RM, Nanney LB, Du J, Qian Q, Yu Y, Devalaraja MN, Richmond A: Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol* 2000, 115:234–244.
71. Yates CC, Whaley D, Hooda S, Hebda PA, Bodnar RJ, Wells A: Delayed reepithelialization and basement membrane regeneration after wounding in mice lacking CXCR3. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2009, 17:34–41.
72. Satish L, Blair HC, Glading A, Wells A: Interferon-inducible protein 9 (CXCL11)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of mu-calpain. *Mol Cell Biol* 2005, 25:1922–1941.
73. Fujimoto S, Uratsuki H, Saeki H, Kagami S, Tsunemi Y, Komine M, Tamaki K: CCR4 and CCR10 are expressed on epidermal keratinocytes and are involved in cutaneous immune reaction. *Cytokine* 2008, 44:172–178.
74. Chernyavsky AI, Arredondo J, Marubio LM, Grando SA: Differential regulation of keratinocyte chemokinesis and chemotaxis through distinct nicotinic receptor subtypes. *J Cell Sci* 2004, 117(Pt 23):5665–5679.
75. Chernyavsky AI, Arredondo J, Vetter DE, Grando SA: Central role of α 9 acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. *Exp Cell Res* 2007, 313:3542–3555.
76. Chernyavsky AI, Arredondo J, Wess J, Karlsson E, Grando SA: Novel signaling pathways mediating reciprocal control of keratinocyte migration and wound epithelialization through M3 and M4 muscarinic receptors. *J Cell Biol* 2004, 166:261–272.
77. Chernyavsky AI, Arredondo J, Karlsson E, Wessler I, Grando SA: The Ras/Raf-1/MEK1/ERK signaling pathway coupled to integrin expression mediates cholinergic regulation of keratinocyte directional migration. *J Biol Chem* 2005, 280:39220–39228.