

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Professor Dr. med. M.D. Menger)

**Verbesserung der Vaskularisierung implantierter PLGA-  
Scaffolds durch Inkorporation pro-angiogener  
Extrazellulärmatrix und Inoskulation präformierter Ge-  
fäßnetzwerke**

Eine intravitalfluoreszenzmikroskopische Studie  
am Modell der Rückenhautkammer

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2012

vorgelegt von Gunnar Jensen  
geboren am 26.01.1981 in Flensburg

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>2</b>
<b>2. SUMMARY.....</b>	<b>4</b>
<b>3. EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
<b>4. ZIEL DER STUDIE.....</b>	<b>13</b>
<b>5. MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>15</b>
<b>5.1. Versuchstiere .....</b>	<b>15</b>
<b>5.2. Tierexperimentelles Modell .....</b>	<b>15</b>
5.2.1. Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer.....	15
5.2.2. Präparation der Rückenhautkammer .....	16
5.2.3. Herstellung von PLGA-Scaffolds .....	19
5.2.4. Matrigel und dessen Inkorporation in PLGA-Scaffolds.....	19
5.2.5. Prävascularisierung von PLGA-Scaffolds .....	21
5.2.6. Implantation von Scaffolds in die Rückenhautkammer .....	22
<b>5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>23</b>
5.3.1. Mikrozirkulatorische Parameter .....	24
5.3.1.1. Gefäßdurchmesser.....	25
5.3.1.2. Blutzellgeschwindigkeit.....	25
5.3.1.3. Scherrate.....	26
5.3.1.4. Blutvolumenfluss .....	26
5.3.1.5. Gefäßpermeabilität .....	26
5.3.1.6. Fließverhalten der Leukozyten.....	27
5.3.1.7. Angiogenese-positive und perfundierte ROIs.....	27
5.3.1.8. Funktionelle Kapillardichte .....	28
5.3.1.9. Reperfundierte Blutgefäße.....	28
5.3.1.10. Hämorrhagien innerhalb der Scaffolds.....	28
<b>5.4. Aortic Ring Assay .....</b>	<b>28</b>
<b>5.5. Histologie und Immunhistochemie .....</b>	<b>30</b>
5.5.1. Inkorporation der Scaffolds.....	30
5.5.2. Leukozyteninfiltration.....	30

5.5.3. Reifegrad der Neogefäße .....	30
5.5.4. Apoptose .....	30
5.5.5. Nachweis GFP-positiver Zellen .....	31
<b>5.6. Versuchsprotokoll.....</b>	<b>31</b>
5.6.1. Versuchsgruppen .....	31
5.6.2. Versuchsablauf .....	32
5.6.3. Mikroskopie- und Analyseprotokoll für Studienabschnitt 1 .....	33
5.6.4. Mikroskopie- und Analyseprotokoll für Studienabschnitt 2 .....	33
<b>5.7. Statistik.....</b>	<b>34</b>
<b>6. ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
<b>6.1. Inkorporation von Matrigel in PLGA-Scaffolds .....</b>	<b>35</b>
6.1.1. Aortic Ring Assay .....	35
6.1.3. Implantationsexperimente .....	36
6.1.3.1. Materialeigenschaften der PLGA-Scaffolds .....	36
6.1.3.2. Angiogenese .....	36
6.1.3.3. Funktionelle Kapillardichte .....	38
6.1.3.4. Hämorrhagien innerhalb der Scaffolds.....	40
6.1.3.5. Fließverhalten der Leukozyten.....	40
6.1.3.6. Gefäßpermeabilität .....	42
6.1.3.7. Mikrohämodynamik .....	42
6.1.3.8. Histologie und Immunhistochemie .....	43
<b>6.2. Inokulation prävascularisierter Scaffolds .....</b>	<b>46</b>
6.2.1. Materialeigenschaften der implantierten Scaffolds .....	46
6.2.2. Vaskularisierung der implantierten Scaffolds .....	46
6.2.2.1. Perfundierte ROIs innerhalb der Scaffolds.....	46
6.2.2.2. Funktionelle Kapillardichte .....	48
6.2.2.3. Mikrohämodynamik .....	49
6.2.2.4. Reperfundierte Blutgefäße.....	49
6.2.2.5. Angiogenese aus präformierten Blutgefäßen .....	51
6.2.2.6. Inokulation .....	52
6.2.3. Histologie und Immunhistochemie.....	52
<b>7. DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
<b>7.1. Modell .....</b>	<b>58</b>

<b>7.2. Scaffold und Herstellungstechnik.....</b>	<b>59</b>
<b>7.3. Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
7.3.1. Inkorporation von Matrigel in PLGA-Scaffolds .....	60
7.3.2. Inokulation prävascularisierter Scaffolds.....	63
<b>7.4. Ausblick.....</b>	<b>68</b>
<b>8. LITERATUR .....</b>	<b>70</b>

# 1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel des Tissue Engineerings ist die Entwicklung von biologischem Ersatzgewebe, welches die ursprüngliche Gewebefunktion erhalten, wiederherstellen oder verbessern kann. Hierzu werden Biomaterialien als Trägermaterial genutzt, die man als Scaffolds bezeichnet. Diese Scaffolds werden mit Zellen besiedelt und anschließend als Gewebekonstrukte implantiert.

Für den klinischen Erfolg des Tissue Engineerings ist maßgebend, dass in größeren dreidimensionalen Gewebekonstrukten sehr schnell nach Implantation eine adäquate Nährstoffversorgung der Zellen gewährleistet ist. Eine ausreichend schnelle Vaskularisierung ist hierfür eine Grundvoraussetzung. Trotz verschiedener Ansätze ist dies bisher jedoch noch nicht gelungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze zur Verbesserung der frühen Blutperfusion implantierter Scaffolds mit Hilfe des Modells der Rückenhautkammer untersucht. Mit diesem Modell kann man *in vivo* über einen Zeitraum von zwei Wochen mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie wiederholt die entzündliche und angiogene Gewebereaktion auf implantierte Biomaterialien analysieren. Unterstützt wird die *in vivo*-Analyse durch histologische sowie immunhistochemische Untersuchungen.

Im ersten Studienabschnitt wurde untersucht, ob die Vaskularisierung von porösen PLGA-Scaffolds durch Bioaktivierung mittels Inkorporation einer pro-angiogenen Extrazellulärmatrix in Form von Matrigel beschleunigt werden kann. Zu diesem Zweck wurden zunächst *in vitro* die pro-angiogenen Eigenschaften von Wachstumsfaktor-reduziertem (GFRM) sowie Wachstumsfaktor-enthaltendem Matrigel (GFCM) unter Verwendung eines Aortic Ring Assays untersucht. Anschließend wurden die beiden Matrigeltypen in die Poren der PLGA-Scaffolds inkorporiert. Diese wurden im nächsten Schritt in die Rückenhautkammer von Balb/c-Mäusen implantiert und über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen analysiert. Matrigel-freie Scaffolds dienten hierbei als Kontrolle.

Im Aortic Ring Assay stimulierte GFCM die Bildung eines Netzwerkes aus tubulären, gefäßartigen Strukturen mit einer signifikant gesteigerten Sprossfläche und -dichte im Vergleich zu GFRM. Entsprechend beschleunigte und verbesserte GFCM *in vivo* das Einwachsen neuer Blutgefäße in die implantierten Scaffolds, was zur Ausbildung eines reifen Gefäßnetzwerkes führte. Im Vergleich zur Kontrolle sowie den GFRM-Scaffolds wiesen die GFCM-Scaffolds eine gesteigerte funktionelle Kapillardichte auf. Die Analyse der Leu-

kozyten-Endothelzell-Interaktion in Venolen des Empfängergewebes in unmittelbarer Umgebung der Scaffolds zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies belegt, dass die Inkorporation von Matrigel die Biokompatibilität implantierter PLGA-Scaffolds nicht negativ beeinflusst.

Damit konnte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Kombination aus einer pro-angiogenen Extrazellulärmatrix mit soliden Scaffold-Biomaterialien einen neuen Ansatz zur zukünftigen Verbesserung der Vaskularisierung von Gewebekonstrukten darstellt.

Im zweiten Studienabschnitt wurde untersucht, ob die Vaskularisierung implantierter PLGA-Scaffolds durch Inoskulation eines *in situ* präformierten, mikrovaskulären Netzwerkes mit den Blutgefäßen des Empfängergewebes beschleunigt werden kann.

Hierzu wurden PLGA-Scaffolds für 20 Tage in die Flanke von Balb/c oder GFP-transgenen Mäusen implantiert, um *in situ* ein mikrovaskuläres Netzwerk innerhalb der Scaffolds zu generieren. Die prävaskularisierten Scaffolds wurden anschließend in die Rückenhautkammer von syngenen Empfängertieren implantiert, wobei nicht vaskularisierte, leere PLGA-Scaffolds als Kontrolle dienten.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Vaskularisierung der prävaskularisierten Scaffolds verglichen mit Kontroll-Scaffolds signifikant beschleunigt werden konnte. Dies resultierte daraus, dass die Gefäße des *in situ* präformierten, mikrovaskulären Netzwerkes durch Ausbildung von Querverbindungen zur Mikrozirkulation des Empfängertieres rasch reperfundiert wurden. Dabei konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass das Endothel des präformierten mikrovaskulären Netzwerkes seine Integrität behielt.

Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, dass die präformierten Blutgefäße nicht nur als Leitschiene für einwachsende Blutgefäße dienen, sondern selbst Ausgangspunkte für die Entwicklung neuer Blutgefäße darstellen. Zusammenfassend konnte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit somit gezeigt werden, dass die Inoskulation von *in situ* präformierten, funktionsfähigen Blutgefäßen mit der Mikrozirkulation des Empfängergewebes einen vielversprechenden Ansatz darstellt, um die Blutversorgung von implantierten Gewebekonstrukten zu beschleunigen und zu verbessern.

## 2. SUMMARY

The aim of tissue engineering is the generation of biological tissue substitutes, which maintain, restore or improve the function of the original tissue. For this purpose, biomaterials are used as scaffolds. These scaffolds are seeded with cells and subsequently implanted as tissue constructs into the host.

A rapid nutrient supply for the cells in three-dimensional tissue constructs after implantation is crucial for the clinical success of tissue engineering applications. For this purpose, a rapid vascularization of the tissue constructs is a major prerequisite. However, despite the establishment of numerous approaches it is still not possible to induce a sufficient rapid vascularization.

In the present thesis, two novel approaches were analyzed by means of the dorsal skinfold chamber model to improve the early blood perfusion of implanted scaffolds.

The dorsal skinfold chamber model in combination with intravital fluorescence microscopy allows for the repetitive *in vivo* analysis of the inflammatory and angiogenic host tissue response to implanted biomaterials. This *in vivo*-analysis is supported by histological and immunohistochemical examinations.

In the first part of this thesis it was analyzed, whether the vascularization of porous PLGA scaffolds can be accelerated by incorporation of the pro-angiogenic extracellular matrix Matrigel. For this purpose, the pro-angiogenic characteristics of growth factor reduced (GFRM) and growth factor containing Matrigel (GRCM) were investigated *in vitro* by means of an aortic ring assay. Subsequently, the two types of Matrigel were incorporated into the pores of PLGA scaffolds. These scaffolds were then implanted into the dorsal skinfold chamber of Balb/c mice and analyzed over an observation period of 14 days. Matrigel-free scaffolds served as control.

Incubation of the aortic rings in GFCM stimulated the formation of a network of tubular, vessel-like structures with a significantly increased sprout area and density when compared to GFRM. Accordingly, GFCM accelerated and improved the ingrowth of new blood vessels into implanted scaffolds *in vivo*. This resulted in the formation of a network of mature blood vessels. GFCM scaffolds exhibited an increased functional capillary density when compared to controls and GFRM scaffolds. The analysis of leukocyte-endothelial cell interaction in postcapillary venules of the host tissue in close vicinity to the scaffolds did not show any significant differences between the groups. This indicates, that incorporation of Matrigel does not affect the good biocompatibility of implanted PLGA scaffolds.

Accordingly, the first part of this thesis demonstrates that the combination of pro-angiogenic extracellular matrices with solid scaffold biomaterials represents a novel approach to accelerate and improve vascularization of tissue engineering constructs.

In the second part of this thesis it was analyzed, whether the blood supply of implanted scaffolds can be accelerated by inosculation of an *in situ* preformed microvascular network with the host microvasculature. For this purpose, PLGA scaffolds were implanted into the flank of balb/c or GFP-transgenic mice for 20 days to create a new microvascular network within the scaffolds. The prevascularized scaffolds were then transferred into the dorsal skinfold chamber of isogenic recipient mice. Non-vascularized PLGA scaffolds served as controls.

Vascularization of prevascularized scaffolds was significantly accelerated and improved when compared to controls, because the *in situ*-preformed microvessels were reperfused by forming interconnections to the host microvasculature. Further immunohistochemical analyses showed that the endothelium of the preformed microvascular network could maintain its integrity.

The preformed blood vessels not only served as connection for ingrowing new blood vessels, but were additionally capable of originating angiogenic sprouting.

Taken together, the second part of the present thesis demonstrates that inosculation of *in situ* preformed, functional blood vessels with the microcirculation of the host tissue represents a promising approach to improve and accelerate the blood supply of implanted tissue constructs.

### 3. EINLEITUNG

Die Anzahl an Organen, die für eine Transplantation zur Verfügung stehen, wird von der Anzahl der Patienten, die eine solche Operation benötigen, um ein Vielfaches überschritten. So waren im Jahr 2006 im Einzugsgebiet von Eurotransplant 26 485 Patienten auf den Wartelisten für ein Organ gemeldet, während jedoch nur 6683 Organe für Transplantationen zur Verfügung standen (Oosterlee, 2007). Zusätzlich zu Organen werden aber auch variable Mengen von unterschiedlichen Ersatzgeweben benötigt, die zur Auffüllung von Gewebedefekten eingesetzt werden können.

Der Mangel an Ersatzgeweben und Spenderorganen führte zum Tissue Engineering. Erstmals definiert wurde dieser Begriff 1987 von der National Science Foundation als interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches die Methoden der Biowissenschaften, Materialwissenschaften und klinischen Forschung mit dem Ziel vereint, biologisches Ersatzgewebe zu generieren, um die Gewebefunktion wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern (Langer et al., 1993).

Um lebendes Gewebe *in vitro* zu züchten, werden isolierte Zellen in Kultur vermehrt und anschließend auf ein bioaktives, abbaubares Trägermaterial, ein sogenanntes Scaffold, transferiert. Auf diese Weise wird ein dreidimensionales Ersatzgewebe, bestehend aus Zellen und Biomaterial, geschaffen. Dieses wird auch als Gewebekonstrukt bezeichnet (Griffith, 2000). Das Ziel dabei ist die Herstellung bioartifizieller Produkte wie z.B. Haut-, Knochen-, Knorpel- und Gefäßersatz. Aber auch der Ersatz ganzer Organe, welche anschließend in den Patienten implantiert werden können, ist durchaus denkbar.

Im Bereich des Tissue Engineerings konnten in den letzten Jahren bereits beachtliche Erfolge erzielt und erste gezüchtete Gewebe wie Haut (Kremer et al., 2000; Liu et al., 2007), Knorpel (Vacanti et al., 1994; Dragoo et al., 2007) und Gefäße (Matsumura et al., 2006) in die klinische Praxis eingeführt werden. Allerdings sind diese Gewebetypen verhältnismäßig simpel strukturiert. Knorpel ist avaskulär und hat einen metabolisch geringen Anspruch. Gezüchtete Haut und Gefäße sind dünn und können nach Implantation durch Sauerstoff- und Nährstoffdiffusion aus der Umgebung ernährt werden. Im Gegensatz dazu ist die künstliche Herstellung von Geweben mit einer komplexen dreidimensionalen Struktur wie Knochen- (Salgado et al., 2004), Fett- (Dolderer et al., 2007; Patrick, 2004), Muskel- (Deasy et al., 2004), Leber- (Jiang, 2004) und Nervengewebe (Lundborg, 2004) ungleich schwieriger.

Die Auswahl eines geeigneten Scaffolds ist essentiell für den Erfolg des Tissue Engineerings. Dieses muss eine Vielzahl von Anforderungen erfüllen. Durch das Trägermaterial sollten nach Implantation temporär die mechanischen Eigenschaften des zu ersetzenden Gewebes übernommen werden. Weiterhin sollte das Scaffold in der Geschwindigkeit abbaubar sein, in welcher das Ersatzgewebe seine Funktion im Körper übernimmt (Hollister, 2005). Nach Abbau des Scaffolds besteht der aufgefüllte Defekt dann idealerweise komplett aus dem gewünschten Gewebe (Agrawal et al., 2001). Zusätzlich muss das Scaffold über eine gute Biokompatibilität verfügen. Es soll weder eine Entzündungs- noch eine Fremdkörperreaktion hervorrufen und gut in das Empfängergewebe integriert werden (Helenius et al., 2006). Zudem sollte die Möglichkeit bestehen, das Material durch Oberflächenbeschichtungen oder Integration von Biomolekülen zu aktivieren, um nach der Implantation ein schnelleres Einwachsen von Zellen in das Scaffold zu ermöglichen.

Als Scaffolds können natürlich vorkommende Materialien wie Kollagen (Freyman et al., 2001), Alginat (Marijnissen et al., 2002) oder auch azelluläre Dermis und Submukosa des Dünndarms eingesetzt werden (Hodde, 2002). Daneben werden eine Vielzahl von synthetischen Materialien wie Polyurethan (Laschke et al., 2009) oder Kalzium-Phosphat-Verbindungen (Rücker et al., 2008) zur Herstellung von Scaffolds verwendet.

Ein Material, das bereits im Bereich des muskuloskelettalen Tissue Engineerings Anwendung findet und diesem Anforderungsprofil weitgehend gerecht wird, ist das Biopolymer Poly-D,L-Lactid-co-Glycolsäure (PLGA) (Kanczler et al., 2008). Dieses besteht aus Polylactidsäure (PLA) und Polyglycolsäure (PGA). PLA und PGA sind aliphatische Polyester, die über eine ähnliche Molekülstruktur verfügen. Der einzige Unterschied besteht darin, dass PLA eine endständige Methylgruppe aufweist, was zu einer veränderten Degradationskinetik führt. Beide Substanzen werden hydrolytisch in ihre Monomere gespalten. PGA kann zusätzlich durch unspezifische Esterasen und Carboxypeptidasen zerlegt werden. Dies führt dazu, dass die Abbaurate des Copolymers PLGA durch das exakte Verhältnis von PLA zu PGA steuerbar ist. Somit kann es den Erfordernissen entsprechend angepasst werden (Miller et al., 1977).

Die Architektur eines Scaffolds stellt einen weiteren entscheidenden Faktor für dessen erfolgreichen Einsatz beim Tissue Engineering dar. Idealerweise besteht ein Scaffold aus einem Netzwerk mit zueinander in Kontakt stehenden Poren, die eine ungestörte Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff zulassen. Dabei muss ein Kompromiss zwischen

Porosität und mechanischer Stabilität gefunden werden. Eine hohe Porosität führt zu einem verbesserten Verhältnis von Scaffold-Oberfläche zu Volumen. Dadurch steht nach Besiedlung mit Zellen *in vitro* ausreichend Platz für die Bildung einer entsprechenden extrazellulären Matrix zur Verfügung, was *in vivo* ein schnelles Einwachsen von Gewebe erlaubt (Kim et al., 1998). Für eine spätere klinische Anwendung ist es weiterhin von Bedeutung, dass ein Scaffold in jeder erforderlichen Form hergestellt werden kann, um dreidimensionale Gewebedefekte optimal auszufüllen. Dabei stehen eine Vielzahl von Produktionsmethoden zur Herstellung von porösen Scaffolds zur Verfügung, wie beispielsweise die Gassättigungstechnik (Nam et al., 2000), die Flüssiggießtechnik (Widmer et al., 1998), die Partikelwaschtechnik (Mikos et al., 1994) oder die Faserbindungstechnik (Mikos et al., 1994). Bei diesen Techniken ist die Porengröße jedoch sehr heterogen und kann nur näherungsweise durch einen Mittelwert angegeben werden. Im Gegensatz dazu kann bei der Rapid-Prototyping-Technik mit Hilfe eines 3D-Bioplotters die Porengröße sehr exakt eingestellt und Scaffolds mit annähernd gleicher Porengröße und jeder beliebigen Form hergestellt werden (Landers et al., 2002). In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die schnelle Integration eines Scaffolds in das Empfängergewebe nach Implantation entscheidend von dessen Porengröße abhängt (Druecke et al., 2004). So konnten die besten Ergebnisse bezüglich des Einwachsens neuer Gefäße in Scaffolds bei einer Porengröße von 250-300  $\mu\text{m}$  erzielt werden.

Der Erfolg des Tissue Engineerings ist nicht nur vom Wachstum und der Funktion der organ- oder gewebespezifischen Zellen auf dem Trägermaterial, sondern vor allem von einer schnellen und ausreichenden Vaskularisierung der Gewebekonstrukte abhängig. Diese ist essentiell für das Überleben und die Langzeitfunktion größerer Implantate, da sie einen vermehrten Gewebeuntergang während der ersten Tage nach der Implantation verhindert (Laschke et al., 2006). So ist der Transport von Blut und Nährstoffen aus den Blutgefäßen der Umgebung eines implantierten Gewebekonstrukts auf eine Diffusionsstrecke von  $\sim 150\text{-}200\ \mu\text{m}$  begrenzt, wodurch nur Zellen auf der Oberfläche der Implantate versorgt werden können, nicht jedoch Zellen im Zentrum größerer Konstrukte (Folkman et al., 1973; Colton, 1995). Entsprechend ist die schnelle Ausbildung eines neuen, mikrovaskulären Netzwerkes innerhalb von größeren, künstlichen Gewebekonstrukten eine wesentliche Voraussetzung für die breite Einführung von Tissue Engineering-Produkten in die klinische Praxis (Borges et al., 2003). Um effektive Vaskularisierungsstrategien für Gewebekonstrukte etablieren zu können, sind genaue Kenntnisse über den Prozess der Angiogenese notwendig.

Angiogenese ist definiert als die Bildung neuer Gefäße aus vorbestehenden Blutgefäßen und stellt einen komplexen dynamischen Prozess dar. Dieser ist charakterisiert durch eine koordinierte Abfolge von humoralen und zellulären Interaktionen (Risau, 1997; Carmeliet, 2000). In einem ersten Schritt werden Endothelzellen durch Wachstumsfaktoren aktiviert und beginnen, ihre umliegende Basalmembran durch Expression und Freisetzung von Metalloproteinasen zu degradieren, was morphologisch mit einer Zunahme des Gefäßdurchmessers einhergehen kann. Anschließend erfolgt die Migration der Endothelzellen ins Interstitium und es kommt zur Bildung von Gefäßknospen und -sprossen. Die nachfolgenden Endothelzellen proliferieren, was zu einem Längenwachstum der neu entstehenden Blutgefäße führt. Zur Stabilisierung der neuen Gefäßwand werden andere Zellarten wie glatte Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten rekrutiert. Diese produzieren die Bestandteile der extrazellulären Matrix (Risau, 1997). All diese Schritte sind durch die Interaktion von spezifischen Molekülen wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren streng reguliert (Patan, 2004).

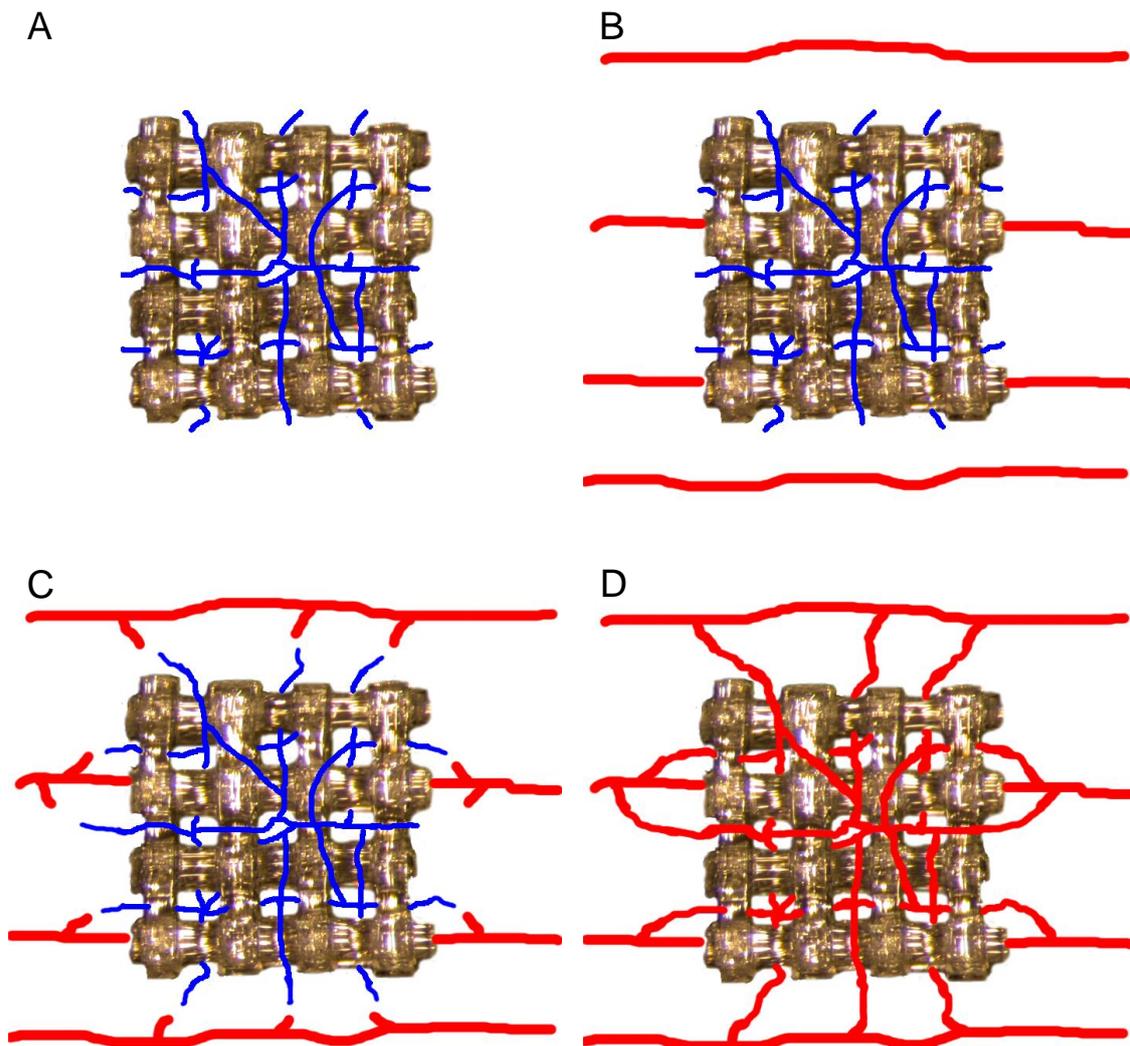
Beim Erwachsenen ist die Angiogenese ein physiologischer Prozess, der auf die weiblichen Reproduktionsorgane beschränkt ist (Reynolds et al., 1992). Ansonsten ist die Bildung neuer Blutgefäße charakteristischerweise mit pathologischen Vorgängen wie z.B. Tumorwachstum (Folkman, 1985), Retinopathien (Adamis et al., 1994), rheumatoider Arthritis (Peacock et al., 1992) und Entzündung (Jones et al., 1999) assoziiert. Auch bei der Wundheilung und Geweberegeneration (Dvorak, 1986) spielt die Angiogenese eine Schlüsselrolle.

Derzeit werden verschiedene Ansätze untersucht, um das Einwachsen neuer Blutgefäße in größere Gewebekonstrukte zu beschleunigen und zu verbessern. Hierzu zählt die Modifikation der Materialarchitektur und der chemischen Zusammensetzung von synthetischen Scaffolds (Sung et al., 2004; Rücker et al., 2006). Zudem wird versucht, das Einwachsen und Reifen neuer Blutgefäße in Gewebekonstrukten durch die Bioaktivierung von Scaffolds zu stimulieren. Zu diesem Zweck können Wachstumsfaktoren mit Polymerpartikeln vermischt werden, bevor das Polymer in die endgültige poröse Scaffoldform gebracht wird. Alternativ kann die Oberfläche der Scaffolds durch Beschichtung mit Substraten, welche Wachstumsfaktoren enthalten, modifiziert werden (Schmidmaier et al., 2001). Weiterhin besteht die Option, Proteine in Mikrosphären einzukapseln, die dann in die Scaffoldporen eingebracht werden (Perets et al., 2003; Ennett, 2006; Nillesen et al., 2007).

Eine weitere Möglichkeit ist es, ein Substrat in die Scaffoldporen zu inkorporieren, welches eine Kombination aus verschiedenen Wachstumsfaktoren und Elementen der extrazellulären Matrix enthält. Bei diesem Ansatz können beide Bestandteile synergistisch wirken, um die jeweiligen Schritte der Angiogenese optimal zu unterstützen (Rophael et al., 2007). Ein solches Substrat ist Matrigel (Laschke et al., 2007b). Matrigel wird aus Englebreth-Holm-Swarm-Tumoren gewonnen. Bei diesem Tumor handelt es sich um einen mesenchymalen Tumor der Maus, der besonders reich an Molekülen der extrazellulären Matrix ist. Matrigel ist ein lösliches und steriles Extrakt aus Proteinen der Basalmembran dieses Tumors. Die aufbereitete Lösung ist in gekühltem Zustand flüssig und formt bei 37°C ein stabiles Gel. Seit Entdeckung in den 80er Jahren wurde Matrigel bei einer Vielzahl von Studien eingesetzt (Kleinman et al., 2005; Nicosia et al., 1995). *In vitro* unterstützt es die Zellmorphogenese und -differenzierung und wird benutzt, um die Invasivität von Tumorzellen zu analysieren. *In vivo* wird es unter anderem in Angiogenese-Assays und zur Verbesserung des Überlebens von Transplantaten benutzt. Neben den Proteinen der extrazellulären Matrix, die alleine schon Angiogenese induzieren können (Krishnan et al., 2007) enthält Matrigel eine Kombination von verschiedenen pro-angiogenen Wachstumsfaktoren. Hierzu zählen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) und Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Matrigel steht in zwei verschiedenen Varianten zur Verfügung, welche sich in der Konzentration der enthaltenen Wachstumsfaktoren unterscheiden. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Inkorporation dieser beiden Matrigeltypen in die Poren von PLGA-Scaffolds die Angiogenese und damit die Vaskularisierung von Gewebekonstrukten beschleunigen kann.

Die Inkorporation einer pro-angiogenen extrazellulären Matrix in Scaffolds stellt lediglich einen Ansatz dar, um die Angiogenese in dem die Scaffolds umgebenden Empfängergerewebe zu stimulieren. Darüber hinaus können Scaffolds mit Stammzellen oder endothelialen Progenitorzellen besiedelt werden, um von deren Eigenschaft zu profitieren, direkt neue Gefäße auszubilden (Shepherd et al., 2006; Lees et al., 2007; Smiler et al., 2007). Trotz all dieser Ansätze ist es bisher jedoch nicht gelungen, eine ausreichend schnelle Vaskularisierung von Scaffolds zu induzieren, um eine adäquate zelluläre Sauerstoffversorgung während der ersten Tage nach Implantation zu gewährleisten.

Eine mögliche alternative Strategie könnte es sein, ein intrinsisches mikrovaskuläres Netzwerks innerhalb eines Scaffolds *in vitro* oder *in situ* zu generieren (Tremblay et al., 2005).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Inoskulation eines prävascularisierten Scaffolds, das auf die quergestreifte Muskulatur einer Rückenhautkammerpräparation implantiert wird. **A:** Das Scaffold ist prävascularisiert (blau: Gefäße innerhalb des Scaffolds). **B:** Das Scaffold wird auf die quergestreifte Muskulatur gelegt (rot: Gefäße der quergestreiften Muskulatur des Empfängertieres). **C:** Die Gefäße des Empfängertieres und die präformierten Gefäße innerhalb des Scaffolds wachsen aufeinander zu. **D:** Nach Zusammenwachsen der Gefäße erhalten die präformierten Gefäße innerhalb des Scaffolds Anschluss an die Mikrozirkulation des Empfängergewebes.

In diesem Falle könnte das präformierte mikrovaskuläre Netzwerk nach Implantation des Scaffolds inoskulieren. Dies bedeutet, dass sich Querverbindungen zwischen den präformierten Blutgefäßen und den Blutgefäßen des Empfängergewebes ausbilden, was zu einer sehr schnellen Perfusion des gesamten Gewebekonstrukts führen würde (Shepherd et al., 2004) (Abbildung 1). Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte diese Hypothese geprüft werden. Hierzu wurde zunächst *in situ* ein voll funktionsfähiges mikrovaskuläres Netzwerk in PLGA-Scaffolds durch Implantation in die Flanke von Mäusen generiert. Anschließend wurden diese prävascularisierten Scaffolds vorsichtig exzidiert und in die Rückenhaut-

kammer von Empfänger-mäusen implantiert, um Inoskulation, Angiogenese und Vaskularisierung innerhalb der Konstrukte mit Hilfe der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zu analysieren.

## 4. ZIEL DER STUDIE

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurden *in vivo* verschiedene Strategien untersucht, die zu einer verbesserten Vaskularisierung implantierter PLGA-Scaffolds für das Tissue Engineering führen können.

Im ersten Teil der Arbeit wurde zunächst *in vitro* das angiogene Potential zweier Matrigeltypen (Wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel (GFRM) und Wachstumsfaktor-enthaltendes Matrigel (GFCM)) mit Hilfe eines Aortic Ring Assays untersucht. Anschließend wurden die Matrigele in poröse PLGA-Scaffolds inkorporiert, welche dann in die Rückenhautkammer von Empfängertieren implantiert wurden. Dort wurde die Vaskularisierung und Gewebeverträglichkeit der Konstrukte im Vergleich zu leeren Kontroll-Scaffolds analysiert.

Im zweiten Teil der Studie wurde untersucht, ob die Blutversorgung implantierter Scaffolds durch Inoskulation eines *in situ* präformierten, mikrovaskulären Netzwerkes innerhalb der Scaffolds mit den Blutgefäßen des Empfängergewebes beschleunigt werden kann. Zu diesem Zweck wurden PLGA-Scaffolds für 20 Tage in die Flanke von Balb/c oder GFP-transgenen Mäusen implantiert, um so *in situ* die Ausbildung eines neuen, mikrovaskulären Netzwerkes innerhalb der Scaffolds zu erreichen. Anschließend wurden die prävaskularisierten Scaffolds exzidiert und in die Rückenhautkammer von syngenen Empfänger-mäusen implantiert, um dort mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie deren Inoskulation und Vaskularisierung zu untersuchen. Leere PLGA-Scaffolds ohne präformierte Blutgefäße dienten als Kontrolle.

Bei den Untersuchungen wurde auf folgende Fragestellungen näher eingegangen:

1. Kann durch die Inkorporation von Matrigel in die Poren von PLGA-Scaffolds eine verbesserte Vaskularisierung erreicht werden?
2. Ist die Kombination aus PLGA und Matrigel biokompatibel?
3. Ist der Unterschied der Wachstumsfaktorkonzentrationen der verschiedenen Matrigeltypen (GFRM und GFCM) für die Vaskularisierung implantierter Scaffolds relevant?

4. Bilden sich nach Implantation eines prävaskularisierten Scaffolds in die Rücken-  
hautkammer Querverbindungen zwischen den präformierten Gefäßen des Implan-  
tats und den Gefäßen des Empfängergewebes aus und beschleunigt dies die  
Vaskularisierung des Scaffolds?
5. Behält das Endothel des präformierten Mikrogefäßnetzwerkes seine Funktion und  
Integrität bei oder dient es lediglich als Leitstruktur für einwachsende Gefäße aus  
dem Empfängergewebe?
6. Können die präformierten Gefäße selbst durch angiogenes Aussprossen Ursprung  
neuer Gefäße sein und dadurch die Kapillardichte im Zentrum der Gewebekonstrukte  
zusätzlich steigern?

## 5. MATERIAL UND METHODIK

### 5.1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden Balb/c-Mäuse bzw. C57BL/6-Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) sowie GFP-transgene Tiere (C57BL/6-TgN(ACTbEGFP)-c1Osb; The Jackson Laboratory, Maine, USA) verwendet. Sämtliche Tiere hatten ein Alter von 12-16 Wochen und wogen 22-25 g. Während der Versuche wurden die Tiere in einem klimatisierten Raum bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus unter Bereitstellung von Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser *ad libitum* in Einzelkäfigen gehalten.

Für die Durchführung der Aortic Ring Assays dienten 200 g schwere Sprague-Dawley-Ratten (Charles River) als Spendertiere.

Die Versuche wurden nach Genehmigung durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz in Übereinstimmung mit dem nationalen Tierschutzgesetz durchgeführt.

### 5.2. Tierexperimentelles Modell

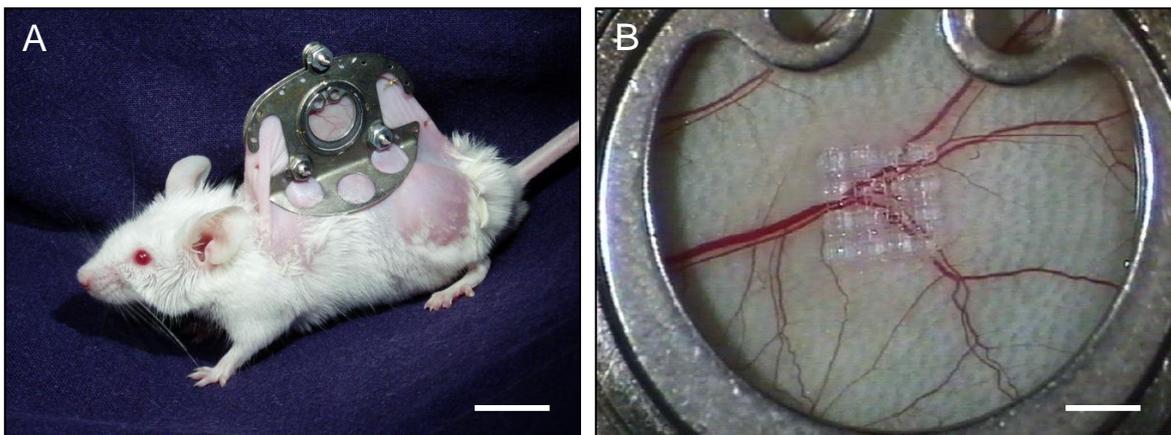
#### 5.2.1. Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer

Als tierexperimentelles Modell zur Untersuchung der Vaskularisierung implantierter PLGA-Scaffolds diente das Modell der Rückenhautkammer der Maus (*Abbildung 2*). Dieses Modell stellt ein etabliertes Modell für *in vivo* Mikrozirkulationsstudien dar.

Ursprünglich entwickelte Sandison (1928) als erster ein Modell, welches es erlaubte, mittels einer transparenten Beobachtungskammer und intravitaler Mikroskopie die Mikrozirkulation am Kaninchenohr zu analysieren. Dieses Modell wurde fortlaufend weiterentwickelt. Basierend auf der Arbeit von Algire (1943) und Papenfuss et al. (1979) etablierten Endrich et al. (1980) das Modell der Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster. Inzwischen wurde die Originalkammer miniaturisiert, so dass sie auch bei Mäusen implantiert werden kann (Lehr et al., 1993; Leunig et al., 1992).

Nach Präparation einer Rückenhautkammer in der Dorsalfalte des Versuchstieres dient die quergestreifte Muskulatur in Form des Musculus panniculus carnosus als Empfänger-

gewebe für die Implantation von Gewebetransplantaten oder Biomaterialien. Durch intravenöse Gabe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe kann dabei mittels Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie sowohl die gesamte Mikrozirkulation der freipräparierten Rückenhautmuskulatur als auch die Ausbildung neuer Blutgefäße untersucht werden. Durch die Möglichkeit der repetitiven Untersuchung bietet dieses Modell gegenüber anderen Mikrozirkulationsmodellen den Vorteil, dass die Ausbildung neuer Blutgefäße schrittweise über einen Zeitraum von 2-3 Wochen verfolgt und unter anschließender Nutzung eines Bildverarbeitungssystems quantifiziert werden kann.



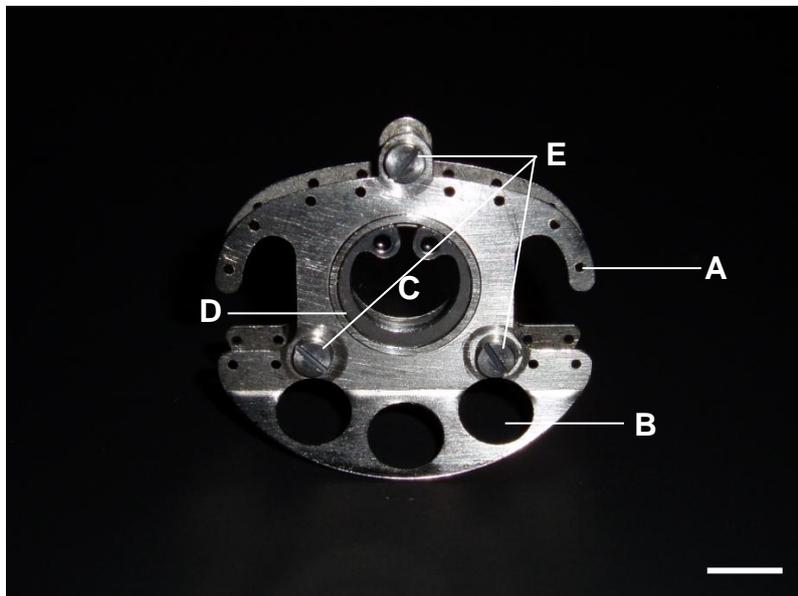
**Abbildung 2:** **A:** Balb/c Maus (Gewicht: 22 g; Alter: 12 Wochen) nach Implantation einer Rückenhautkammer. **B:** Im Beobachtungsfenster sind die Blutgefäße der Haut und des quergestreiften Hautmuskels zu erkennen, auf den ein PLGA-Scaffold implantiert wurde. Maßstab: A = 1,25 cm; B = 1,3 mm.

### 5.2.2. Präparation der Rückenhautkammer

Zur Präparation der Rückenhautkammer wurde das Versuchstier durch intraperitoneale Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg; Ketavet, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) sowie Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg; Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Im Anschluss erfolgte die Entfernung des Fells durch Elektrorasur (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und anschließende chemische Depilation (Plica med Creme; Asid Bonz, Böblingen, Deutschland). Nach Reinigung der enthaarten Rückenhaul mit warmen Wasser und Desinfektion mit 70%-igem Alkohol konnte mit der eigentlichen Präparation begonnen werden.

Zunächst wurde die elastische Rückenhautfalte des in Bauchlage liegenden Tieres angehoben und entlang ihrer Mittellinie mit zwei Haltefäden aufgespannt. Dann wurde die Rückseite der aus zwei symmetrischen Titan-Rahmen zusammengesetzten Rückenhautkammer (*Abbildung 3*) unter Gegenlichtkontrolle an ihrem Oberrand mit zwei Haltefäden

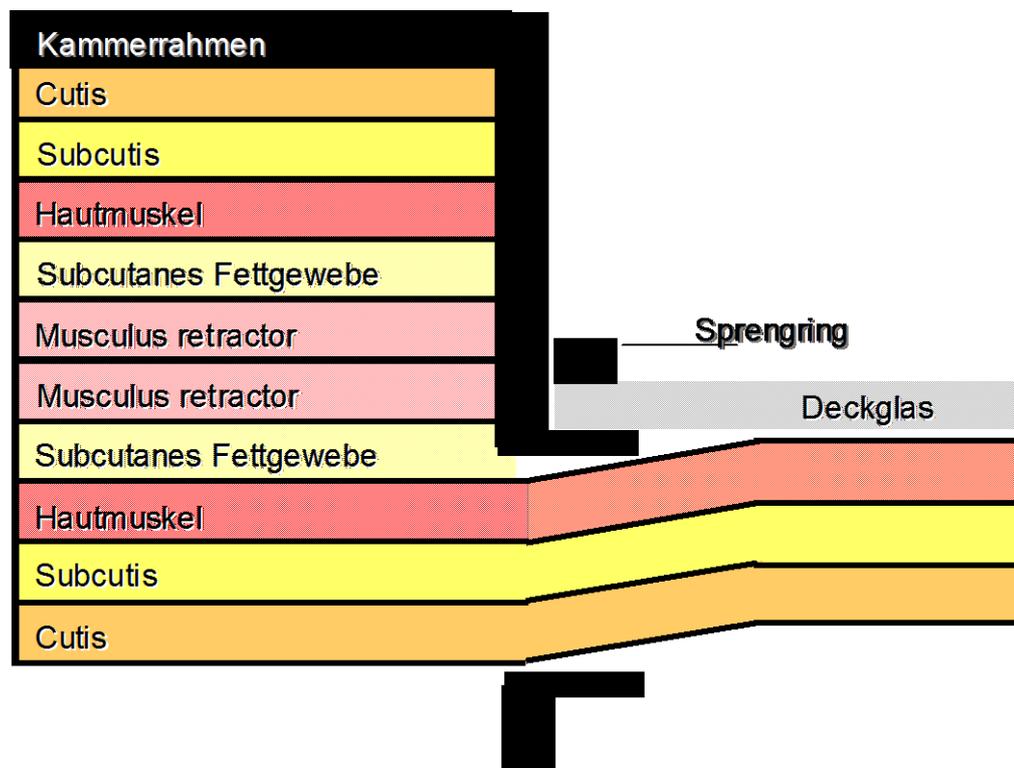
befestigt. Anschließend wurden mittels eines Skalpell zwei kleine Inzisionen im basalen Bereich der Rückenhautfalte als Durchtrittsstelle für die beiden unteren Schrauben des Kammerrahmens geschaffen. Hierbei wurde darauf geachtet, die beiden Hauptgefäßstämme der Rückenhaut nicht zu verletzen. Nach Befestigung der Rückseite der Kammer wurde unter Gegenlichtkontrolle eine runde Markierung im Bereich des späteren Beobachtungsfensters mit einem Durchmesser von ca. 15 mm auf die Haut gezeichnet (Skin-Marker; Ratio-Med, Lilienthal, Deutschland). Beim nächsten Schritt wurden die Haltefäden entfernt und das Versuchstier in Seitenlage auf dem Operationstisch so positioniert, dass die aufgespannte Hautfalte nach oben und die Kammerrückseite nach unten zeigten. Der rückseitige Rahmen wurde mit zwei auf die Verbindungsschrauben aufgesetzten Klemmen fixiert.



**Abbildung 3:** Fotografie einer fertig montierten Rückenhautkammer für die Maus, die aus zwei symmetrisch konstruierten Titanrahmen zusammengesetzt ist (Gewicht: 2,2g); **A:** Bohrung für Fixationsfäden; **B:** Materialaussparung zur Gewichtsreduktion; **C:** Beobachtungsfenster mit Deckglas; **D:** Sprengung zur Fixation des Deckglases; **E:** Bohrung mit Verbindungsschrauben. Maßstab: 0,6 cm.

Mit mikrochirurgischen Instrumenten und unter Zuhilfenahme eines Stereo-Operationsmikroskops (Wild M650; Leitz, Heerbrugg, Schweiz) konnten so im vormarkierten Bereich des späteren Sichtfensters die oberliegende Cutis, inklusive Subcutis mit quergestreiftem Hautmuskel sowie die beiden Schichten des Retraktormuskels samt subcutanem Fettgewebe entfernt werden (*Abbildung 4*). Die ausgeschnittene zirkuläre Fläche von 15 mm Durchmesser war größer als die eigentliche Fläche des späteren Beobachtungsfensters (Durchmesser: 10 mm). Hierdurch wurde eine Schädigung der Mikrozirkulation durch Gewebekompression nach Anbringen des Kammervorderrahmens ver-

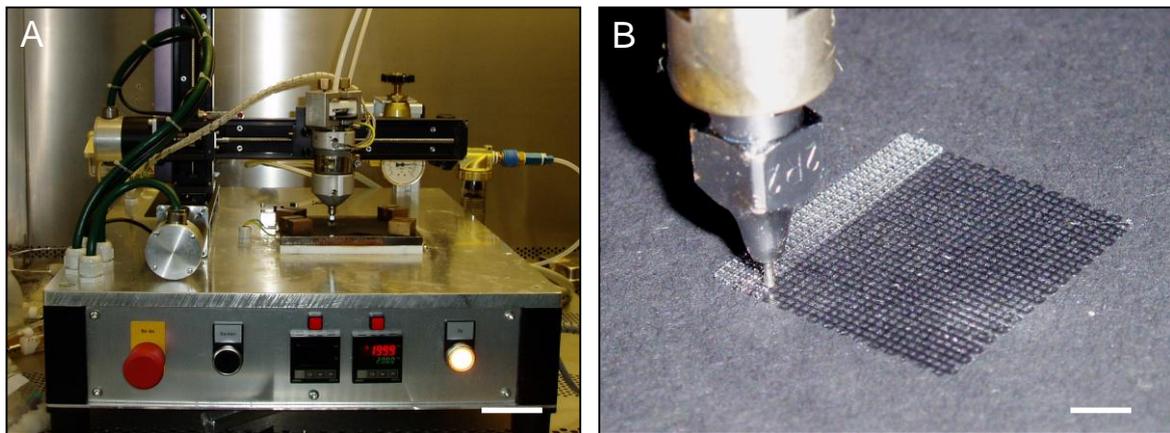
hindert. Nach Spülung der aus gegenüberliegendem quergestreiften Hautmuskel, Subcutis und Cutis bestehenden verbleibenden Schichten mit Elektrolytlösung wurde der Vorderrahmen auf den Verbindungsschrauben positioniert und mittels Stahlmuttern befestigt. Als Abstandshalter zwischen den beiden Titan-Rahmen dienten ebenfalls rostfreie Stahlmuttern, welche vor dem Montieren des Vorderrahmens auf die Verbindungsschrauben gedreht wurden. Durch diese Maßnahme wurde ein Rahmenabstand von 400-500 µm gewährleistet. Anschließend konnte das Deckglas des Beobachtungsfensters durch Adhäsion auf den freipräparierten Hautmuskel aufgebracht werden. Die Sicherung des Deckglases erfolgte durch einen Sprengring im Rahmen der Kammervorderseite. Das erneute Entfernen des Sprengringes und Anheben des Deckglases ermöglichte so während der gesamten Versuchsdauer freien Zugang zum Beobachtungsfeld. Abschließend erfolgte die Fixierung des Oberrandes des vorderen Titanrahmens durch einen 5.0 Seidenfaden an der aufgestellten Hautfalte. Nach der Implantation der Kammer konnten sich die Tiere für 48 Stunden von der Narkose und dem chirurgischen Trauma erholen, bevor der Versuch fortgesetzt wurde.



**Abbildung 4:** Schematischer Querschnitt einer Rückenhautkammer nach Präparation.

### 5.2.3. Herstellung von PLGA-Scaffolds

Die in dieser Arbeit verwendeten PLGA-Scaffolds wurden in Zusammenarbeit mit dem Freiburger Materialforschungszentrum hergestellt. Die Produktion erfolgte unter Verwendung eines 3D-Biplotters (*Abbildung 5*) nach den von Carvalho et al. (2005) beschriebenen Methoden. Hierzu wurde PLGA-Granulat (Resomer 824; Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) mit einem molaren Anteil von Lactid zu Glycolsäure von 80:20 verwendet. Das Rohmaterial wurde bei 180°C in einer Glasspritze in dem erhitzbaren Materialspender des 3D-Biplotters geschmolzen. Die Spitze des Dispensers bewegte sich zur Herstellung der Scaffolds in allen drei Raumrichtungen (x/y-Geschwindigkeit: 300 mm/min, z-Geschwindigkeit: 200 mm/min).



**Abbildung 5:** **A:** Übersichtsaufnahme des 3D-Biplotters zur Herstellung von PLGA-Scaffolds (Materialforschungszentrum Freiburg). **B:** Detailaufnahme des Materialdispensers beim Gießen eines Scaffolds. Maßstab: A = 7 cm; B = 6 mm.

Die Gussrichtung jeder neuen Lage wurde um 90° gewechselt. Die Steuerung des 3D-Biplotters erfolgte durch die Software PRIMCAM (PRIMUS DATA, Einsiedeln, Schweiz). Insgesamt bestanden die Scaffolds aus einem vierlagigen Gitternetzwerk. Nach dem Gießen erfolgte die Plasmasterilisation der Scaffolds. Vor Implantation in die Kammer wurde das Material unter sterilen Bedingungen auf eine Größe von ca. 3 mm x 3 mm geschnitten.

### 5.2.4. Matrigel und dessen Inkorporation in PLGA-Scaffolds

Mit dem Ziel, die Vaskularisierung implantierter Scaffolds zu verbessern und zu beschleunigen, wurde in einem Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit die pro-angiogene Extrazellulärmatrix Matrigel in die Scaffoldporen inkorporiert (*Abbildung 6*).

Die Substanz wird aus Englebreth-Holm-Swarm-Tumoren gewonnen. Bei dem Tumor handelt es sich um einen mesenchymalen Tumor der Maus, welcher reich an Molekülen der extrazellulären Matrix sowie Wachstumsfaktoren ist. Matrigel ist ein steriles und lösliches Extrakt, das aus der Basalmembran dieses Tumors gewonnen wird und in gekühltem Zustand flüssig ist. Bei 37°C formt es ein stabiles Gel.

Für die Inkorporationsversuche sowie den Aortic Ring Assay wurden zwei verschiedene Typen von Matrigel mit unterschiedlichen Wachstumsfaktorkonzentrationen verwendet (GFRM und GFCM; Matrigel™ Matrix; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

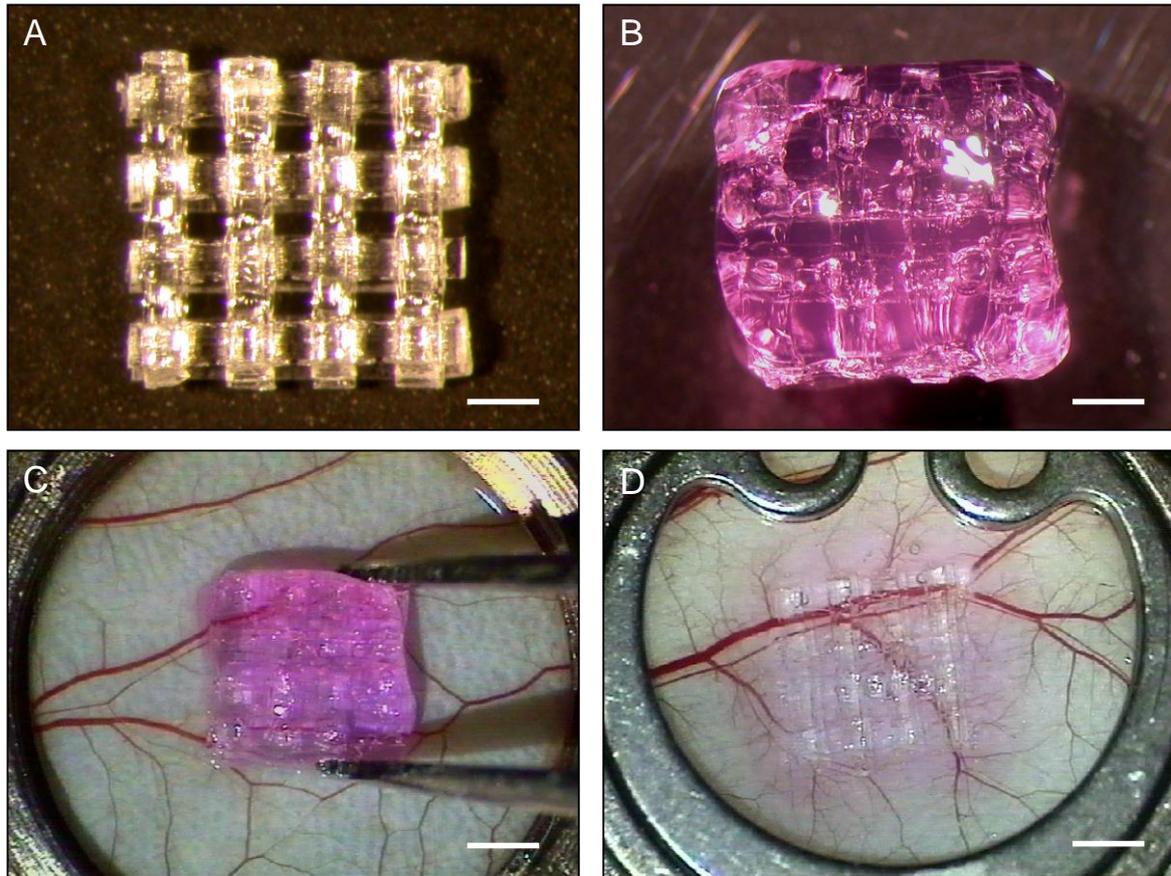
Die zwei Matrigeltypen unterscheiden sich gemäß Herstellerangaben zwar nur geringgradig in der Zusammensetzung der Extrazellulär-matrix, jedoch deutlich in der Konzentration der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (*Tabelle 1*).

*Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix und durchschnittlicher Gehalt an Wachstumsfaktoren der beiden Matrigeltypen nach Herstellerangaben*

	GFRM	GFCM
Komponenten der extrazellulären Matrix (%):		
Laminin	61	56
Kollagen IV	30	31
Entaktin	7	8
Konzentration von Wachstumsfaktoren:		
VEGF (ng/ml)	1,25	6
PDGF (pg/ml)	<5	12
EGF (ng/ml)	5	16
IGF-1 (ng/ml)	5	16
TGF-β (ng/ml)	1,7	2,3
NGF (ng/ml)	<0,2	n.m.
bFGF	n.b.	n.m.

**Tabelle 1:** VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor; PDGF = Platelet-Derived Growth Factor; EGF = Epidermal Growth Factor; IGF-1 = Insulin-Like Growth Factor 1; TGF-β = Transforming Growth Factor; NGF = Nerve Growth Factor; bFGF = Basic Fibroblast Growth Factor; n.m. = nicht messbar, n.b. = nicht bestimmt.

Unter sterilen Bedingungen wurden die zugeschnittenen PLGA-Scaffolds (ca. 3 mm x 3 mm x 1 mm) in flüssiges Matrigel eingebettet. Zu diesem Zweck wurden je 180 µl 10°C kaltes flüssiges GFRM oder GRCM pro Scaffold in die vorgestanzten Umrandungen eines auf Eis liegenden Deckels einer 48-Loch-Gewebekulturplatte pipettiert.



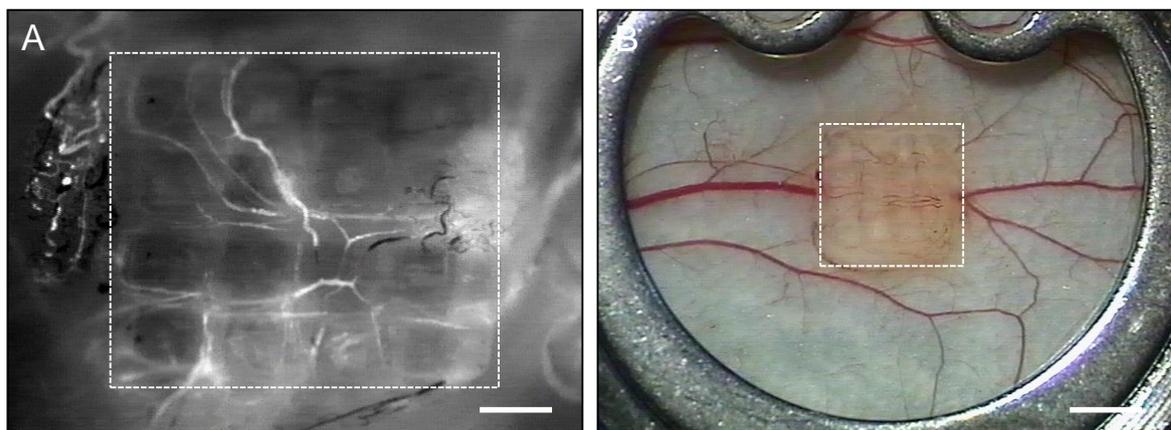
**Abbildung 6:** Inkorporation von Matrigel in ein PLGA-Scaffold und anschließende Implantation in die Rückenmarkskammer. **A:** Zugeschnittenes PLGA-Scaffold. **B:** Mit Matrigel beladenes Scaffold. **C:** Implantation eines mit Matrigel beladenen Scaffolds in die geöffnete Rückenmarkskammer. **D:** Implantiertes Scaffold in geschlossener Rückenmarkskammer. Maßstab: A, B = 625  $\mu\text{m}$ ; C, D = 1,25 mm.

Anschließend wurde je ein Scaffold vorsichtig in das flüssige Matrigel eingebettet, so dass die Flüssigkeit in alle Poren des Scaffolds gelangen konnte. Nach diesem Schritt wurde der vorher auf Eis liegende Deckel der Gewebekulturplatte für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, damit das Matrigel polymerisieren konnte. Anschließend wurden die Scaffolds mit einem Skalpell aus dem polymerisierten Gel herausgeschnitten. Die leeren Scaffolds wogen ca. 4,3 mg. Die Scaffolds mit dem inkorporierten Matrigel hatten ein Gewicht von ca. 8,6 mg. Unmittelbar nach Herstellung der Matrigel-beladenen Scaffolds wurden diese in die Rückenmarkskammer implantiert (Abbildung 6).

### 5.2.5. Prävascularisierung von PLGA-Scaffolds

Um im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit *in situ* ein präformiertes mikrovasculäres Netzwerk innerhalb der PLGA-Scaffolds vor deren Implantation in die Rücken-

hautkammer zu generieren, wurden die Scaffolds in die Flanke von isogenen Spendertieren implantiert (*Abbildung 7*). Zu diesem Zweck wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg; Ketavet) sowie Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg; Rompun 2%) anästhesiert. Pro Tier wurden vier Scaffolds in subcutane Taschen der rechten und linken Flanke eingesetzt. Hierzu erfolgte die Entfernung des Fells durch Elektrorasur (Elektra II GH 204). Nach Hautdesinfektion mit 70%-igem Alkohol wurde die Haut auf einer Strecke von ca. 0,5 cm inzidiert. In der bindegewebigen Verschiebeschicht zwischen dem Musculus panniculus carnosus und der autochthonen Rückenmuskulatur wurde stumpf durch Aufspreizen mit einer Mikroschere eine Tasche geschaffen, in welche jeweils ein Scaffold implantiert wurde. Anschließend erfolgte der Wundverschluss mittels 5.0 Ethilon-Hautnaht (Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Die Wunden der Tiere wurden täglich inspiziert. Nach 20 Tagen wurden die prävascularisierten Scaffolds vorsichtig aus der Flanke der Tiere herauspräpariert und anschließend in die Rückenhautkammer der Empfängertiere implantiert.



**Abbildung 7:** **A:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie eines prävascularisierten PLGA-Scaffolds (Grenzen mit gestrichelter Linie markiert) 20 Tage nach Implantation in die Flanke eines Spendertieres. Nach vorsichtiger Freipräparation des Scaffolds erfolgte *in situ* die Mikroskopie nach vorheriger Färbung des Blutplasmas mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination. Die Anfärbung *in situ* diente zur besseren Darstellung der Blutgefäße innerhalb des Scaffolds nach Transfer in die Rückenhautkammer. **B:** Prävascularisiertes Scaffold nach Implantation in die Rückenhautkammer. Maßstab: A = 500  $\mu\text{m}$ ; B = 1400  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.6. Implantation von Scaffolds in die Rückenhautkammer

Die Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammer erfolgte 48 Stunden nach der Kammerpräparation. Diese Ruhephase diente dazu, dass sich das Kammergewebe vom chirurgischen Trauma erholen konnte. Das Versuchstier wurde durch intraperitoneale Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg; Ketavet) sowie Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg,

Rompun 2%) narkotisiert und anschließend auf einer speziell angefertigten Plexiglasbühne in Seitlage fixiert. Die Kammer wurde unter Zuhilfenahme eines Stereo-Operationsmikroskops (Wild M650) durch Entfernung des Sprengringes und des Deckglases geöffnet. Anschließend wurde ein PLGA-Scaffold vorsichtig unter Vermeidung von Kontamination oder mechanischer Irritation auf das quergestreifte Muskelgewebe im Zentrum der Kammer platziert. Um eine luftblasenfreie Adhäsion des Kammergewebes an das Deckglas zu sichern, wurden einige Tropfen 0,9%ige NaCl-Lösung in die Kammer pipettiert, bevor der Verschluss mit einem neuen Deckglas und die Sicherung durch einen Sprengring erfolgte. Anschließend wurde die erste intravitalmikroskopische Untersuchung durchgeführt.

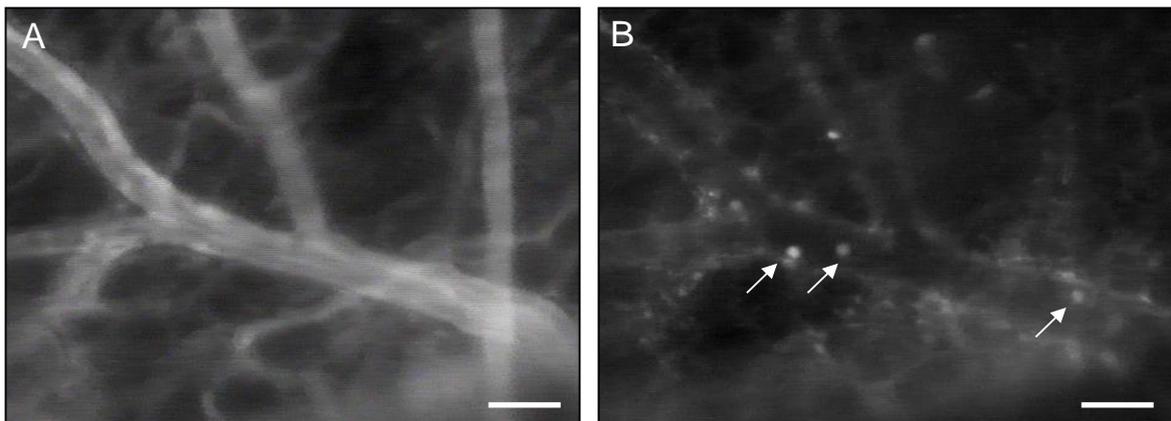
### 5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Vaskularisierung und Biokompatibilität der implantierten Scaffolds wurde mit Hilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie untersucht (*Abbildung 8*). Diese Technik eignet sich besonders gut zur Analyse dynamischer Abläufe, wie beispielsweise der Angiogenese oder der Inoskulation präformierter Blutgefäße, da die Möglichkeit der direkten repetitiven Visualisierung der Mikrozirkulation innerhalb der Rückenhautkammer mit anschließender quantitativer Auswertung mikrozirkulatorischer Parameter besteht.

Vor jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung wurden den Versuchstieren die Fluoreszenzfarbstoffe 5% FITC-Dextran (0,1 ml; MG 150 000 Da; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zur Kontrastverstärkung durch die Anfärbung des Blutplasmas und 0,1% Rhodamin-6G (0,1ml; MG 479 Da; Sigma) zur Markierung der Leukozyten intravenös appliziert. Hierzu wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe nach vorheriger Mischung im Verhältnis von 1:1 den Tieren in Kurznarkose retrobulbär injiziert.

Zur Durchführung der Mikroskopie wurden die Versuchstiere auf einer Plexiglassbühne in Seitenlage immobilisiert, so dass die Rückenhautkammer in horizontaler Lage auf dem Mikroskopiertisch positioniert werden konnte. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde mittels eines modifizierten Leitz-Orthoplan-Mikroskops (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit Auflicht- und Durchlichteinrichtung durchgeführt. Für die Auflicht-Technik wurde eine 100W Quecksilberlampe (HBO, Leitz) als Lichtquelle an ein Ploemopak-Illuminator System adaptiert. Zwei zwischengeschaltete Filterblöcke ermöglichten dabei eine Anregung mit Licht der Wellenlänge 450-490 nm und 530-560 nm. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden unter Verwendung eines FSA-Tubus-GW sowie eines Vario-

Zooms (Leitz) mit Hilfe einer CCD (charge coupled device)-Videokamera (CF 8/1 FMC; Kappa Messtechnik GmbH, Gleichen-Rheinhausen, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgenommen. Unter Zwischenschaltung eines Videotimers (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan) zur Dokumentation der Versuchstiernummer und des Untersuchungszeitpunktes nach Implantation der Scaffolds wurden die Bilder auf ein DVD System (DVD-R121; Samsung Electronics GmbH, Schwalbach, Deutschland) übertragen. Die Wiedergabe erfolgte auf einem 14" Videomonitor (PVM 1444; Sony, Tokio, Japan). Für Übersichtsaufnahmen wurden ein 1,25x Objektiv (Plan Apo; Numerische Apertur (n.a.): 0,04; Olympus, Graz, Österreich) und ein 4x Objektiv (n.a.: 0,16; Olympus) mit langem Arbeitsabstand verwendet. Für Detailaufnahmen diente ein 10x (n.a.: 0,30; Zeiss) bzw. ein 20x Objektiv (n.a.: 0,32; Zeiss) mit langem Arbeitsabstand. Mittels dieser optischen Systeme konnten Vergrößerungen von x27, x54, x86, x216 bzw. x432 unter Verwendung eines Vario-Zooms auf dem Monitor erzielt werden.



**Abbildung 8:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Venole. **A:** Anfärbung des Blutplasmas mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination. **B:** Die gleiche Venole nach Anfärbung der Leukozyten (Pfeile) mit Rhodamin-6G in Grünlicht-Epi-Illumination. Maßstab: 50 µm.

### 5.3.1. Mikrozirkulatorische Parameter

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte die repetitive Beobachtung der Mikrozirkulation innerhalb der Rückenhautkammer über einen Zeitraum von zwei Wochen. Sämtliche mikroskopischen Bilder wurden auf DVD aufgezeichnet. Off-line erfolgte anschließend die Analyse der Bilder mit Hilfe der Computer-assistierten Bildverarbeitungssoftware CapImage.

Dabei wurden folgende Parameter erfasst:

- Gefäßdurchmesser (5.3.1.1.)
- Blutzellgeschwindigkeit (5.3.1.2.)
- Scherrate (5.3.1.3.)
- Blutvolumenfluss (5.3.1.4.)
- Gefäßpermeabilität (5.3.1.5.)
- Fließverhalten der Leukozyten (5.3.1.6.)
- Angiogenese-positive und perfundierte „Regions Of Interest“ (ROIs) (5.3.1.7.)
- Funktionelle Kapillardichte (FKD) (5.3.1.8.)
- Reperfundierte Blutgefäße (5.3.1.9.)
- Hämorrhagien innerhalb der Scaffolds (5.3.1.10)

Unter Verwendung des 10x Objektivs wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Angiogenese-positiven ROIs am Rand und im Zentrum der Scaffolds bestimmt. Im zweiten Studienabschnitt konnten mit diesem Objektiv die perfundierten ROIs und deren FKD sowie die Anzahl der reperfundierten Gefäße innerhalb der prävasikularisierten Scaffolds und deren mikrozirkulatorische Parameter (Blutvolumenfluß und Durchmesser) erfasst werden.

Mit dem 20x Objektiv wurden mikrohämodynamische Parameter in postkapillaren Sammelvenolen am Rand der Scaffolds gemessen (Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Gefäßpermeabilität).

#### **5.3.1.1. Gefäßdurchmesser**

Zur Quantifizierung der Einzelgefäßdurchmesser wurden jeweils zwei Randpunkte der zu messenden Venole oder Kapillare durch eine senkrecht zum Gefäßverlauf liegende Durchmesserstrecke im Standbildmodus verbunden und deren Länge in  $\mu\text{m}$  bestimmt.

#### **5.3.1.2. Blutzellgeschwindigkeit**

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit wurde in den Gefäßen durchgeführt, an denen zuvor bereits die Bestimmung des Gefäßdurchmessers erfolgte. Die Blutzellgeschwindigkeit wurde mit Hilfe der Computer-assistierte Line-Shift-Diagramm-Methode anhand der Bewegungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen bestimmt (Klyscz, 1997). Nach Positionierung einer zentral im Gefäßlumen entlang der Flussrichtung ausgerichteten Messlinie wurde die DVD für ca. 10 Sekunden in Echtzeit abgespielt. Währenddessen wurde fortlaufend für jedes Halbbild entlang der Messlinie das Grauwertprofil erstellt und in ei-

nem Bildspeicher aufgezeichnet. Aus den aneinandergereihten Grauwertprofilen erzeugte die Software ein Line-Shift-Diagramm, in dem helle bzw. dunkle schräge Linien zu erkennen waren, wenn sich während der Messung Plasmalücken bzw. Erythrozyten entlang der Messlinie bewegt hatten. Aus der Steigung dieser Linie konnte anschließend die Blutzellgeschwindigkeit in  $\mu\text{m/s}$  errechnet werden.

### 5.3.1.3. Scherrate

Um die Wandscherkräfte zu vergleichen, welche auf die adhärennten Leukozyten in den einzelnen Gefäßen wirkten, wurde die Scherrate ( $\gamma$ ) berechnet. Grundlage hierfür ist die Newton'sche Definition:

$$\gamma = 8 * v/d \text{ [s}^{-1}\text{]}$$

wobei  $v$  für die Blutzellgeschwindigkeit und  $d$  für den Gefäßdurchmesser steht.

### 5.3.1.4. Blutvolumenfluss

Um den Blutvolumenfluss in den Mikrogefäßen bestimmen zu können, musste berücksichtigt werden, dass diese kleinen Gefäße im Gegensatz zu großen Gefäßen ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil mit geringeren Geschwindigkeiten im Randbereich als im Zentralstrom aufwiesen. Aus diesem Grund wurde zur Berechnung des Blutvolumenflusses ein Korrekturfaktor von 1,6 (Baker und Wayland, 1974) verwendet, um den Unterschied der Geschwindigkeit im Zentralstrom gegenüber der durchschnittlichen Fließgeschwindigkeit auszugleichen. Daraus ergibt sich für die Berechnung des Blutvolumenflusses  $Q$  folgende Formel:

$$Q = \pi * (d/2)^2 * v/1,6 \text{ [pl/s]}$$

wobei die Variable  $d$  für den Durchmesser des Einzelgefäßes und  $v$  für die gemessene Blutzellgeschwindigkeit steht.

### 5.3.1.5. Gefäßpermeabilität

Die Messung der Gefäßpermeabilität erfolgte unter Zuhilfenahme der Methode der Densitometrie (Pries, 1988). Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden computergestützt die Grauwerte des paravasalen Gewebes ( $E_e$ ) und des angefärbten Blutplasmas ( $E_i$ ) bestimmt und zueinander in Relation gesetzt:

$$\text{Gefäßpermeabilität} = E_e / E_i$$

Die unterschiedlichen Grauwertstufen intra- und extravasal ergaben sich dadurch, dass den Versuchstieren vor der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zur Kontrastverstärkung intravenös der Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran (5%) injiziert wurde. Dieser hochmolekulare Plasmamarker (150 000 Da) tritt unter physiologischen Bedingungen nur sehr wenig aus den Gefäßen in den extravasalen Raum über. Unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise einer inflammatorischen Reaktion des Gewebes auf implantierte Biomaterialien, erhöht sich jedoch die Gefäßpermeabilität und der Plasmamarker kann vermehrt auch extravasal nachgewiesen werden, wodurch sich der Quotient verändert. Unter physiologischen Bedingungen ergibt sich so ein Wert, der etwa bei 0,3 liegt, während er sich unter pathologischen Bedingungen zunehmend erhöht und sogar Werte über 1 erreichen kann.

#### **5.3.1.6. Fließverhalten der Leukozyten**

Die Leukozyten wurden zur intravitalmikroskopischen Darstellung *in vivo* mit dem Fluoreszenzmarker Rhodamin-6G angefärbt. Hierdurch war die Analyse der Leukozyten-Endothel-Interaktion in Gefäßen des Randbereichs der implantierten PLGA-Scaffolds möglich. Die quantitative Beurteilung erfolgte in den gleichen postkapillaren Sammelvenolen, an denen bereits die Messung der anderen mikrohäodynamischen Parameter erfolgte (s. 5.3.1.1. bis 5.3.1.5.). Leukozyten können prinzipiell in frei fließende, rollende und adhärente Zellen unterschieden werden. Rollende Leukozyten sind durch eine herabgesetzte Fließgeschwindigkeit gekennzeichnet, die durch Margination und kurzzeitigen Endothelzellkontakt zustande kommt. Die Anzahl rollender Leukozyten wurde als Zellen pro Minute angegeben. Adhärente Leukozyten haften während eines definierten Beobachtungszeitraumes fest an der Gefäßwand. In der vorliegenden Arbeit wurden Leukozyten als adhärent definiert, die sich für 20 Sekunden nicht von der Stelle bewegten. Die Leukozytenadhärenz wurde als Leukozyten pro Endotheloberfläche angegeben.

#### **5.3.1.7. Angiogenese-positive und perfundierte ROIs**

Ein Parameter für die Vaskularisierung der implantierten Scaffolds war die Anzahl Angiogenese-positiver Beobachtungsfelder (regions of interest = ROIs). Hierzu wurden je acht repräsentative ROIs sowohl im Randbereich als auch im Zentrum der Scaffolds standardisiert an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten aufgenommen. Unterschieden wurde zwischen Angiogenese-positiven und -negativen ROIs. Die ROIs wurden als positiv definiert, wenn sie Zeichen der Angiogenese wie Kapillarknospen und -sprossen oder neugebildete, bereits perfundierte Kapillaren aufwiesen. Aus den je acht peripheren und

zentralen ROIs konnte so der Prozentsatz der Angiogenese-positiven ROIs bestimmt werden.

Analog zu den Angiogenese-positiven ROIs wurden bei den Versuchen mit den prävascularisierten Scaffolds die Beobachtungsfelder detektiert, in denen Blutgefäße im Randbereich und im Zentrum der Scaffolds eine Perfusion aufwiesen. Dabei wurde nicht erfaßt, ob es sich um neugebildete Gefäße handelte oder ob präformierte Gefäße nach Implantation reperfundiert wurden, da beide Gefäßtypen zur Sauerstoffversorgung der Zellen beitragen konnten.

#### **5.3.1.8. Funktionelle Kapillardichte**

Um die funktionelle Kapillardichte der neugebildeten bzw. reperfundierten Gefäße zu bestimmen, wurde die Länge dieser Gefäße pro Beobachtungsfeld in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  gemessen. Hierbei wurden nur Gefäße erfasst, welche bereits mit Blutplasma perfundiert waren.

#### **5.3.1.9. Reperfundierte Blutgefäße**

Um den Prozess der Inoskulation zu analysieren, wurden 6-8 präformierte Blutgefäße in jedem prävascularisierten Scaffold am Tag der Implantation in die Rückenhautkammer randomisiert ausgewählt. Während der folgenden Untersuchungszeitpunkte wurde der Anteil der Gefäße bestimmt, der eine Reperfusion aufwies und als Prozentzahl aller analysierten Blutgefäße angegeben.

#### **5.3.1.10. Hämorrhagien innerhalb der Scaffolds**

Einblutungen innerhalb der implantierten Scaffolds wurden semiquantitativ erfasst und wie folgt bewertet: 0 = keine Einblutungen innerhalb der Scaffolds; 1 = einzelne, kleine Hämorrhagien; 2 = mehrere, kleine Hämorrhagien; 3 = massive, konfluierende Hämorrhagien.

## **5.4. Aortic Ring Assay**

Als Modell zur Untersuchung der pro-angiogenen Eigenschaften der beiden verwendeten Matrigeltypen diente der Aortic Ring Assay. Bei diesem Assay handelt es sich um ein Organ-Kultur-Modell zur Analyse der Angiogenese *in vitro*, das erstmals von Nicosia et al. (1990) beschrieben wurde. Hierzu wird die isolierte Aorta der Ratte in Einzelringe geschnitten, die anschließend in Matrigel eingebettet und kultiviert werden. Dabei wachsen

über einen Zeitraum von 6-10 Tagen Gefäßsprossen aus den Ringen aus. Das Hinzufügen von Testsubstanzen in das Kulturmedium erlaubt es, die pro- oder anti-angiogenen Eigenschaften dieser Substanzen zu analysieren. Die Quantifizierung des Wachstums gefäßähnlicher Strukturen erfolgt mittels Videoaufzeichnung der Phasen-Kontrast-Mikroskopie und anschließender computergestützter off-line Analyse.

Der Aortic Ring Assay hat sich in zahlreichen Studien als geeignetes Modell zur quantitativen Analyse der Angiogenese erwiesen (Kojima et al., 2007; van der Schaft et al., 2002). Neben dem Aortic Ring Assay der Ratte konnte das Modell inzwischen auch für Untersuchungen an der Maus-Aorta etabliert werden (Masson et al., 2002).

Zur Durchführung des Aortic Ring Assays wurde die Aorta thoracica von männlichen Sprague-Dawley-Ratten entnommen, in ein Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM; 10% fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe, Deutschland) transferiert und in 1 mm dicke Ringe geschnitten. Anschließend wurden die Ringe in 200 µl flüssiges, 4°C kaltes GFRM oder GFCM in einer 48-Loch-Gewebekulturplatte eingebettet.

Nach Einbettung der Aortenringe in das flüssige Matrigel wurde die Gewebekulturplatte für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert, damit das Matrigel polymerisieren konnte. Danach wurden die Löcher mit 800 µl DMEM bedeckt.

Die Ringe wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 6 Tage kultiviert. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte alle 2 Tage. Die Ansätze wurden pro Matrigeltyp in dreifacher Ausführung mit einer Gesamtzahl von 3 Tieren durchgeführt. Das Aussprossen der Gefäße aus jedem Ring wurde durch Phasen-Kontrast-Mikroskopie erfasst. Die Bilder wurden mittels einer Videokamera (TEC-4770; SI GmbH, Gilching) aufgenommen und auf Videoband gespeichert. Die Auswertung erfolgte off-line mit Hilfe eines Computer-assistierte Bildverarbeitungssystems (CapImage; Zeintl, Heidelberg, Deutschland).

Um das Flächenwachstum der neugebildeten Gefäßsprossen aus der Außenwand der Aortenringe beurteilen zu können, wurde die Fläche zwischen Gefäßaußenwand und äußerer Grenze der ausgewachsenen Gefäßsprossen in mm<sup>2</sup> bestimmt.

Zur Beurteilung des Längenwachstums der Gefäßsprossen wurde derjenige Gefäßspross pro Ring ausgewählt, der von der Außenwand der Aorta am weitesten in das Matrigel hineingewachsen war und dessen Länge in µm erfasst.

Um die Dichte (in cm/cm<sup>2</sup>) der Gefäßsprossen zu bestimmen, wurde die gesamte Länge der Gefäßsprossen pro Beobachtungsfeld in cm gemessen und durch die Fläche der ausgewachsenen Gefäßsprossen geteilt.

## 5.5. Histologie und Immunhistochemie

### 5.5.1. Inkorporation der Scaffolds

Für die lichtmikroskopische Untersuchung der Scaffolds wurde am 14. Tag nach Implantation das Rückenhautkammerngewebe samt Scaffold exzidiert. Das gewonnene Material wurde in 4%-iger Formaldehydlösung bei 20°C für 24 Stunden fixiert. Nach Einbettung in Paraffin und der Anfertigung von Serienschnitten mit einer Schnittdicke von 5 µm erfolgte die Anfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Standardprotokoll. Anhand der so hergestellten Präparate konnte die Inkorporation der Scaffolds in das Kammerngewebe, das Vorhandensein von Matrigel und das Einwachsen neuer Blutgefäße in die Implantate histomorphologisch untersucht werden.

### 5.5.2. Leukozyteninfiltration

Um die Biokompatibilität der implantierten Materialien zu analysieren, erfolgte eine Färbung der Schnitte mit Chloracetat-Esterase (CAE) nach Standardprotokoll. Mittels der CAE-Leukozyten-Färbung wurde die Infiltration der Entzündungszellen in das neugebildete Granulationsgewebe um die Scaffoldstränge untersucht.

### 5.5.3. Reifegrad der Neogefäße

Zur Beurteilung des Reifegrades neugebildeter Gefäße erfolgte die immunhistochemische Detektion von Perizyten durch Färbung von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA). Hierbei diente ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA als primärer Antikörper (1:40; Sigma). Ein Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:200; Amersham, Freiburg, Deutschland) diente als Sekundärantikörper. 3'3-Diaminobenzidin wurde als Chromogen zum Nachweis der Antikörperreaktion verwendet. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

### 5.5.4. Apoptose

Zur immunhistochemischen Detektion apoptotischer Zellen innerhalb des Granulationsgewebes der prävascularisierten Scaffolds wurde eine cleaved Caspase-3-Färbung durchgeführt. Aus kryokonservierten Proben wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die

mit einem polyklonalen cleaved Caspase-3-Antikörper (Kaninchen) als Primärantikörper inkubiert wurden (1:200; MerckBiosciences, Schwalbach, Deutschland). Ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:100; Dianova, Hamburg, Deutschland) diente als Sekundärantikörper. Als Chromogen wurde 3´3-Diaminobenzidin benutzt. Nach Gegenfärbung mit Hämalaun erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung (BX60; Olympus).

### 5.5.5. Nachweis GFP-positiver Zellen

Zur Beantwortung der Frage, ob die Zellen des Granulationsgewebes und die präformierten Mikrogefäße innerhalb der prävascularisierten Scaffolds über den Versuchszeitraum überlebten, erfolgte die immunhistochemische Detektion GFP-positiver Zellen in den Implantaten, die von den GFP-transgenen Spendertieren stammten. Hierzu wurden die Schnitte zunächst mit einem polyklonalen Kaninchen-GFP-Antikörper (1:400; Adcam, Cambridge, England) als Primärantikörper inkubiert. Ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:100; Dianova) wurde als Sekundärantikörper verwendet. 3´3-Diaminobenzidin diente als Chromogen zum Nachweis der Antikörperreaktion. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

## 5.6. Versuchsprotokoll

### 5.6.1. Versuchsgruppen

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, neue Strategien zur Verbesserung der Vaskularisierung implantierter PLGA-Scaffolds zu etablieren. Hierzu wurden zwei verschiedene Ansätze geprüft:

Im ersten Studienabschnitt wurde untersucht, ob die Inkorporation von Matrigel in die Poren von PLGA-Scaffolds die Vaskularisierung beschleunigen und verbessern kann. Hierzu wurden Scaffolds mit inkorporiertem GFRM (n = 8) mit Scaffolds verglichen, die in GFCM eingebettet waren (n = 9). Unbehandelte PLGA-Scaffolds dienten als Kontrolle (n = 5). Zusätzlich wurde das pro-angiogene Potential der beiden Matrigeltypen mittels eines Aortic Ring Assays *in vitro* analysiert (je n =9 aus 3 verschiedenen Spendertieren).

Im zweiten Studienabschnitt wurde untersucht, ob die Vaskularisierung der PLGA-Scaffolds durch Inoskulation präformierter Blutgefäße mit den Blutgefäßen des Empfän-

gergewebes verbessert werden kann. Zu diesem Zweck wurden 8 PLGA-Scaffolds in die Flanke von 4 Balb/c-Mäusen implantiert, um so *in situ* ein mikrovaskuläres Netzwerk innerhalb dieser Scaffolds zu generieren. Nach 20 Tagen wurden die prävascularisierten Scaffolds vorsichtig herauspräpariert und in die Rückenhautkammer von Empfängertieren implantiert (n = 8). Vor dem Herauspräparieren der Scaffolds aus der Flanke wurde den Spendertieren retrobulbär FITC-Dextran zur besseren Kontrastierung der präformierten Blutgefäße injiziert. Leere PLGA-Scaffolds ohne präformierte Blutgefäße, die direkt in die Rückenhautkammer implantiert wurden, dienten als Kontrolle (n = 10).

Um in den implantierten Scaffolds zwischen einwachsenden und präformierten Blutgefäßen differenzieren zu können, wurden 8 zusätzliche Scaffolds in die Flanke von 4 GFP-transgenen C57BL/6 Spendertieren implantiert. Nach 20 Tagen wurden diese prävascularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer von 8 C57BL/6-Wildtyp-Mäusen implantiert.

Insgesamt wurden für die vorliegende Arbeit 54 Mäuse und 3 Ratten als Versuchstiere verwendet. Die Rückenhautkammerpräparation erfolgte bei 48 Mäusen, während 8 Mäuse als Spendertiere für die Flankenimplantation dienten. Aus 3 Ratten wurde die Aorta thoracica zur Durchführung des Aortic Ring Assays isoliert.

### 5.6.2. Versuchsablauf

Nach Implantation der Rückenhautkammer wurde den Tieren eine Ruhephase von 2 Tagen gewährt, damit sich das Gewebe der Rückenhautkammer vom chirurgischen Trauma erholen konnte, um so Einflüsse der Kammerpräparation auf die Mikrozirkulation ausschließen zu können. Anschließend erfolgte die Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammer unter standardisierten Bedingungen. Nach Implantateinlage wurde die erste intravitale Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt (Tag 0). Weitere Untersuchungszeitpunkte waren die Tage 3, 6, 10 und 14. Unmittelbar vor der Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran (5%) und Rhodamin-6G (0,1%) injiziert. Pro Untersuchungstag und -Tier benötigte man für die Mikroskopie etwa 25 Minuten. Im Rahmen der intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfolgten zusätzlich Videoaufzeichnungen des Beobachtungsfensters unter einem OP-Mikroskop in 25- und 40facher Vergrößerung.

Nach Beendigung der letzten intravitale Fluoreszenzmikroskopie am 14. Tag wurden die Tiere mit einer Überdosis Narkose eingeschläfert und die Gewebeproben der Rückenhautkammerpräparation für histologische und immunhistochemische Untersuchungen exzidiert.

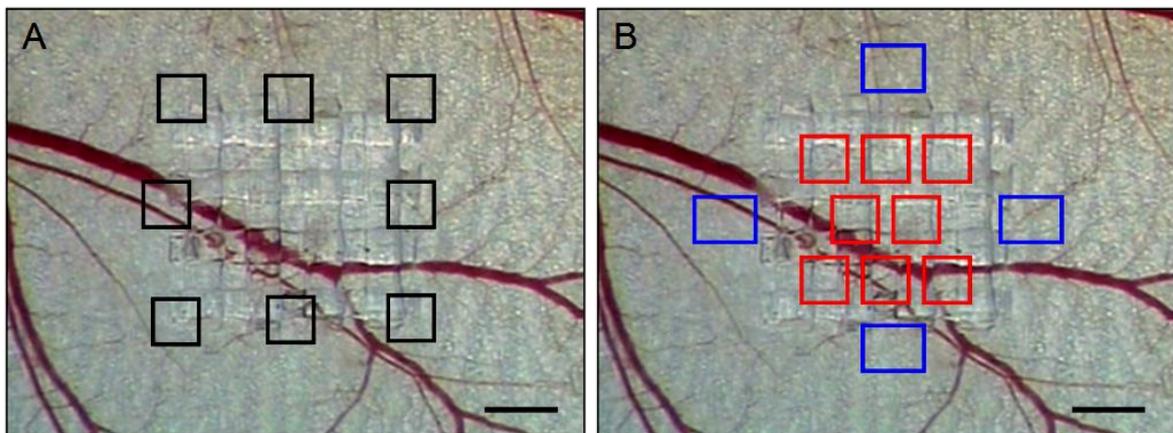
Während des gesamten Versuches wurden die Tiere samt Rückenhautkammer täglich inspiziert, um Tiere mit pathologischen Veränderungen rechtzeitig aus dem Versuch ausschließen zu können.

### 5.6.3. Mikroskopie- und Analyseprotokoll für Studienabschnitt 1

An den einzelnen Untersuchungstagen wurde von 4 repräsentativ ausgewählten postkapillaren Sammelvenolen mit einem Durchmesser von jeweils 20-40  $\mu\text{m}$  im Randbereich der Scaffolds der Gefäßdurchmesser, die Blutzellgeschwindigkeit, die Gefäßpermeabilität sowie das Fließverhalten der Leukozyten in 432x Vergrößerung analysiert (*Abbildung 9*).

Um den Anteil der Angiogenese-positiven ROIs zu erfassen, wurden im Randbereich und im Zentrum der Scaffolds je 8 repräsentative Beobachtungsfelder standardisiert über den Untersuchungszeitraum in 216x Vergrößerung analysiert (*Abbildung 9*).

Zusätzlich wurde innerhalb der Beobachtungsfelder die funktionelle Kapillardichte der neugebildeten Gefäße gemessen.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der einzelnen Beobachtungsfelder beim Mikroskopieren. **A:** An den 8 schwarz markierten Feldern im Randbereich des Scaffolds wurde die Anzahl Angiogenese-positiver ROIs und die funktionelle Kapillardichte der neugebildeten Gefäße bestimmt. **B:** Ebenso wurde in den 8 rot markierten Feldern im Zentrum die Anzahl Angiogenese-positiver ROIs und die funktionelle Kapillardichte der neugebildeten Gefäße analysiert. In den 4 blauen Feldern im Randbereich wurde von je einer postkapillaren Sammelvenole über den Zeitverlauf Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Gefäßpermeabilität und Fließverhalten der Leukozyten gemessen. Maßstab: 700  $\mu\text{m}$ .

### 5.6.4. Mikroskopie- und Analyseprotokoll für Studienabschnitt 2

Analog zur Mikroskopie der Angiogenese-positiven ROIs und der funktionellen Kapillardichte der neugebildeten Gefäße im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden im Rand-

bereich der Scaffolds und im Zentrum je 8 repräsentative ROIs standardisiert aufgenommen, um den Prozentsatz der perfundierten Beobachtungsfelder und deren funktionelle Kapillardichte zu bestimmen. Als „perfundiert“ wurden die Beobachtungsfelder definiert, in denen entweder präformierte Gefäße reperfundiert oder neugebildete Kapillaren mit Blutplasma gefüllt waren.

Zusätzlich wurden mikrohämodynamische Messungen durchgeführt. Gemessen wurden Durchmesser und Blutzellgeschwindigkeit in 8-10 zufällig ausgewählten Gefäßen innerhalb der zentralen Beobachtungsfelder. Hieraus erfolgte die Berechnung des Blutvolumenflusses und der Scherrate.

Zusätzlich wurde in der Gruppe der prävaskularisierten Scaffolds innerhalb der zentralen Beobachtungsfelder an den jeweiligen Untersuchungstagen die Anzahl der an Tag 0 ausgewählten, präformierten Blutgefäße bestimmt, die eine Reperfusion aufwiesen.

## 5.7. Statistik

Zunächst wurden die Werte auf Normalverteilung und Varianzgleichheit geprüft. In beiden Studienabschnitten wurden bei Normalverteilung signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe an unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten mit der Hilfe einer „one way analysis of variance“ (ANOVA) für wiederholte Messungen gefolgt von einem gepaarten Student's t-Test und Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers nach Bonferroni geprüft.

Im ersten Studienabschnitt wurde der Vergleich zwischen den Gruppen an den einzelnen Untersuchungstagen mittels ANOVA für Mehrfachvergleiche durchgeführt. Dies war gefolgt von dem entsprechenden *post hoc*-Test.

Im zweiten Studienabschnitt wurden Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen durch den ungepaarten Student's t-Test analysiert.

Sämtliche Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) angegeben.

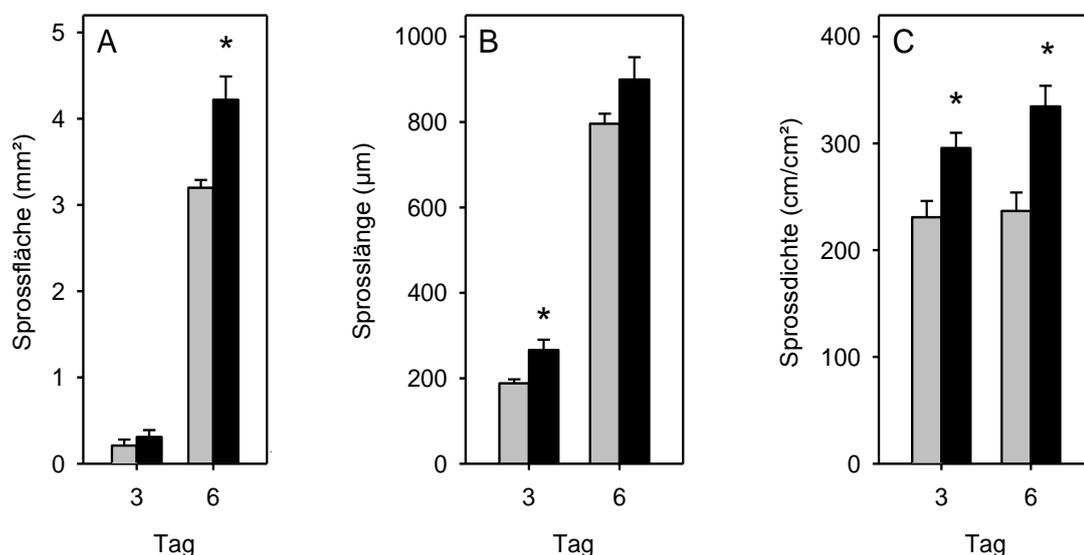
Die statistischen Tests erfolgten unter Verwendung des Softwarepakets SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, USA). Bei der Prüfung wurden Unterschiede mit  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

## 6. ERGEBNISSE

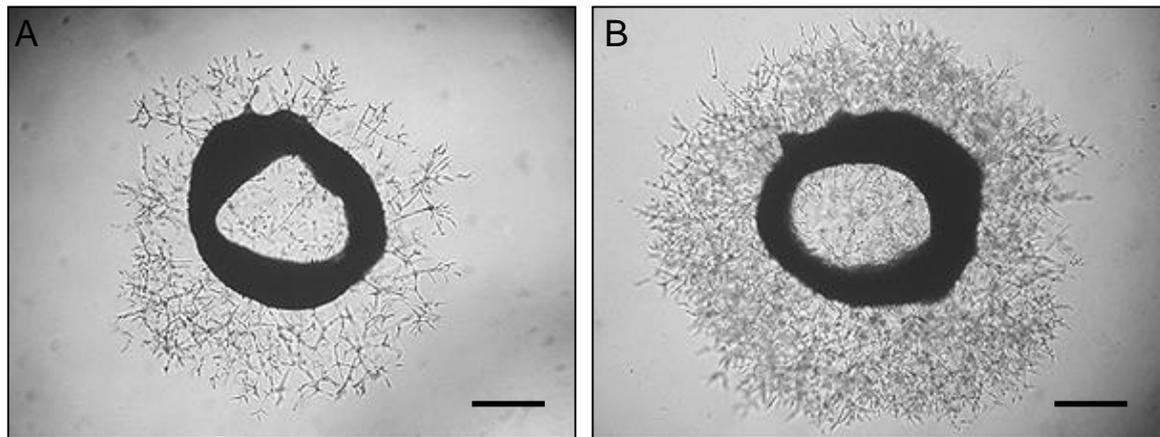
### 6.1. Inkorporation von Matrigel in PLGA-Scaffolds

#### 6.1.1. Aortic Ring Assay

Die Einbettung von Aortenringen in die beiden Matrigeltypen GFRM und GFCM stimulierte die Bildung von Gefäßsprossen, welche aus der Wand der Ringe herauswuchsen. Am 3. Tag waren Länge und Dichte dieser Sprossen in der GFCM-Gruppe im Vergleich zur GFRM-Gruppe signifikant erhöht (*Abbildung 10*). Während der folgenden Tage wuchsen die Gefäßsprossen weiter in das umgebende Matrigel, was zur Ausbildung eines dichten Netzwerkes tubulärer Gefäßstrukturen führte (*Abbildung 11*). Nach sechs Tagen wiesen die Aortenringe der GFCM-Gruppe eine signifikant höhere Sprossfläche von  $4,2 \pm 0,3 \text{ mm}^2$  und Sprossdichte von  $335 \pm 19 \text{ cm/cm}^2$  im Vergleich zur GFRM-Gruppe ( $3,2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$  und  $237 \pm 17 \text{ cm/cm}^2$ ) auf, was die erhöhte pro-angiogene Aktivität des GFCM belegt. Interessanterweise wurde durch das GFCM eher die Verzweigung der Gefäßsprossen als das Längenwachstum stimuliert. Dementsprechend war die maximale Sprosslänge in beiden Matrigelgruppen an Tag 6 vergleichbar.



**Abbildung 10:** Fläche (A, mm<sup>2</sup>), maximale Länge (B, µm) und Dichte (C, cm/cm<sup>2</sup>) der Gefäßsprossen, die sich an den Tagen 3 und 6 nach Einbettung von Aortenringen in GFRM (grauer Balken) und GFCM (schwarzer Balken) ausbildeten. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. GFRM.



**Abbildung 11:** **A, B:** Ratten-Aortenringe mit Gefäßausprossungen nach 6 Tagen Inkubationszeit in GFRM (**A**) und GFCM (**B**). Maßstab: 600  $\mu\text{m}$ .

### 6.1.3. Implantationsexperimente

#### 6.1.3.1. Materialeigenschaften der PLGA-Scaffolds

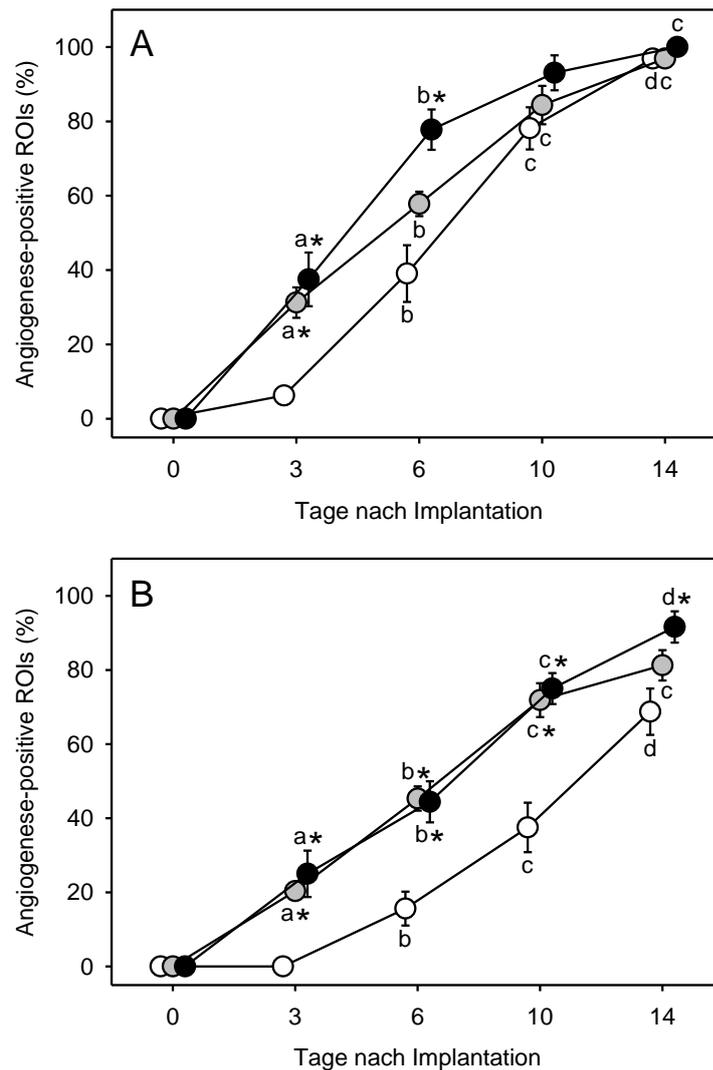
Die PLGA-Scaffolds der drei Gruppen von Studienabschnitt 1 wurden für die Implantation in die Rückenhautkammer in je 3 mm x 3 mm x 1 mm große Stücke zurechtgeschnitten. Die mikromorphometrische Analyse der Scaffolds zeigte, dass sie einen Porendurchmesser von  $376 \pm 8 \mu\text{m}$  und eine Strangdicke von  $501 \pm 10 \mu\text{m}$  aufwiesen.

#### 6.1.3.2. Angiogenese

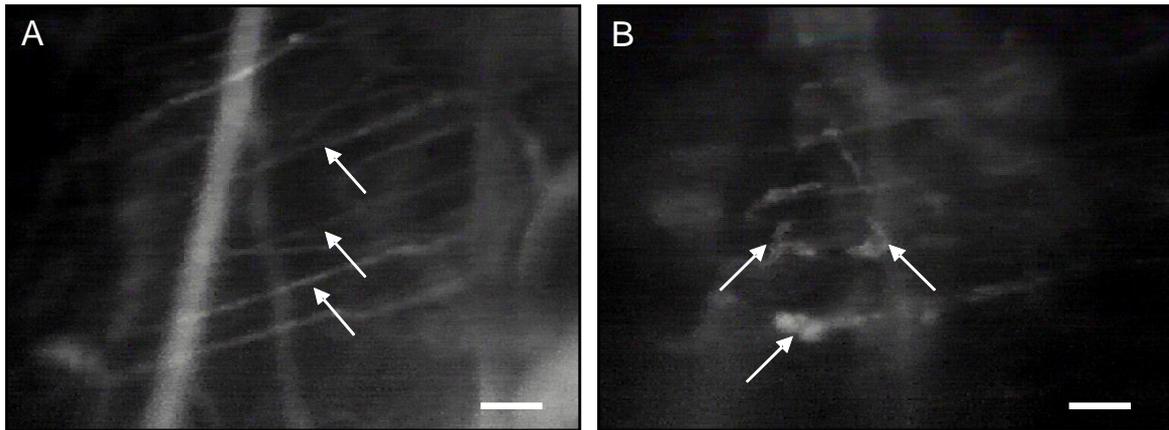
In allen drei Versuchsgruppen konnten bereits am 3. Tag nach Implantation erste Zeichen einer angiogenen Reaktion des quergestreiften Muskelgewebes der Rückenhautkammer auf die Scaffolds nachgewiesen werden. Diese war gekennzeichnet durch Kapillardilatationen und die Bildung von Kapillarknospen und -sprossen (*Abbildung 13*).

Während der folgenden Tage wuchsen die neugebildeten Gefäße in die Scaffolds ein und bildeten Querverbindungen untereinander aus. Auf diese Weise formte sich ein neues, perfundiertes, mikrovaskuläres Netzwerk. Hierbei war die Angiogenese im Randbereich stärker ausgeprägt als im Zentrum (*Abbildung 12*).

Der angiogene Prozess war initial in beiden Matrigelgruppen im Vergleich zur Kontrolle beschleunigt. Hier lag die Zahl Angiogenese-positiver ROIs schon an Tag 3 bei 35-40% im Randbereich und 20-25% im Zentrum. In den Scaffolds der Kontrollgruppe zeigten zu diesem Beobachtungszeitpunkt nur 6% der ROIs im Randbereich und 0% der ROIs im Zentrum Zeichen von Angiogenese.



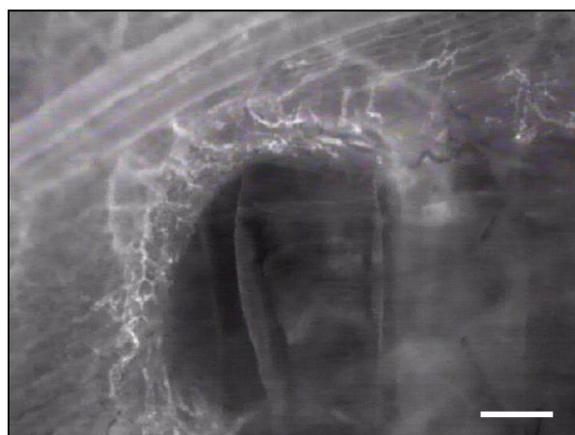
**Abbildung 12:** Angiogenese-positive ROIs im Randbereich (**A**) und im Zentrum (**B**) der GFCM-Scaffolds (schwarze Kreise), GFRM-Scaffolds (graue Kreise) und der Matrigel-freien Kontroll-Scaffolds direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0 und 3 innerhalb einer Gruppe; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; <sup>d</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb einer Gruppe; \* $p < 0,05$  vs. Matrigel-freie Kontroll-Scaffolds zu identischen Zeitpunkten.



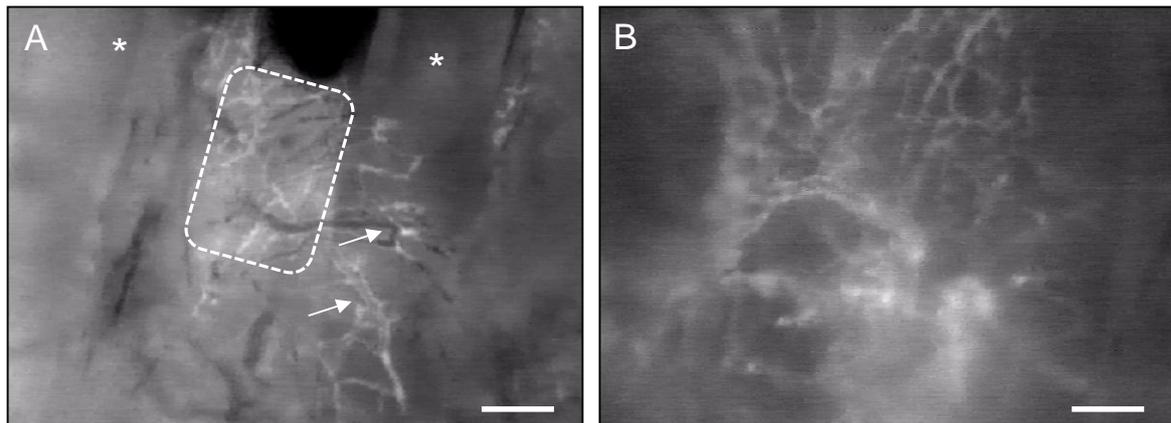
**Abbildung 13:** Detailaufnahmen von Poren im Zentrum verschiedener Scaffolds am 3. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer. **A:** Matrigel-freies Scaffold der Kontrollgruppe. In dieser Vergrößerung ist bei Fokussierung auf den Grund der Pore die normale Mikrozirkulation des quergestreiften Muskels mit parallel verlaufenden Kapillaren zu erkennen (**A**, Pfeile). **B:** Beim GFCM-Scaffold sind am 3. Tag schon bei ca. 25% der ROIs Zeichen beginnender Angiogenese wie Wandunregelmäßigkeiten und Kapillaraussprossungen (**B**, Pfeile) sichtbar. Maßstab: 75  $\mu\text{m}$ .

### 6.1.3.3. Funktionelle Kapillardichte

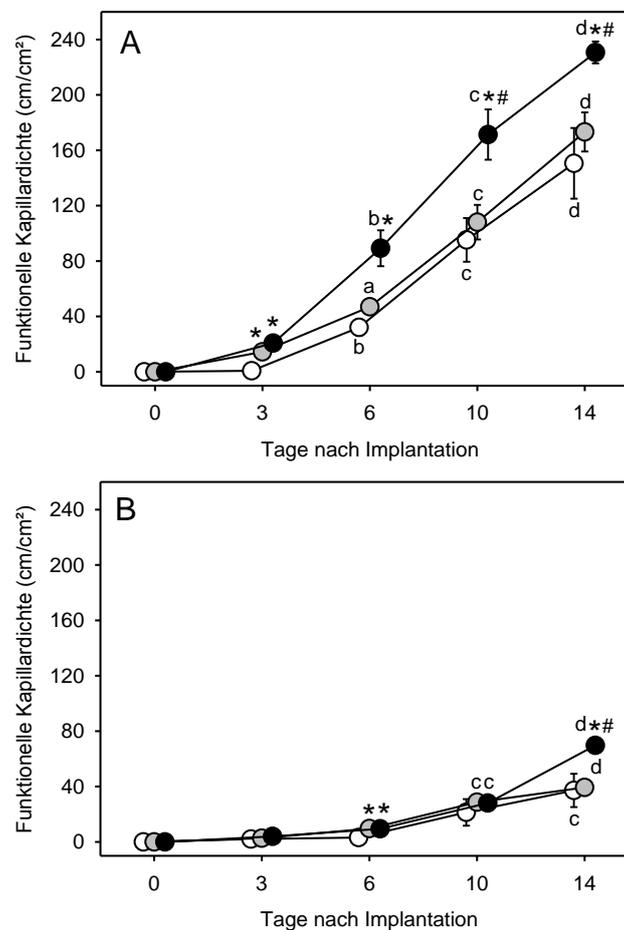
Zur näheren Charakterisierung der Angiogenese erfolgte die Quantifizierung der Dichte der neugebildeten Blutgefäße sowohl im Randbereich (*Abbildung 14*) als auch im Zentrum (*Abbildung 15*) der Scaffolds. Analog zu der Anzahl Angiogenese-positiver ROIs war die funktionelle Kapillardichte an Tag 3 im Randbereich und an Tag 6 im Zentrum in beiden Matrigelgruppen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Am Ende des Beobachtungszeitraumes wies jedoch lediglich die GFCM-Gruppe eine deutliche Erhöhung der Kapillardichte auf. Trotz dieser verbesserten Vaskularisierung war die funktionelle Kapillardichte im Zentrum an Tag 14 mit ca. 70  $\text{cm}/\text{cm}^2$  immer noch relativ niedrig (*Abbildung 16*).



**Abbildung 14:** Intravital Fluoreszenzmikroskopie des Randbereiches eines Matrigel-freien Kontroll-Scaffolds am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer. Maßstab: 330  $\mu\text{m}$ .



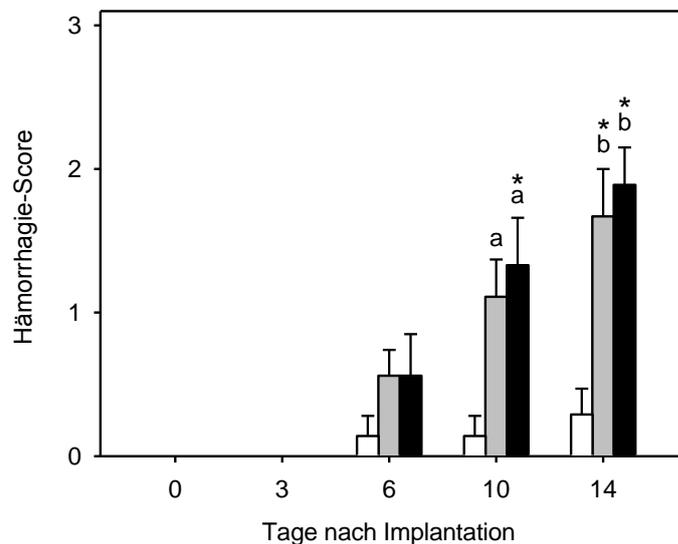
**Abbildung 15:** **A:** Randbereich eines GFCM-Scaffolds am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die neugebildeten Gefäße (Pfeile) wachsen aus einer Pore (gestricheltes Areal) über die oberen Stränge des Scaffolds (\*) nach außen. **B:** Vaskularisierung der Pore eines GFCM-Scaffolds an Tag 14. Maßstab: A = 230  $\mu\text{m}$ ; B = 110  $\mu\text{m}$ .



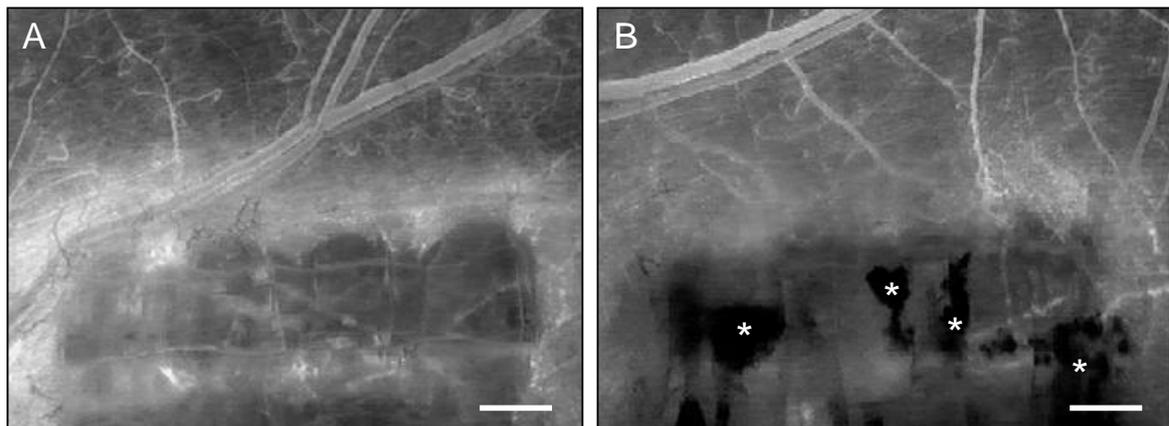
**Abbildung 16:** Funktionelle Kapillardichte ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) der ROIs im Randbereich (**A**) und im Zentrum (**B**) der GFCM-Scaffolds (schwarze Kreise), GFRM-Scaffolds (graue Kreise) und Matrigel-freie Kontroll-Scaffolds (weiße Kreise) direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0 und 3 innerhalb einer Gruppe; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; <sup>d</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb einer Gruppe; \* $p < 0,05$  vs. Matrigel-freie Kontroll-Scaffolds zu identischen Zeitpunkten; # $p < 0,05$  vs. GFRM-Scaffolds zu identischen Zeitpunkten.

### 6.1.3.4. Hämorrhagien innerhalb der Scaffolds

Der Prozess der Angiogenese und Vaskularisierung ging mit Einblutungen innerhalb der Scaffolds einher. Diese punktförmigen und teils auch konfluierenden Hämorrhagien fanden sich insbesondere innerhalb der beiden Matrigelgruppen (*Abbildung 17, 18*).



**Abbildung 17:** Einblutungen innerhalb der Scaffolds direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag. Weißer Balken = Kontrolle; grauer Balken = GFRM-Scaffolds; schwarzer Balken = GFCM-Scaffolds; Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0 und 3 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; \* $p < 0,05$  vs. Matrigel-freie Kontroll-Scaffolds zu identischen Zeitpunkten.

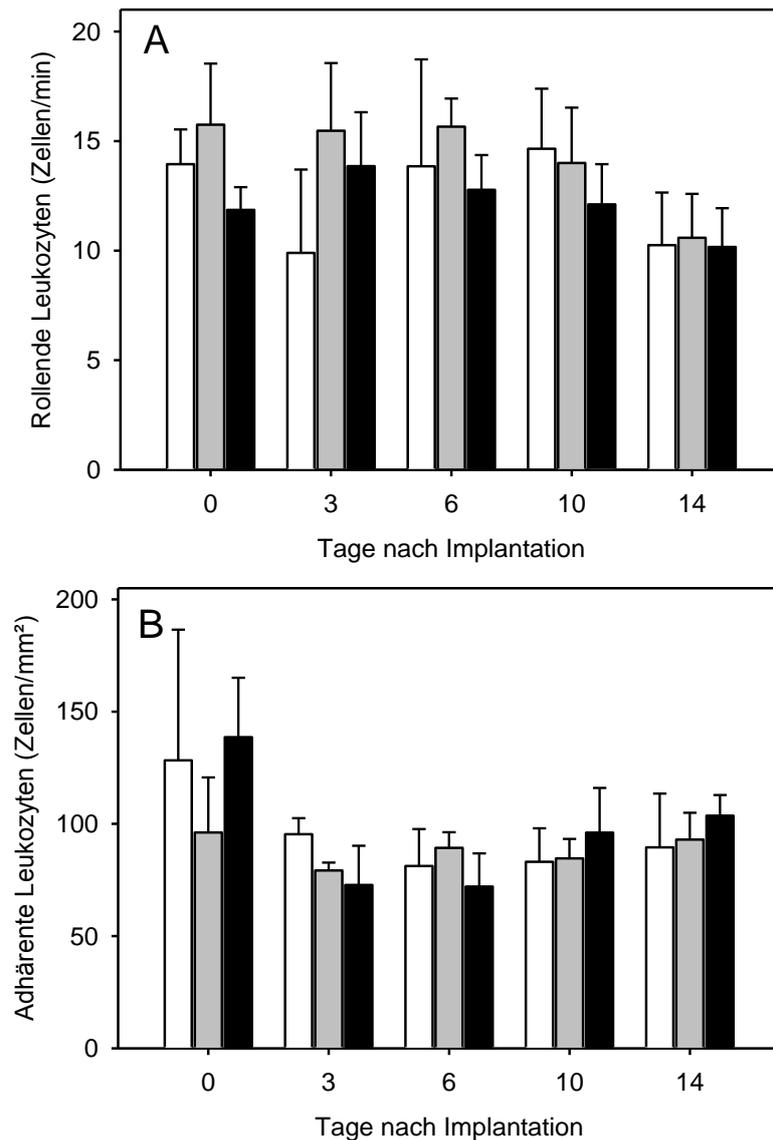


**Abbildung 18:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie eines Matrigel-freien Kontroll-Scaffolds (**A**) und eines GFCM-Scaffolds (**B**) am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer. Das GFCM-Scaffold weist multiple Hämorrhagien auf (\*), wohingegen das leere Kontroll-Scaffold frei von Einblutungen ist. Maßstab: 540  $\mu$ m.

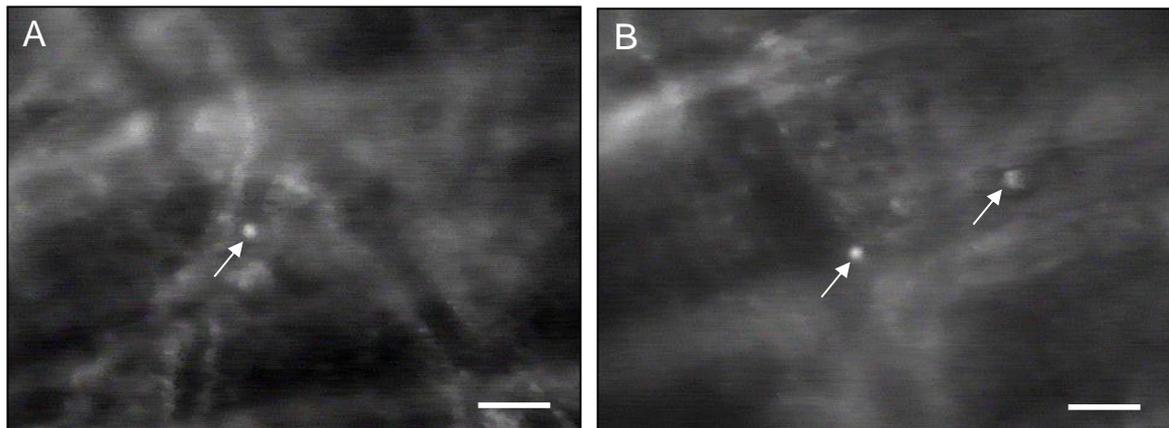
### 6.1.3.5. Fließverhalten der Leukozyten

Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion war in allen Versuchsgruppen vergleichbar und zeigte keine signifikanten Unterschiede über den Zeitverlauf. Während des Beobach-

tungszeitraumes von 14 Tagen lag die Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten mit Werten von 10-16 Zellen pro Minute bzw. 70-140 Zellen pro  $\text{mm}^2$  im physiologischen Bereich. Dies zeigt, dass die Implantation der Scaffolds keine Leukozytenreaktion auslöste. (Abbildung 19, 20).



**Abbildung 19:** Anzahl rollender (A) und adhärenter Leukozyten (B) in postkapillaren Venolen und Sammelvenolen direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag. Weißer Balken = Kontrolle; grauer Balken = GFRM-Scaffolds; schwarzer Balken = GFCE-Scaffolds. Mittelwerte  $\pm$  SEM.



**Abbildung 20:** Intravitalmikroskopische Darstellung einer Venole in Grünlicht-Epi-Illumination zur Visualisierung der Leukozyten am 10. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer **A:** Matrigel-freies Kontroll-Scaffold **B:** GFRM-Scaffold. Insgesamt waren nur wenige adhärente und rollende Leukozyten (Pfeile) innerhalb der Venolen im Randbereich der Scaffolds sichtbar. Maßstab: 35 µm.

### 6.1.3.6. Gefäßpermeabilität

Die makromolekulare Gefäßpermeabilität war in allen Gruppen vergleichbar und zeigte keine signifikanten Unterschiede über den Zeitverlauf (Tabelle 2).

#### Makromolekulare Gefäßpermeabilität ( $E_e/E_i$ )

	Tag 0	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Kontroll-Scaffolds	0,55 ± 0,04	0,67 ± 0,01	0,68 ± 0,33	0,66 ± 0,03	0,69 ± 0,04
GFRM-Scaffolds	0,65 ± 0,02	0,69 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,72 ± 0,01
GFCM-Scaffolds	0,67 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,75 ± 0,02	0,68 ± 0,02

**Tabelle 2:** Makromolekulare Gefäßpermeabilität der postkapillaren Venolen und Sammelvenolen im Randbereich der Matrigel-freien Kontroll-Scaffolds, GFRM- und GFCM-Scaffolds direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag. Mittelwerte ± SEM.

### 6.1.3.7. Mikrohämodynamik

Die analysierten Venolen wiesen in allen 3 Gruppen konstante Durchmesser zwischen 20 und 40 µm auf. Darüberhinaus unterschieden sich die Werte für den Blutvolumenfluss und die Scherrate der Venolen in unmittelbarer Umgebung der Matrigel-Scaffolds nicht wesentlich von denen der Kontrollgruppe (Tabelle 3).

*Blutvolumenfluss (pl/s)*

	Tag 0	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Kontroll-Scaffolds	82,3 ± 11,9	129,1 ± 13,5	112,2 ± 18,9	135,2 ± 23,2	120,5 ± 22,0
GFRM-Scaffolds	87,7 ± 6,5	128,8 ± 14,6	131,0 ± 4,9 <sup>b</sup>	136,7 ± 8,3 <sup>b</sup>	123,0 ± 14,0
GFCM-Scaffolds	70,2 ± 5,4	115,6 ± 11,9	106,9 ± 8,9	110,7 ± 15,1	124,2 ± 12,8 <sup>b</sup>

*Scherrate (s<sup>-1</sup>)*

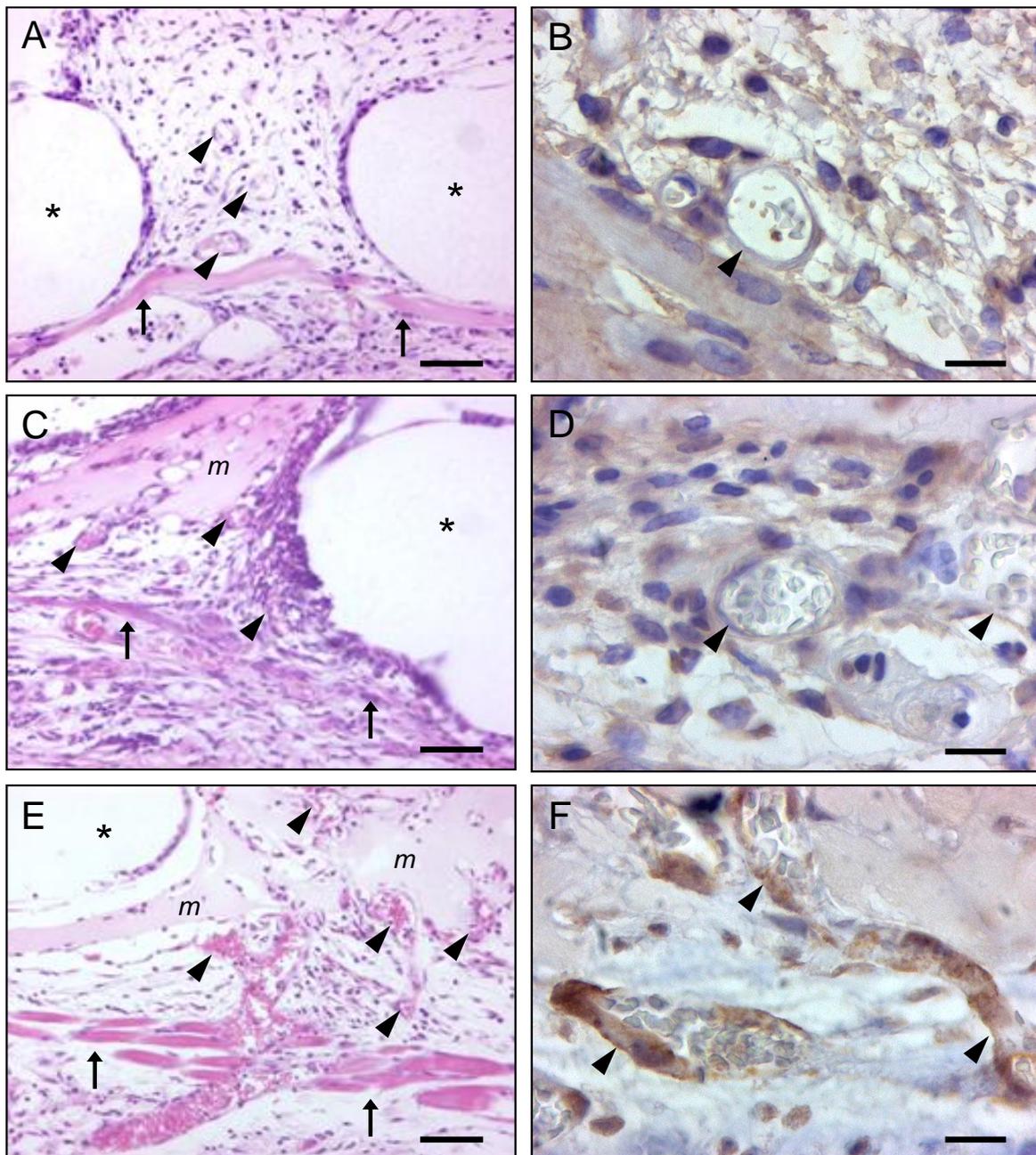
	Tag 0	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Kontroll-Scaffolds	61,2 ± 4,4	84,3 ± 3,6	85,9 ± 3,6	78,4 ± 10,5	71,4 ± 15,3
GFRM-Scaffolds	63,3 ± 6,1	60,0 ± 5,8 <sup>a</sup>	75,9 ± 2,7	85,7 ± 6,3 <sup>c</sup>	74,0 ± 6,0
GFCM-Scaffolds	56,2 ± 6,1	72,2 ± 5,7	80,8 ± 4,4 <sup>b</sup>	68,8 ± 8,1	74,9 ± 6,0

**Tabelle 3:** Blutvolumenfluss (pl/s) und Scherrate (s<sup>-1</sup>) im Randbereich der Matrigel-freien Kontroll-Scaffolds, GFRM- und GFCM-Scaffolds direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag. Mittelwerte ± SEM. <sup>a</sup>p < 0,05 vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup>p < 0,05 vs. Tag 0 und 3 innerhalb einer Gruppe; <sup>c</sup>p < 0,05 vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb einer Gruppe.

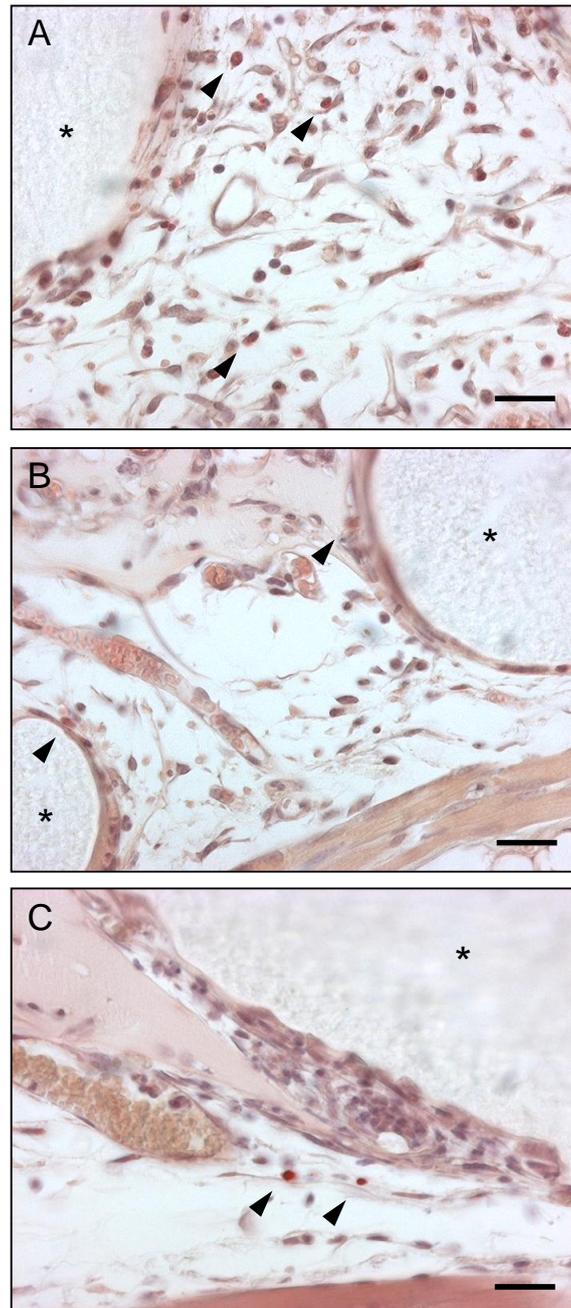
### 6.1.3.8. Histologie und Immunhistochemie

Die histologische Untersuchung der Scaffolds am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer bestätigte die intravitalmikroskopischen Ergebnisse. Neugebildetes Granulationsgewebe wuchs in allen 3 Gruppen in die Poren der PLGA-Scaffolds ein, wobei in den Matrigel-Scaffolds noch Rückstände des Gels nachgewiesen werden konnten (Abbildung 21: A, C, E). Das Granulationsgewebe um die GFCM-Scaffolds wies verglichen mit den GFRM-Scaffolds und den Scaffolds der Kontrolle mehr Blutgefäße auf (Abbildung 21: A, C, E). Durch immunhistochemischen Nachweis von  $\alpha$ -SMA-positiven Perizyten zeigte sich, dass die meisten Blutgefäße in der GFCM-Gruppe im Gegensatz zu den Blutgefäßen der Kontrolle und der GFRM-Gruppe mit diesen Zellen umgeben waren (Abbildung 21: B, D, F).

Mittels CAE-Färbung wurde die Infiltration von Leukozyten in das neugebildete Granulationsgewebe in der Umgebung der Scaffolds untersucht. Hier zeigten sich in den drei analysierten Gruppen insgesamt nur wenige CAE-positive Zellen, was auf eine fehlende Entzündungsreaktion nach Implantation der Scaffolds hinweist (Abbildung 22).



**Abbildung 21:** HE-gefärbte Schnitte eines Matrigel-freien Scaffolds (A), eines GFRM-Scaffolds (C) und eines GFCM-Scaffolds (E) am 14. Tag nach Implantation auf das quergestreifte Muskelgewebe der Rückenhautkammer (A,C,E: Pfeile). In allen drei Gruppen sind die PLGA-Stränge (Sternchen) von neuem Granulationsgewebe umgeben, welches in den beiden Matrigelgruppen noch Rückstände des Matrigels enthält (m). Das Granulationsgewebe um die GFCM-Scaffolds weist verglichen mit den beiden anderen Gruppen eine höhere Dichte an Blutgefäßen auf (Pfeilspitzen). Durch die immunohistochemische Darstellung von  $\alpha$ -SMA (B, D, F) können reife, mit Perizyten bedeckte Gefäße (Pfeilspitzen) innerhalb des Granulationsgewebes, welches die GFCM-Scaffolds (F) umgibt, detektiert werden. Im Gegensatz dazu sind die Mehrzahl der Gefäße der beiden anderen Gruppen  $\alpha$ -SMA-negativ (B: Matrigel-freies Scaffold; D: GFRM-Scaffold). Maßstab: A, C, E = 160  $\mu$ m; B, D, F = 15  $\mu$ m.



**Abbildung 22:** CAE-gefärbte Schnitte eines Matrigel-freien Kontroll-Scaffolds (**A**), eines GRFM-Scaffolds (**B**) und eines GFCM-Scaffolds (**C**) am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer. Es finden sich in allen drei Gruppen nur wenige CAE-positive Leukozyten (Pfeilspitzen) in dem Granulationsgewebe, welches die Scaffold-Stränge umgibt (Sternchen). Dies zeigt, dass die Implantation der Scaffolds in der Rückenhautkammer keine Entzündung induziert. Maßstab: 100  $\mu$ m.

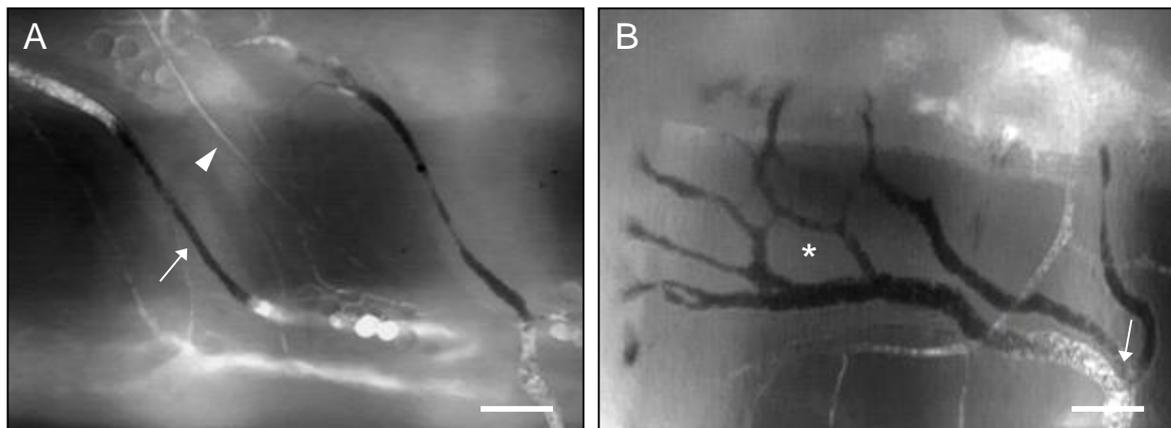
## 6.2. Inoskulation prävaskularisierter Scaffolds

### 6.2.1. Materialeigenschaften der implantierten Scaffolds

Sämtliche PLGA-Scaffolds dieses Studienabschnitts wurden für die Implantation in die Flanke sowie in die Rückenkammer in je 2,4 mm x 2,4 mm x 1,2 mm große Stücke zurechtgeschnitten. Querschnitte durch die Scaffolds ließen Poren von identischer Größe und Form erkennen. Bei der mikromorphometrischen Analyse von 20 Poren konnte ein mittlerer Porendurchmesser von  $289 \pm 10 \mu\text{m}$  gemessen werden.

### 6.2.2. Vaskularisierung der implantierten Scaffolds

Die Analyse der Scaffolds, welche für 20 Tage in die Flanke von Spendertieren implantiert wurden, zeigte, dass neugebildete Blutgefäße in die Poren der Scaffolds hineingewachsen waren. Dies führte zur Ausbildung eines kompletten, *in situ* geformten mikrovaskulären Gefäßnetzwerkes (*Abbildung 23*), das aus Arteriolen, Kapillaren und postkapillaren Venolen bestand.

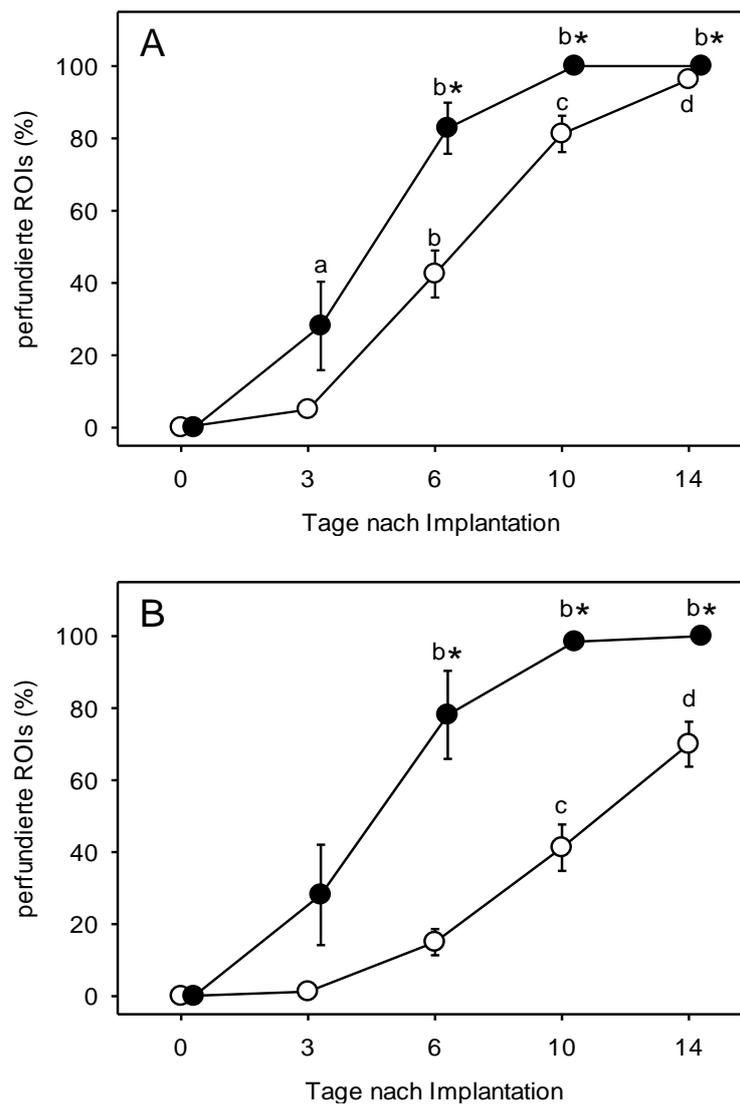


**Abbildung 23:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie eines prävaskularisierten Scaffolds nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die Anfärbung des Blutplasmas mit FITC-Dextran erfolgte vor dem Herauspräparieren aus dem Spendertier bei noch intakter Mikrozirkulation, so dass sich die kontrastierten Blutgefäße auch ohne Perfusion unmittelbar nach Implantation noch teilkontrastiert darstellen. **A:** Übersichtsaufnahme eines Scaffolds. Es sind sowohl Venolen (Pfeil) als auch Arteriolen (Pfeilspitze) vorhanden. **B:** Detailvergrößerung eines Scaffolds. Man sieht ein kapillares Netzwerk (Sternchen) mit nachgeschalteter postkapillarer Sammelvenole (Pfeil). Maßstab: A = 155  $\mu\text{m}$ ; B = 60  $\mu\text{m}$ .

#### 6.2.2.1. Perfundierte ROIs innerhalb der Scaffolds

Nach der Implantation der prävaskularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer konnten perfundierte Beobachtungsfelder bereits am 3. Tag sowohl im Randbereich als auch

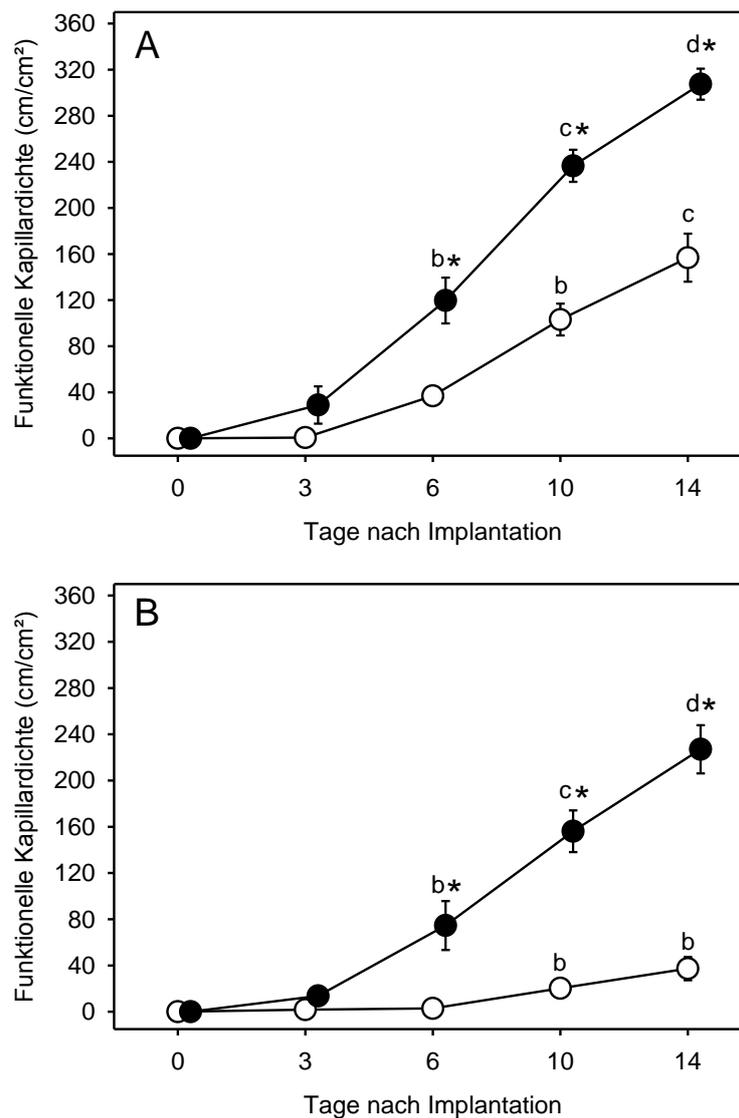
im Zentrum nachgewiesen werden. Die Anzahl der perfundierten ROIs stieg im weiteren Zeitverlauf auf 80-100% an (Abbildung 24). Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Kontroll-Scaffolds eine verzögerte Vaskularisierung mit einer signifikant geringeren Anzahl perfundierter ROIs im Randbereich der Scaffolds an Tag 6 und 10 nach Implantation. Diese Verzögerung war im Zentrum der Scaffolds noch deutlicher ausgeprägt. Hier waren an Tag 14 nur 70% der Beobachtungsfelder bereits perfundiert (Abbildung 24).



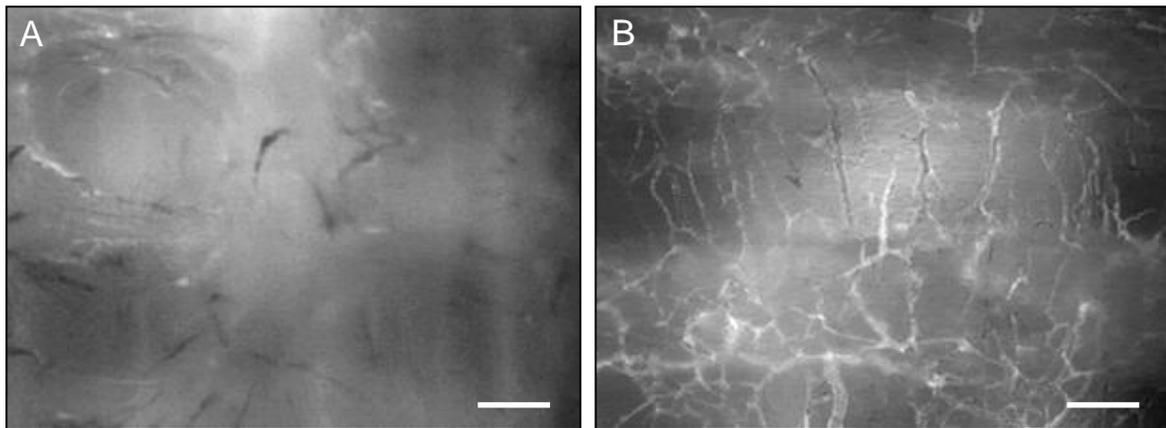
**Abbildung 24:** Anzahl perfundierter ROIs (in %) im Randbereich (A) und im Zentrum (B) von „leeren“ Kontroll-Scaffolds (weiße Kreise) und prävasikularisierten Scaffolds (schwarze Kreise) direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0 und 3 innerhalb einer Gruppe; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; <sup>d</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb einer Gruppe; \* $p < 0,05$  vs. Kontroll-Scaffolds zu identischen Zeitpunkten.

### 6.2.2.2. Funktionelle Kapillardichte

Wie bei der Auswertung der Anzahl perfundierter ROIs wurde bei der Analyse der funktionellen Kapillardichte innerhalb der prävascularisierten Scaffolds ein kontinuierlicher Anstieg mit signifikant erhöhten Werten sowohl im Randbereich als auch im Zentrum der Scaffolds an den Untersuchungstagen 6 bis 14 im Vergleich zu den Kontroll-Scaffolds beobachtet (Abbildungen 25 und 26).



**Abbildung 25:** Analyse der funktionellen Kapillardichte in den Beobachtungsfeldern im Randbereich (A) und im Zentrum (B) von „leeren“ Kontroll-Scaffolds (weiße Kreise) und prävascularisierten Scaffolds (schwarze Kreise) direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0 und 3 innerhalb einer Gruppe; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; <sup>d</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb einer Gruppe; \* $p < 0,05$  vs. Kontroll-Scaffolds zu identischen Zeitpunkten.



**Abbildung 26:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie des Zentrums zweier Scaffolds (intravaskuläre Plasmafärbung mittels FITC-Dextran zur Kontrastverstärkung) am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer. **A:** „Leeres“ Kontroll-Scaffold. **B:** Prävascularisiertes Scaffold. Der Unterschied in der funktionellen Kapillardichte ist deutlich erkennbar. Maßstab: 140  $\mu\text{m}$ .

### 6.2.2.3. Mikrohämodynamik

Der Durchmesser der Mikrogefäße in den prävascularisierten Scaffolds lag zwischen 31 - 39  $\mu\text{m}$  ohne signifikante Unterschiede im Zeitverlauf. Die neugebildeten Blutgefäße in den Kontroll-Scaffolds wiesen einen deutlich geringeren Durchmesser von 14-18  $\mu\text{m}$  während des 14-tägigen Beobachtungszeitraums auf.

Interessanterweise war die Fließgeschwindigkeit in den Mikrogefäßen innerhalb der prävascularisierten Scaffolds deutlich erhöht. Dementsprechend zeigte die Berechnung des Blutvolumenflusses sowie der Wandscherrate signifikant erhöhte Werte bei den Tieren mit prävascularisierten Scaffolds im Vergleich zur Kontrolle (*Tabelle 4*).

### 6.2.2.4. Reperfundierte Blutgefäße

Die beschleunigte und deutlich verbesserte Perfusion der *in situ* prävascularisierten Scaffolds war durch die Tatsache bedingt, dass das präformierte mikrovaskuläre Netzwerk rasch durch Inoskulation mit der Mikrozirkulation des Empfängertieres reperfundiert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurden die Kontroll-Scaffolds lediglich durch Einwachsen neugebildeter Blutgefäße aus dem umgebenden Gewebe der Rückenhautkammer vaskularisiert. Alle analysierten präformierten Venolen sowie Arteriolen innerhalb der prävascularisierten Scaffolds waren an Tag 14 reperfundiert. Interessanterweise wiesen die Arteriolen und Venolen nach Reperfusion wieder das Fließverhalten einer Arteriole bzw. Venole auf (*Abbildungen 27 und 28*).

*Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )*

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Kontrolle	--	13,8 $\pm$ 1,4	16,6 $\pm$ 1,0	17,5 $\pm$ 0,9
Prävaskularisiert	32,4 $\pm$ 3,1	34,5 $\pm$ 4,1*	38,7 $\pm$ 1,8*	31,5 $\pm$ 2,3*

*Blutzellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ )*

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Kontrolle	--	7,1 $\pm$ 5,4	27,2 $\pm$ 9,3 <sup>a</sup>	38,3 $\pm$ 9,2 <sup>a</sup>
Prävaskularisiert	51,9 $\pm$ 19,6	80,5 $\pm$ 41,3*	136,7 $\pm$ 23,9*	234,7 $\pm$ 27,2*

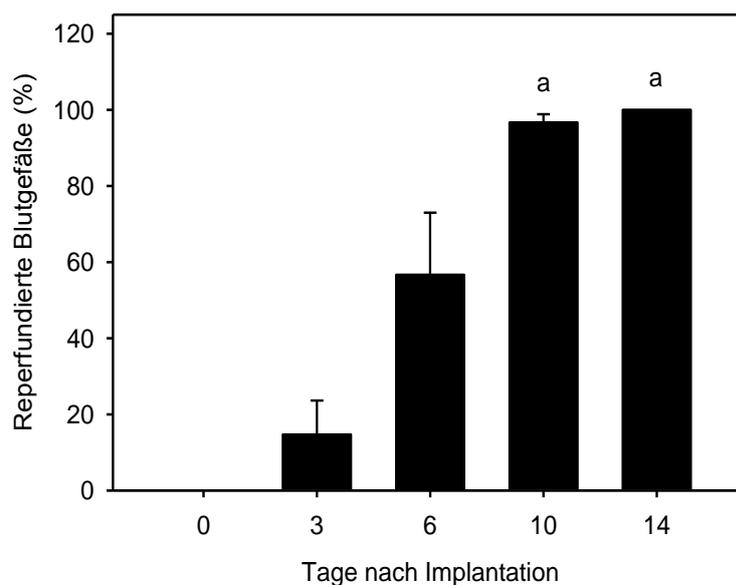
*Blutvolumenfluss ( $\mu\text{l/s}$ )*

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Kontrolle	--	1,8 $\pm$ 1,6	5,1 $\pm$ 2,0	6,9 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>
Prävaskularisiert	27,0 $\pm$ 9,1	92,8 $\pm$ 71,1*	101,0 $\pm$ 21,6*	137,7 $\pm$ 23,2*

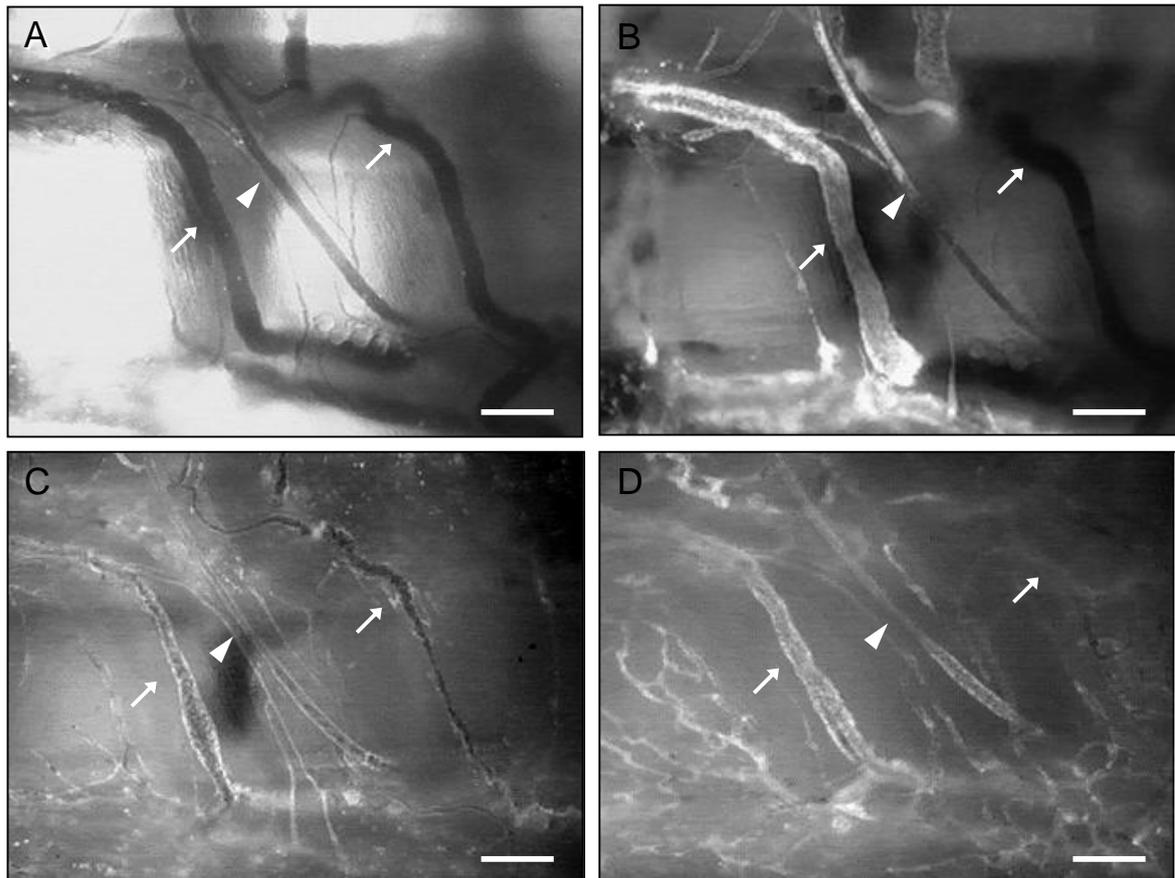
*Scherrate ( $\text{s}^{-1}$ )*

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Kontrolle	--	3,6 $\pm$ 2,2	12,6 $\pm$ 4,3	16,8 $\pm$ 4,1
Prävaskularisiert	12,1 $\pm$ 4,7	15,3 $\pm$ 6,3	28,8 $\pm$ 5,5*	62,9 $\pm$ 9,2*

**Tabelle 4:** Durchmesser ( $\mu\text{m}$ ), Fließgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ), Blutvolumenfluss ( $\mu\text{l/s}$ ) und Scherrate ( $\text{s}^{-1}$ ) perfundierter Blutgefäße innerhalb der „leeren“ Kontroll-Scaffolds und der prävasikularisierten Scaffolds an Tag 3, 6, 10 und 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer von Balb/c Mäusen. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. Tag 6; \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle zu identischen Zeitpunkten.



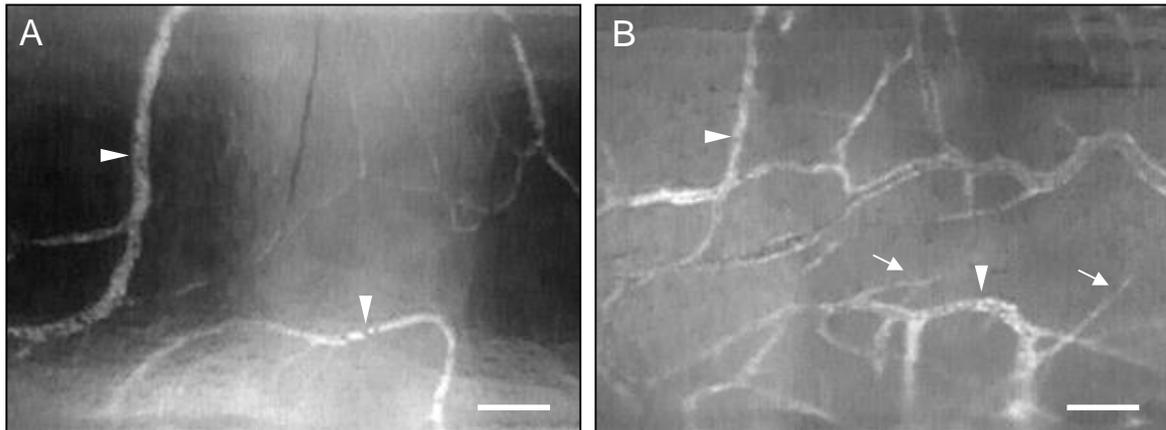
**Abbildung 27:** Anzahl der reperfundierten Blutgefäße (%) innerhalb der prävasikularisierten Scaffolds direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. Tag 0, 3 und 6.



**Abbildung 28:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie von 2 Venolen (Pfeile) sowie einer Arteriole (Pfeilspitze) innerhalb eines *in situ* prävascularisierten Scaffolds an Tag 3 (A), 6 (B), 10 (C) und 14 (D). Am 3. Tag erscheinen die Gefäße durch Negativkontrast während der intravitale Fluoreszenzmikroskopie dunkel, was durch ein Fehlen der FITC-Dextran-markierten Blutperfusion bedingt ist. Am 6. Tag sind die Gefäße schon teilweise kontrastiert. Am 10. und 14. Tag sind die Gefäße in Folge der wiederhergestellten Blutperfusion innerhalb des prävascularisierten Scaffolds komplett mit FITC-Dextran markiert. Maßstab: 140  $\mu$ m.

### 6.2.2.5. Angiogenese aus präformierten Blutgefäßen

Neben der Tatsache, dass die verbesserte Perfusion innerhalb der prävascularisierten Scaffolds auf die Reperfusion präformierter Blutgefäße zurückzuführen war, konnte man in der vorliegenden Arbeit auch beobachten, dass die präformierten Blutgefäße selbst Ursprung zusätzlicher Blutgefäßneubildung waren. Während des Beobachtungszeitraumes wuchsen Kapillarsprossen aus der Gefäßwand der präformierten Blutgefäße und bildeten so dichte, mikrovaskuläre Netzwerke innerhalb der Implantate aus (Abbildung 29). Dies trug wesentlich zur Steigerung der funktionellen Kapillardichte innerhalb der Gruppe der prävascularisierten Scaffolds bei. Im Vergleich dazu konnten neue Blutgefäße in der Kontrollgruppe lediglich vom Randbereich her in die Scaffolds einwachsen.



**Abbildung 29:** Intravitalmikroskopische Darstellung der Angiogenese aus präformierten Blutgefäßen innerhalb eines prävaskularisierten Scaffolds am Tag der Implantation in die Rückenhautkammer (**A**) sowie am 10. Tag (**B**). Die Gefäße stellen sich am Tag der Implantation in die Rückenhautkammer kontrastiert dar, da dem Spendertier vor der Entnahme des Scaffolds Kontrastmittel i.v. appliziert wurde. Dies resultierte in einer besseren Darstellung der Gefäße nach Einlage in die Rückenhautkammer. Die präformierten Gefäße sind an Tag 0 und 10 an gleicher Stelle im Scaffold (Pfeilspitzen) zu identifizieren und vollständig reperfundiert. Zusätzlich dienen sie als Ursprung neuer Gefäßsprossen (Pfeile) und tragen so zur Steigerung der funktionellen Kapillardichte im Zentrum des Scaffolds bei. Maßstab: 140 µm.

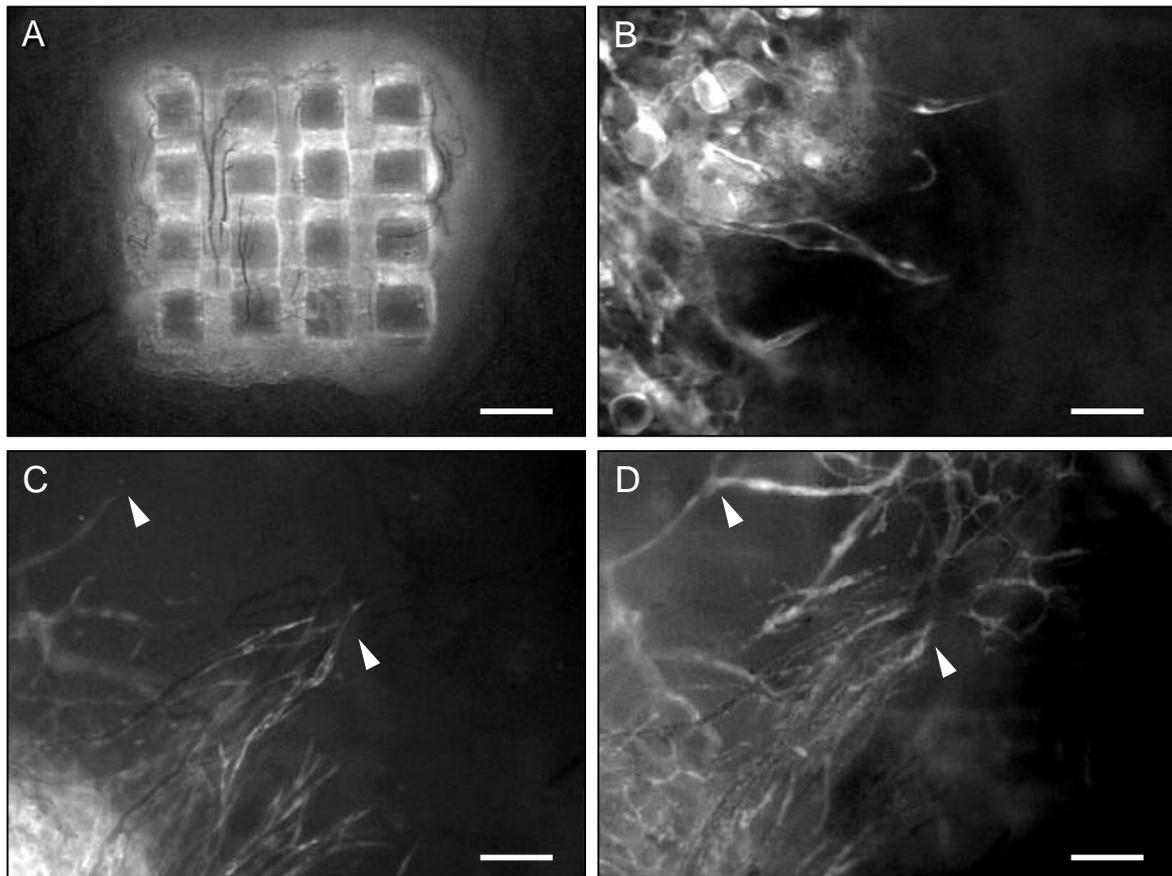
#### 6.2.2.6. Inoskulation

Die verbesserte Perfusion der *in situ* prävaskularisierten Scaffolds beruhte auf einer schnellen Reperfusion präformierter Blutgefäße durch Anastomosierung mit der Mikrozirkulation des Empfängertieres. Dabei fand sowohl eine interne als auch eine externe Inoskulation statt. Dies bedeutet, dass einerseits neue Blutgefäße aus dem Empfängerewebe in die Implantate einwuchsen (interne Inoskulation). Andererseits kam es auch zu einem Auswachsen der präformierten Blutgefäße aus dem Scaffold in die Umgebung, wo sie Verbindungen zu den Blutgefäßen des Empfängergewebes eingingen. Dies bezeichnet man als externe Inoskulation.

Durch Implantation prävaskularisierter Scaffolds aus GFP-transgenen Mäusen in die Wildtyp-Mäuse konnte dies mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie erstmals *in vivo* gezeigt werden (*Abbildung 30*).

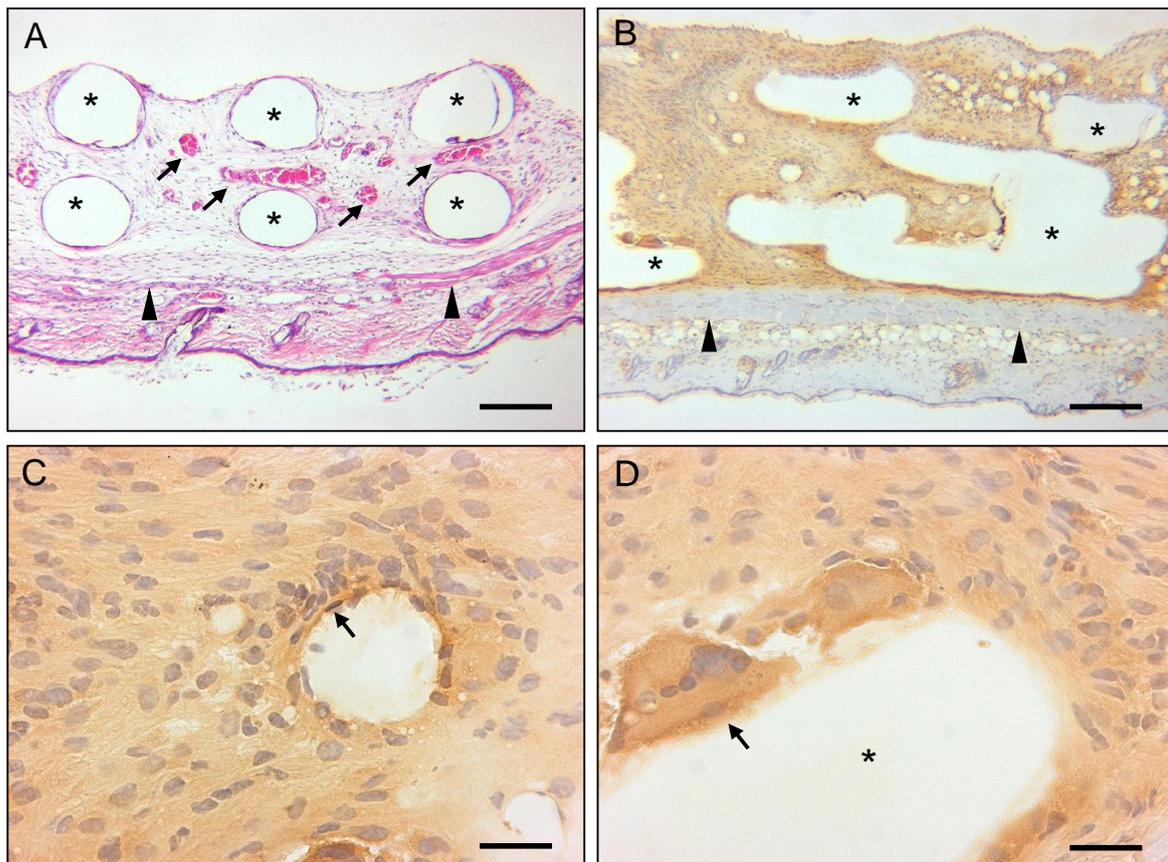
#### 6.2.3. Histologie und Immunhistochemie

Die lichtmikroskopische Untersuchung der histologischen Präparate der Rückenhautkammerpräparation bestätigte die intravitalmikroskopischen Ergebnisse. Die Stränge der *in situ* prävaskularisierten Scaffolds waren von einem Granulationsgewebe umgeben, das ein dichtes Netzwerk an Blutgefäßen aufwies.



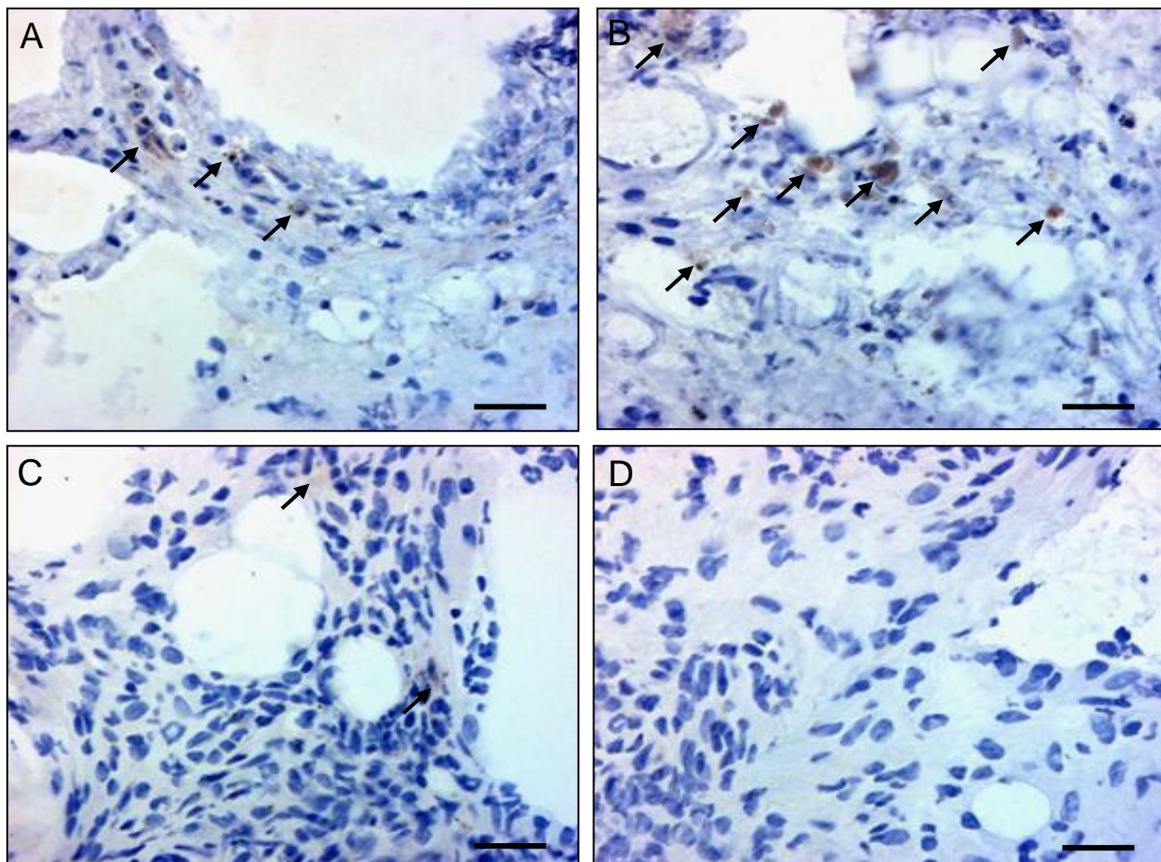
**Abbildung 30:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie eines in situ prävascularisierten Scaffolds, welches aus der Flanke einer GFP-transgenen C57BL/6 Spendermaus isoliert wurde. **A:** Tag 0 direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die Autofluoreszenz des transplantierten Gewebes zeigt sich in Blaulicht-Epi-Illumination ohne zusätzliche Kontrastverstärkung. Das Gewebe der Rückenhautkammer erscheint dunkel. **B:** An Tag 6 beobachtet man im Randbereich das Herauswachsen von GFP-positiven tubulären Strukturen aus dem Scaffold in Richtung des umliegenden Empfängergewebes. **C:** Die tubulären Strukturen sind an Tag 14 entsprechend weiter in das Gewebe des Empfängertieres vorgewachsen. **D:** Die tubulären Strukturen gehen Querverbindungen (Pfeilspitzen) mit den Gefäßen des Empfängergewebes ein. Diese Querverbindungen können durch Vergleich von zwei identischen mikroskopischen Beobachtungsfeldern in Blaulicht-Epi-Illumination vor (**C**) und nach i.v. Injektion von FITC-Dextran zur zusätzlichen Färbung der Gefäße des Empfängergewebes (**D**) direkt identifiziert werden. Maßstab: A = 600  $\mu\text{m}$ ; B = 320  $\mu\text{m}$ ; C, D = 160  $\mu\text{m}$ .

Interessanterweise zeigte die Analyse der prävascularisierten Scaffolds, welche aus den GFP-transgenen Spendermäusen isoliert wurden, dass nahezu alle Zellen dieses Gewebes auch nach 14-tägiger Implantation in die Rückenhautkammer noch vom Spendertier stammten und nicht durch Zellen des Empfängergewebes ersetzt wurden. Weder die Endothelzellen der präformierten Blutgefäße, noch multinukleäre Riesenzellen, welche sich an der Oberfläche der PLGA-Stränge anlagerten, stammten vom Empfängertier. Dies zeigt, dass das präformierte Gewebe innerhalb der Scaffolds seine Gewebeintegrität nach Implantation in die Rückenhautkammer erhalten konnte und vollständig in das Empfängergewebe integriert wurde (*Abbildung 31*).



**Abbildung 31:** Histologische und immunhistochemische Schnitte eines in situ prävascularisierten Scaffolds einer GFP-transgenen C57BL/6 Spendermaus an Tag 14 nach Implantation auf das quergestreifte Skelettmuskelgewebe (Pfeilspitzen) einer C57BL/6 Wildtyp-Empfängermaus. **A:** HE-Färbung: Die Scaffoldstränge (Sternchen) sind von Granulationsgewebe umgeben. Dieses weist ein dichtes Netzwerk mit groß-kalibrigen Blutgefäßen auf (Pfeile). **B:** Die immunhistochemische Detektion von GFP zeigt, dass nahezu alle Zellen des Granulationsgewebes von der Spendermaus stammen und nicht über den Zeitverlauf durch das Einwachsen von GFP-negativen Zellen des Empfängertieres ersetzt wurden. **C und D:** Detaildarstellung der immunhistochemischen GFP-Detektion. Ein Querschnitt durch ein Gefäß zeigt, dass auch die Endothelzellen (**C**, Pfeil) über den Zeitverlauf von 14 Tagen nach Implantation nicht durch Zellen des Empfängertieres ersetzt werden. Entsprechendes gilt auch für die multinukleären Riesenzellen an den PLGA-Strängen (**D**, Pfeil). Dies zeigt, dass das präformierte Gewebe nach Implantation in die Rückenhautkammer seine Integrität behält und dass das präformierte Gefäßnetzwerk über Inoskulation mit der Mikrozirkulation des Empfängergewebes reperfundiert wird. Maßstab: A, B = 250  $\mu$ m; C, D = 40  $\mu$ m.

Die Analyse des apoptotischen Zelltodes durch immunhistochemische Detektion von cleaved Caspase-3-positiven Zellen innerhalb des Granulationsgewebes der prävascularisierten Scaffolds zeigte insbesondere innerhalb der ersten 6 Tage nach Implantation eine Vielzahl apoptotischer Zellen (*Abbildung 32*). Im weiteren Verlauf reduzierte sich die Anzahl apoptotischer Zellen deutlich. Dies zeigt, dass die Perfusion innerhalb der Scaffolds während der ersten Tage nach Implantation in die Rückenhautkammer noch unzureichend war. Zu späteren Beobachtungszeitpunkten war die Perfusion ausreichend, um ein Zellüberleben zu gewährleisten.



**Abbildung 32:** Immunhistochemische Detektion cleaved Caspase-3-positiver apoptotischer Zellen (Pfeile) innerhalb des Granulationsgewebes eines in situ prävascularisierten Scaffolds an den Tagen 3 (A), 6 (B), 10 (C) und 14 (D) nach Implantation in die Rückenhautkammer. Insbesondere während der ersten 6 Tage nach Scaffold-Implantation zeigen sich viele apoptotische Zellen, während im weiteren Verlauf nur noch wenige zu finden sind. Maßstab: 45 µm.

### 6.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Vaskularisierung von PLGA-Scaffolds durch Bioaktivierung mittels Inkorporation der pro-angiogenen Extrazellulärmatrix Matrigel signifikant gesteigert werden kann.

Im Aortic Ring Assay stimulierte GFCM die Ausbildung eines Netzwerkes gefäßartiger Strukturen mit einer signifikant gesteigerten Sprossfläche und -dichte im Vergleich zu GFRM. *In vivo* verbesserte und beschleunigte die Inkorporation von GFCM in die Scaffoldporen das Einwachsen neuer Blutgefäße im Vergleich zu GFRM-Scaffolds und Matrigel-freien Kontroll-Scaffolds. Die angiogene Reaktion des Empfängergewebes während der ersten Tage nach Implantation war bei beiden Matrigeltypen gegenüber den

Kontroll-Scaffolds sowohl im Randbereich als auch im Zentrum gesteigert. Die funktionelle Kapillardichte am Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer war bei den GFCM-Scaffolds sowohl im Randbereich als auch im Zentrum gegenüber den beiden anderen Gruppen signifikant erhöht.

Die Kombination aus PLGA-Scaffolds und Matrigel, welches in die Poren der Scaffolds inkorporiert wurde, ist biokompatibel. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion war in allen drei Versuchsgruppen vergleichbar und es zeigten sich keine relevanten Unterschiede über den Zeitverlauf.

Die histologischen Untersuchungen bestätigten die intravitalmikroskopischen Ergebnisse. Das Granulationsgewebe um die Scaffoldstränge wies bei den GFCM-Scaffolds im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen mehr Blutgefäße auf. Die neugebildeten Gefäße innerhalb der GFCM-Scaffolds waren bereits ausgereift, was durch den immunhistochemischen Nachweis von Perizyten gezeigt werden konnte.

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Vaskularisierung implantierter PLGA-Scaffolds durch Inoskulation eines *in situ* präformierten mikrovaskulären Netzwerkes beschleunigt werden kann.

Die Analyse der für 20 Tage in die Flanke von Spendertieren implantierten, prä-vaskularisierten Scaffolds zeigte, dass sich in dieser Zeit ein komplettes, funktionelles mikrovaskuläres Netzwerk ausgebildet hatte. Nach Implantation in die Rückenhautkammer kam es im Randbereich, aber vor allem im Zentrum der prävaskularisierten Scaffolds, zu einer signifikant schnelleren Vaskularisierung verglichen mit den nicht prävaskularisierten PLGA-Scaffolds der Kontrollgruppe. Dementsprechend war die funktionelle Kapillardichte der prävaskularisierten Scaffolds gegenüber den Kontroll-Scaffolds deutlich erhöht. Die beschleunigte und verbesserte Perfusion der *in situ* prävaskularisierten Scaffolds war dadurch bedingt, dass das präformierte mikrovaskuläre Netzwerk durch Inoskulation mit den Gefäßen der Empfängertiere reperfundiert wurde. Zudem waren die präformierten Blutgefäße im Zentrum der Scaffolds selbst Ausgangspunkte für die Entwicklung neuer Blutgefäße, was zu einer weiteren Steigerung der funktionellen Kapillardichte im Zentrum der Implantate beitrug. Die Kontroll-Scaffolds wurden dagegen ausschließlich durch Einwachsen neuer Blutgefäße aus dem Randbereich der Scaffolds vaskularisiert, was eine deutlich längere Zeit benötigte.

Durch Implantation prävaskularisierter Scaffolds, welche aus der Flanke von GFP-transgenen Spendermäusen stammen, konnte gezeigt werden, dass Gefäße nicht nur vom Empfängertier in die Scaffolds einwachsen, sondern dass von den präformierten Ge-

fäßen ausgehend neue Mikrogefäße aus dem Scaffold herauswuchsen und die Anastomosierung der Gefäße des Spendergewebes mit denen des Empfängergewebes auch außerhalb der Implantate stattfand. Dies bezeichnet man als externe Inoskulation. Histologie und Immunhistochemie bewiesen, dass das präformierte Gewebe innerhalb der Scaffolds nach Implantation in die Rückenhautkammer seine Gewebeintegrität erhielt und vollständig in das Empfängergewebe integriert wurde.

## 7. DISKUSSION

### 7.1. Modell

Das Modell der Rückenhautkammer wurde seit seiner Erstbeschreibung durch Algire (1943) kontinuierlich weiterentwickelt. Es ist ein vielseitiges Modell zur Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Die Implantation einer Rückenhautkammer kombiniert mit der Technik der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, die gesamte Mikrozirkulation des quergestreiften Muskels *in vivo* zu analysieren (Lehr et al., 1993). Diese besteht aus Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen sowie Sammelvenolen. Ein weiterer wichtiger Vorteil des Modells ist die Möglichkeit, dass dynamische Prozesse über einen Zeitverlauf von 2-3 Wochen wiederholt untersucht werden können (Endrich et al., 1980).

Durch die Möglichkeit, das Deckglas des Beobachtungsfensters der Kammer temporär zu öffnen, eignet sich die Rückenhautkammer insbesondere für Implantations- und Transplantationsversuche. Entsprechend wurde das Modell in der Vergangenheit bereits genutzt, um den Prozess der Angiogenese nach Transplantation einer Vielzahl physiologischer Gewebe (Menger et al., 2001; Vollmar et al., 2001; Langer et al., 2002) und Tumore (Asaishi et al. 1981; Rupertus et al., 2009) zu untersuchen.

Neben Geweben können auch Biomaterialien, wie synthetische und biosynthetische Gefäßersatzmaterialien (Menger et al., 1992; Menger et al., 1990), azelluläre Matrices (Laschke et al., 2007c; Rücker et al., 2008) und metallische Implantate (Kraft et al., 2000; Kraft et al., 2005) mit dem Modell der Rückenhautkammer analysiert werden. Neben der angiogenen Gefäßreaktion ist hierbei die Untersuchung der Biokompatibilität der Implantate durch qualitative und quantitative Analysen der Entzündungsreaktion des Empfängerorgans ein wichtiger Aspekt.

Die Präparation der Rückenhautkammer bei der Maus ist gegenüber der Präparation beim Hamster manuell anspruchsvoller, da bei der Maus die einzelnen Gewebeschichten durch vermehrte intermuskuläre Gefäßverbindungen schwieriger voneinander zu trennen sind. Weiterhin sind die intravitalemikroskopischen Bilder beim Maus-Modell aufgrund geringerer Transluzenz des Gewebes schlechter kontrastiert. Der wesentliche Vorteil der Maus als Versuchstier besteht jedoch in der Verfügbarkeit zahlreicher, kommerziell erhältlicher An-

tikörper für immunhistochemische Färbungen sowie der Existenz spezifischer knock-out- und transgener Stämme. So wären ohne GFP-transgene Tiere wesentliche Fragestellungen zur Inokulation in der vorliegenden Arbeit nicht analysierbar gewesen (Laschke et al., 2008).

## 7.2. Scaffold und Herstellungstechnik

Mit Hilfe des Modells der Rückenhautkammer wurden bereits verschiedene Biomaterialien zur Frage ihrer Eignung als Scaffolds für das Tissue Engineering untersucht (Druecke et al., 2004; Rücker et al., 2008; Laschke et al., 2009).

Ein Biomaterial, welches wichtige Voraussetzungen für ein erfolgreiches muskuloskelettales Tissue Engineering erfüllt und bereits klinisch eingesetzt wird, ist das Biopolymer PLGA. Die Vorteile in der Materialverarbeitung und Verfügbarkeit sowie die steuerbare Biodegradierbarkeit des PLGAs sind seit langem bekannt (Agrawal et al., 2001). PLGA weist weiterhin eine gute Biokompatibilität auf (Rücker et al., 2006).

Bei den meisten Produktionsmethoden zur Herstellung von porösen Trägermaterialien, wie beispielsweise der Gassättigungstechnik (Nam et al., 2000), der Flüssiggießtechnik (Widmer et al., 1998), der Partikelwaschtechnik (Mikos et al., 1994) oder der Faserbindungstechnik (Mikos et al., 1994), besteht ein großer Nachteil darin, dass die Porengröße sehr heterogen ist und nur näherungsweise durch einen Mittelwert angegeben werden kann. Druecke et al. (2004) konnten jedoch zeigen, dass eine schnelle Neovaskularisierung eines Scaffolds nach Implantation entscheidend von dessen Porengröße abhängt. So kann bei einer Porengröße von 250-300  $\mu\text{m}$  eine optimale Vaskularisierung erzielt werden. Für die vorliegende Arbeit wurden Scaffolds mit einer Porengröße von  $\sim 300 \mu\text{m}$  produziert.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Techniken kann bei Verwendung der in dieser Arbeit angewendeten Rapid-Prototyping-Technik mit Hilfe eines 3D-Bioplotters die Porengröße des PLGAs exakt eingestellt werden. Ein weiterer Vorteil der Methode des 3D-Printings besteht darin, dass durch die computergestützte Programmierung und freie Beweglichkeit der Verteilerspritze des Bioplotters in allen drei Raumebenen Scaffolds in jeder dreidimensionalen Form hergestellt werden können (Landers et al., 2002). Dies ist insbesondere im Bereich der rekonstruktiven Chirurgie von klinischer Relevanz, da somit

die Möglichkeit besteht, größere Gewebedefekte durch maßgeschneiderte Scaffolds optimal auszufüllen.

## 7.3. Diskussion der Ergebnisse

### 7.3.1. Inkorporation von Matrigel in PLGA-Scaffolds

Eine schnelle und ausreichende Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte ist essentiell für einen erfolgreichen Transfer von Tissue Engineering in die klinische Praxis (Laschke et al., 2006). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Matrigel die Bildung neuer Blutgefäße innerhalb implantierter PLGA-Scaffolds beschleunigen kann. Dabei zeigte sich, dass die Inkorporation von GFCM in die Poren der Scaffolds das Einwachsen neuer Blutgefäße beschleunigt und zur Ausbildung eines reifen Gefäßnetzwerkes mit einer gesteigerten funktionellen Kapillardichte im Vergleich zu Matrigel-freien Kontroll-Scaffolds führt.

Matrigel ist bei 4°C flüssig und ändert seine Konsistenz bei 37°C in die Form eines Gels. Aus diesem Grund kann es einfach in die Poren von soliden Scaffoldmaterialien inkorporiert werden. In den Poren agiert es dann als Trägermatrix für angiogene Wachstumsfaktoren. Neben Wachstumsfaktoren besteht Matrigel im Wesentlichen aus Proteinen der Extrazellulärmatrix und fördert somit Zelladhäsion, Migration sowie Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellarten (Maxian et al., 1998; Kleinman et al., 2005).

Der wesentliche Vorteil von Matrigel ist, dass es eine Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren enthält. Hierzu zählen nicht nur Wachstumsfaktoren, welche die Angiogenese induzieren, wie VEGF (Yancopoulos et al., 2000), IGF-1 (Beckert et al., 2006) und EGF (van Crujisen et al., 2005), sondern auch Faktoren, welche die Reifung der neugebildeten Gefäße unterstützen, wie PDGF (Jain, 2003) und TGF- $\beta$  (Richardson et al., 2001). Entsprechend zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass die meisten Blutgefäße des neugeformten Granulationsgewebes in der Umgebung implantierter GFCM-Scaffolds im Gegensatz zu denen der Kontrolle und der GFRM-Gruppe von Perizyten umgeben waren.

In diesem Zusammenhang zeigten Koike et al. (2004), dass ein Mangel an Perizyten eine Regression neugebildeter Gefäße induzieren kann und dass die Stabilität der Gefäße wesentlich vom Reifegrad der Zellen abhängt, welche die Gefäßwand umgeben.

So berichten Benjamin et al. (1998), dass sich unreife Gefäße zurückbilden, sobald sie einer Hyperoxie ausgesetzt sind. Allerdings kann VEGF-A diese Rückbildung verhindern und unterstützt das Überleben und weitere Wachstum Perizyten-freier Gefäße. Demzufolge ist die Herstellung von länger bestehenden vaskulären Netzwerken insbesondere von den angiogenen Faktoren VEGF und PDGF abhängig. Dies kann die Beobachtung erklären, dass die neugeformten Gefäßnetzwerke der GFCM-Scaffolds an späteren Beobachtungszeitpunkten im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen eine signifikant höhere funktionelle Gefäßdichte aufwiesen.

Interessanterweise war in der vorliegenden Arbeit die Vaskularisierung der PLGA-Scaffolds im Vergleich zur Kontrolle nicht nur in der GFCM-Gruppe, sondern auch in der GFRM-Gruppe beschleunigt. Dies zeigt, dass im vorliegenden Modell schon relativ geringe Mengen an Wachstumsfaktoren in den Scaffolds in der Lage waren, Angiogenese in der Rückenhautkammer zu induzieren. Dementsprechend stimulierten auch beide Matrigel-Typen das Aussprossen von tubulären Strukturen im Aortic Ring Assay. Allerdings zeigte sich bei GFRM-eingebetteten Ringen verglichen mit GFCM-eingebetteten Ringen eine signifikant geringere Sprossdichte. Diese *in vitro*-Ergebnisse korrelieren folglich sehr gut mit den Implantationsexperimenten. Somit ist der Aortic Ring Assay ein *in vitro*-Assay, der die Angiogenese unter *in vivo* Bedingungen adäquat widerspiegelt (Auerbach et al., 2003). Dies beruht unter anderem auf der Tatsache, dass im Aortic Ring Assay auch die perivaskulären nicht-endothelialen Wandzellen enthalten sind. Zusätzlich sind die Endothelzellen der Aortenringe nicht vorselektiert und befinden sich zum Zeitpunkt der Explantation nicht in einem proliferativen Zustand (Kleinman et al., 2005). Zusammenfassend könnte der Aortic Ring Assay daher in zukünftigen Studien dazu verwendet werden, die Zusammensetzung angiogener Wachstumsfaktoren in Matrigel oder anderen extrazellulären Matrices zu optimieren, bevor diese in Scaffolds inkorporiert werden, um somit die Vaskularisierung von Gewebekonstrukten weiter zu verbessern. Dies ist durchaus notwendig, da in der vorliegenden Arbeit auch die GFCM-Scaffolds während der ersten Tage nach Implantation keine ausreichende Kapillarperfusion aufwiesen, um ein optimales Überleben von Zellen zu gewährleisten.

Zwischen den Tagen 6 und 14 nach Implantation der Scaffolds wurden punktförmige Hämmorrhagien innerhalb des Granulationsgewebes in den Poren der GFCM und GFRM-Scaffolds beobachtet. Diese Extravasation von Erythrozyten ist ein typisches Merkmal früher Angiogenese. Angeregt durch die Stimulation mit VEGF beginnen die

Endothelzellen der vorbestehenden Blutgefäße ihre Basalmembran durch Freisetzung von Metalloproteinasen zu zersetzen (Carmeliet, 2000). Die herabgesetzte Integrität der Gefäßwände führt zum einen zu einem Austritt von Erythrozyten, welche makroskopisch als Hämorrhagien sichtbar werden. Zum anderen erlaubt dies aktivierten Endothelzellen in das umgebende Gewebe zu migrieren, was zur Ausbildung von Gefäßknospen und -sprossen führt.

Das vermehrte Auftreten von Hämorrhagien in beiden Matrigel-Gruppen im Vergleich zur Kontrolle ist wahrscheinlich durch erhöhte VEGF-Level in den Matrigel-Scaffolds bedingt. Obwohl GFRM und GFCM nur relativ geringe Dosen VEGF enthalten (~1,25 und ~6,00 ng/ml), kann die effektive Gesamtkonzentration an VEGF in den implantierten Scaffolds höher sein, weil die Wachstumsfaktoren IGF-1 und EGF zusätzlich die VEGF-Expression steigern (Beckert et al., 2006; van Crujisen et al., 2005).

Rücker et al. (2006) zeigten bereits, dass PLGA-Scaffolds nach Implantation in die Rückenhautkammer eine gute Biokompatibilität aufweisen, die mit isogenem Knochen vergleichbar ist. In der vorliegenden Arbeit löste die zusätzliche Inkorporation von Matrigel in PLGA-Scaffolds keine vermehrte Entzündungsreaktion im Empfängergewebe aus. Es wurde eine physiologische Interaktion der Leukozyten mit dem Gefäßendothel bei konstanten mikrohämodynamischen Bedingungen beobachtet. Zusätzlich war bei den histologischen Analysen keine erhöhte Anzahl CAE-positiver Leukozyten im Granulationsgewebe der GFCM-Scaffolds im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen nachweisbar.

Dies überrascht, da in einer früheren Studie demonstriert werden konnte, dass PDGF über Chemotaxis Monozyten und neutrophile Granulozyten anlockt (Deuel et al., 1982). Allerdings konnte die Migration von Neutrophilen in dieser Studie nur bei relativ hohen Dosen nachgewiesen werden (~1 ng/ml). Das GFCM im vorliegenden *in vivo*-Versuch wies lediglich eine Konzentration von ~12 pg/ml PDGF auf, was wahrscheinlich nicht ausreicht um diese Zellpopulation zu aktivieren.

Zusammenfassend konnte im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Einwachsen von Gefäßen in poröse PLGA-Scaffolds durch Inkorporation von GFCM verbessert wird, ohne deren Biokompatibilität negativ zu beeinträchtigen. Obwohl Matrigel aus entartetem Gewebe von Maussarkomen isoliert wird und somit nicht vorbehaltlos klinisch eingesetzt werden kann, verdeutlicht dieser Versuch, dass die Kombination aus pro-angiogenen Extrazellulärmatrizes mit soliden Scaffold-Biomaterialien

einen vielversprechenden neuen Ansatz zur Verbesserung der Vaskularisierung von Gewebe-konstrukten im Tissue Engineering darstellt.

### 7.3.2. Inoskulation prävaskularisierter Scaffolds

In diesem Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass ein *in situ* prä-formiertes und funktionsfähiges, mikrovaskuläres Netzwerk innerhalb eines implantierten Scaffolds in der Lage ist, Querverbindungen zu den Mikrogefäßen des Empfänger-gewebes auszubilden. Dies führt im Vergleich zu avaskulären Implantaten zu einer deutlich beschleunigten und verbesserten Vaskularisierung und Blutperfusion.

Dementsprechend stellt die Herstellung eines dreidimensionalen Gewebekonstruktes mit einem eigenen mikrovaskulären Netzwerk einen vielversprechenden Ansatz dar, um eine frühe Blutversorgung für die Zellen zu gewährleisten, welche im Zentrum von Konstrukten lokalisiert sind.

In der Vergangenheit konzentrierten sich die meisten Studien auf die Etablierung neuer Strategien zur Verbesserung des Einwachsens neuer Blutgefäße durch Angiogenese aus dem umliegenden Gewebe in implantierte Gewebekonstrukte (Laschke et al., 2006). Es ist jedoch ersichtlich, dass die Stimulation der Angiogenese allein nicht genügt, um eine ausreichend schnelle Scaffold-Vaskularisierung zu erzielen. Dies liegt daran, dass der Prozess der Angiogenese ein komplexer, mehrstufiger Vorgang ist, der durch eine koordinierte Abfolge von verschiedenen humoralen und zellulären Interaktionen charakterisiert ist (Risau, 1997; Carmeliet, 2000). Dabei stimulieren erhöhte Konzentrationen angiogener Wachstumsfaktoren das Gefäßendothel dazu, seine Basalmembran durch Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen zu zersetzen. Dies ist Voraussetzung für die darauffolgende Migration einzelner Endothelzellen in das umgebende Interstitium, was zur Ausbildung von Kapillarknospen und -sprossen führt. Die Kapillarsprossen wachsen aufeinander zu, verbinden sich und formen so perfundierte Blutgefäßnetzwerke. Im letzten Schritt wird die Wand der neuen Mikrogefäße durch die Rekrutierung glatter Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten sowie durch die Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix stabilisiert. Die Abfolge dieser einzelnen Schritte benötigt Zeit. Dementsprechend sind erste Zeichen von Angiogenese, wie zum Beispiel die Bildung von Kapillarsprossen, im Empfänger-gewebe der Rückenhautkammer frühestens 2-3 Tagen nach Transplantation von frisch isolierten Gewebetransplantaten (Menger et al., 2001; Vollmar et al., 2001; Laschke et al., 2007a) oder Implantation von verschiedenen Biomaterialien (Rücker et al., 2008; Laschke et al., 2005; Laschke et al., 2007c) sichtbar. Die komplette Vaskularisierung eines

implantierten Scaffolds durch Angiogenese benötigt daher einen relativ langen Zeitraum. Dies zeigt sich in der vorliegenden Arbeit anhand der Ergebnisse der Kontrollgruppe.

Eine Beschleunigung der Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte kann durch die Herstellung eines intrinsischen mikrovaskulären Netzwerkes *in vitro* durch Besiedlung von Scaffolds mit Endothelzellen erreicht werden (Tremblay et al., 2005; Choong, et al., 2006; Unger et al., 2007). Alternativ können isolierte endotheliale Progenitorzellen verwendet werden (Zhang et al., 2011). Während der letzten Jahre konnte in einer Reihe experimenteller *in vivo*-Studien gezeigt werden, dass diese Progenitorzellen in der Blutbahn zirkulieren. Sie können Angiogenese und Vaskulogenese an Orten kritischer Perfusion und Hypoxie induzieren, wie beispielsweise beim Myokardinfarkt, Schlaganfall oder der Extremitätenischämie (Asahara et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass kultivierte endotheliale Progenitorzellen in die für Blutgefäße wesentlichen Zelllinien, wie Endothelzellen, Perizyten und glatte Muskelzellen, differenzieren können (Yamashita et al., 2000). Progenitorzellen haben im Gegensatz zu Endothelzellen den wesentlichen Vorteil, dass sie nicht immunogen sind und über eine höhere proliferative Kapazität verfügen. Weiterhin können sie in einer Menge und Qualität isoliert werden, welche ausreichend wäre, um damit auch größere Gewebekonstrukte zu besiedeln. Hierfür wurden in der Vergangenheit eine Reihe von Besiedlungsmethoden für dreidimensionale Scaffolds etabliert (Burg et al., 2000; Wendt et al., 2003). Allerdings ist es nach wie vor schwierig, eine homogene Verteilung von Endothel- oder endothelialen Progenitorzellen in den Scaffolds zu erreichen. Außerdem führt die Besiedlung von Scaffolds mit diesen Zellen *in vitro* nicht zwingend zur Ausbildung eines funktionellen mikrovaskulären Netzwerkes.

Alternativ kann ein mikrovaskuläres Netzwerk *in situ* innerhalb eines Gewebekonstruktes generiert werden, wie das Beispiel des arteriovenösen Loop-Modells belegt (Kneser et al., 2006; Lokmic et al., 2007; Morrirt et al., 2007). Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass der Körper selbst durch angiogene Prozesse ein neues mikrovaskuläres Netzwerk ausbildet, welches aus voll funktionsfähigen, perfundierten Mikrogefäßen besteht.

Zur Generierung eines mikrovaskulären Netzwerkes wurden in der vorliegenden Arbeit Scaffolds in subkutane Taschen von isogenen Spendertieren implantiert, damit diese dort prävasikularisieren konnten. Die Implantation dieser *in situ* prävasikularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer von Empfängertieren stellte dabei einen optimalen Ansatz dar, um die Interaktion zwischen präformierten Gefäßen der Scaffolds mit denen des Empfängertieres unter kontrollierten Bedingungen zu analysieren. Hierzu wurde die Technik der

intravitale Fluoreszenzmikroskopie mit Transplantationsexperimenten in GFP-transgenen Mäusen kombiniert. Dies ermöglichte es erstmalig, direkt Querverbindungen des intrinsischen Gefäßnetzwerkes der Scaffolds mit den Mikrogefäßen des Empfängers zu visualisieren. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass sowohl alle präformierten Venolen als auch Arteriolen innerhalb der prävaskularisierten Scaffolds bis zum 14. Tag reperfundiert waren.

Weiterhin zeigte die histologische Analyse der prävaskularisierten Scaffolds am Tag 14, dass nahezu alle Zellen des Gewebes vom Spendertier stammen. Dies gilt auch für die Endothelzellen der präformierten Blutgefäße, was beweist, dass sie über den Beobachtungszeitraum nicht durch Zellen des Empfängertieres ersetzt wurden.

Die präformierten Gefäße überlebten wahrscheinlich durch Sauerstoffdiffusion aus den Gefäßen des umgebenden Empfängergewebes. Allerdings ist der Vorgang der Diffusion auf eine Strecke von ~150-200 µm limitiert (Folkman et al., 1973). Die Nährstoffversorgung über Diffusion kann somit nur bei Zellen auf der Unterseite sowie im Randbereich der Scaffolds erfolgt sein, nicht jedoch bei Zellen im Zentrum der implantierten Konstrukte. Dort müssen andere Mechanismen das Zellüberleben gesichert haben. Diesbezüglich werden in der Literatur verschiedene Hypothesen diskutiert. Die Endothelzellen innerhalb der prävaskularisierten Scaffolds könnten während der ersten Tage nach Implantation durch Apoptose zugrunde gegangen sein. Basalmembran und Perizyten könnten aber überlebt und als Leitschiene für eine Reendothelialisierung gedient haben, wie es für frei transplantierte Langerhans'sche Inseln oder Hauttransplantate beschrieben wurde (Lukinius et al., 1995; Demarchez et al., 1987). Das geschädigte Endothel könnte sich so nach Inoskulation und Reperfusion wieder regenerieren. Dies entspräche einer eher passiven Funktion der präformierten Blutgefäße, die lediglich als Leitschiene dienen würden. Capla et al. (2006) zeigten, dass nach Hauttransplantation von Wildtyp- auf transgene Mäuse im Randbereich der Transplantate eine Regression der Spendergefäße stattfindet. Anschließend folgt ein Einwachsen von Mikrogefäßen des Empfängertieres dem ischämischen Stimulus folgend entlang der vorbestehenden Gefäßkanäle in die Transplantate hinein im Sinne eines Replacements. In zentraleren Regionen der Transplantate bilden sich dann Querverbindungen zwischen den Spender- und Empfängergefäßen aus, wodurch nach 21 Tagen letztlich der komplette Blutfluss innerhalb der Transplantate wieder hergestellt ist. Hierbei fand die Inoskulation also innerhalb der Transplantate statt, was dem Mechanismus einer internen Inoskulation entspräche (Laschke et al., 2009).

Bei den oben beschriebenen Revaskularisierungsprozessen haben die präformierten Blutgefäße des Spendergewebes eine passive Funktion. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass das präformierte Gefäßnetzwerk auch aktiv zur Revaskularisierung beitragen kann. Durch Implantation von *in situ* prävaskularisierten PLGA-Scaffolds GFP-transgener Mäuse in die Rückenhautkammer von Wildtyp-Empfängertieren wurde mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie erstmalig visuell dargestellt, dass GFP-positive Mikrogefäße aus den Scaffolds heraus in Richtung des umgebenden Empfängergewebes wuchsen. Es konnte beobachtet werden, dass sich außerhalb der Scaffolds Querverbindungen zwischen GFP-positiven Blutgefäßen und GFP-negativen Empfängergefäßen ausbildeten. Diese Beobachtung entspricht einer externen Inoskulation.

Diese teils widersprüchlichen Resultate verdeutlichen, dass die Rolle von präformierten Blutgefäßen im Prozess der Vaskularisierung von Gewebekonstrukten noch nicht gänzlich verstanden ist. Sicher ist jedoch, dass die präformierten Gefäße mehr als nur eine Leitstruktur für das Einwachsen neuer Blutgefäße darstellen. Unter bestimmten Bedingungen können sie auch der Ursprung neuer Blutgefäße sein. Damit dies erfolgen kann, muss die angiogene Aktivierung der präformierten mikrovaskulären Netzwerke stark genug sein, um die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren, bevor die Angiogenese von Seiten des Empfängergewebes initiiert wird (Laschke et al., 2009). Hierbei sind viele Faktoren von Bedeutung wie das Ausmaß der Gewebehypoxie in den Konstrukten, der Reifungsgrad der präformierten Blutgefäße sowie die Art und der Grad der Entzündungsreaktion des Empfängergewebes auf die Implantate.

Neben dem Mechanismus der Inoskulation trugen die präformierten Blutgefäße durch Angiogenese zu einer weiteren Steigerung der funktionellen Kapillardichte innerhalb der Scaffolds bei. So waren sie nach Implantation in die Rückenhautkammer Ursprung neuer Gefäßsprossen innerhalb der Scaffolds. Diese Beobachtung kann darauf zurückgeführt werden, dass die Zellen in dem präformierten Gewebe unmittelbar nach Implantation einer Hypoxie ausgesetzt waren, was zu einer HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) gesteuerten Überexpression und Freisetzung von pro-angiogenen Faktoren wie VEGF führte (Shi et al., 2004). Andererseits könnte der hohe Blutfluß innerhalb der reperfundierten Mikrogefäße Scherstress-induzierte Angiogenese stimuliert haben (Brown et al., 2003). Obwohl im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Vaskularisierung von Scaffolds durch *in situ* Generierung eines präformierten mikrovaskulären Netzwerkes signifikant gesteigert werden kann, beobachtete man die Reperfusion der präformierten Blut-

gefäße nicht vor dem 3. bis 6. Tag nach Implantation. Während dieser Zeitspanne stieg die Zahl apoptotischer Zellen innerhalb des Granulationsgewebes um die Scaffoldstränge. Dies weist darauf hin, dass die Zeitspanne für die Ausbildung von Querverbindungen zwischen den Gefäßnetzwerken des Implantates und des Empfängergewebes noch zu lang ist, um ein Überleben aller Zellen innerhalb der Implantate zu garantieren. Andererseits sind die präformierten Blutgefäße offensichtlich dazu in der Lage, diese initiale Phase der Ischämie von drei Tagen trotz der fehlenden Perfusion zu überleben.

Obwohl die Prävascularisierung von Gewebekonstrukten beim Tissue Engineering einen vielversprechenden Ansatz darstellt, die Blutversorgung der Konstrukte durch Inoskulation zu beschleunigen, sind neue Strategien erforderlich, um diesen Prozess weiter zu optimieren. Dies könnte beispielsweise durch die Induktion der Angiogenese innerhalb des Empfängergewebes vor Implantation der Konstrukte erreicht werden. Hierdurch würde sich die Anzahl der aktivierten Blutgefäße erhöhen, welche Gefäßsprossen ausbilden, um mit den Mikrogefäßen des Implantats Querverbindungen einzugehen. Zu diesem Zweck könnte das Empfängergewebe durch wiederholte Injektionen mit pro-angiogenen Wachstumsfaktoren oder Einbringen von Wachstumsfaktor-enthaltenden Gelen, wie beispielsweise aktiviertem Plättchen-reichem Plasma, vorbehandelt werden (Eppley et al., 2006).

Alternativ könnte der Verlust an funktionsfähigen Zellen innerhalb der Gewebekonstrukte durch Steigerung der ischämischen Toleranz über verschiedene Präkonditionierungsstrategien minimiert werden (Pasupathy et al., 2005).

Zusammenfassend konnte in diesem Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Inoskulation eines *in situ* präformierten funktionsfähigen mikrovaskulären Netzwerkes mit der Mikrozirkulation des Empfängergewebes einen vielversprechenden Ansatz darstellt, um die Vaskularisierung und Blutperfusion von Gewebekonstrukten zu verbessern.

## 7.4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit werden zwei vielversprechende Ansätze beschrieben, welche die Vaskularisierung von PLGA-Scaffolds für das Tissue Engineering beschleunigen und verbessern können.

Im ersten Studienabschnitt konnte gezeigt werden, dass dies durch Inkorporation einer pro-angiogenen Extrazellulärmatrix in die Scaffoldsporen erreicht werden kann. Eine Vaskularisierung durch Einwachsen von Blutgefäßen aus dem umliegenden Empfänger-gewebe ist jedoch insbesondere bei größeren Gewebekonstrukten nicht ausreichend. Eine mögliche Alternative ist die Inkorporation einer pro-angiogenen Extrazellulärmatrix, welche zuvor mit Endothelzellen oder endothelialen Progenitorzellen angereichert wird. Durch Kultivierung solcher Konstrukte wäre es möglich, Gefäßvorläufer zu generieren. Parallel hierzu könnten die Scaffolds bereits mit den später funktionstragenden Zellen besiedelt werden, wie beispielsweise Osteoblasten beim muskuloskelettalen Tissue Engineering.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, wie schnell ein präformiertes, funktionelles mikrovaskuläres Netzwerk innerhalb eines Scaffolds durch Inoskulation mit den Gefäßen des Empfängers nach Implantation reperfundiert werden kann. Trotz der deutlich verbesserten und schnelleren Reperfusion beobachtete man jedoch auch hier während der ersten Tage nach Implantation vermehrt apoptotische Zellen in den Konstrukten. Dies ist bedingt durch den Nährstoffmangel innerhalb des transplantierten Gewebes bis zur Reperfusion. Eine Strategie zur Verbesserung des Zellüberlebens innerhalb von Gewebekonstrukten wäre eine Vorbehandlung des zu transplantierenden Gewebes zur Toleranzsteigerung der Zellen gegenüber Sauerstoffmangel. Dies könnte beispielsweise durch ischämische Präkonditionierung (Pasupathy et al., 2005), Vorbehandlung durch Hitzeschock (Rücker et al., 2005) oder Isofluran (Feng et al., 2011) erfolgen.

Ein anderer Ansatz wäre es, die Gefäße im Empfängergewebe bereits einige Tage vor der Implantation eines zellbesiedelten Scaffolds zu aktivieren, um sie so in einen proliferativen Zustand zu versetzen. Dies könnte durch die Applikation von Wachstumsfaktor-enthaltenden Gelen erfolgen. Ein vielversprechendes Beispiel hierfür ist Plättchen-reiches Plasma (Eppley et al., 2006). Dieses ist klinisch gut verfügbar und einfach aufzubereiten. Mit handelsüblichen Sets könnte den Patienten aus einer peripheren Vene Blut entnommen werden, um es anschließend durch Zentrifugation anzureichern (Arthrex-Autologous

Conditioned Plasma®). Das entstehende Plättchen-reiche Plasma könnte dann an die spätere Implantationstelle von Gewebekonstrukten appliziert werden.

Eine schnelle und ausreichende Perfusion ist insbesondere bei größeren Gewebekonstrukten für einen erfolgreichen Transfer des Tissue Engineerings in die klinische Praxis essentiell. Nur so wird ein optimales Überleben der Zellen innerhalb der transplantierten Konstrukte gewährleistet. Im Bereich der rekonstruktiven Chirurgie könnten Gewebedefekte, beispielsweise am Knochen, durch eine Computertomografie exakt erfasst und vermessen werden. Aus diesem Datensatz könnte dann durch entsprechende Techniken wie dem 3D-Biplotting passgenau Scaffolds hergestellt werden. Die Scaffolds könnten anschließend mit Zellen besiedelt werden, welche in das gewünschte Gewebe differenzieren. Parallel dazu könnte ein mikrovaskuläres Netzwerk *in vitro* generiert werden. Nach Vorbereitung des Empfängergewebes würde dann in einem einmaligen chirurgischen Eingriff die Implantation der Konstrukte erfolgen.

Das Tissue Engineering ist ein noch junges, interdisziplinäres Feld, welches jedoch enormes Potential besitzt. Bei Erfolg der oben beschriebenen Methoden wäre der aktuell bestehende Mangel an adäquatem Ersatzgewebe behoben. Aufwendige Eingriffe zur Gewinnung des benötigten Gewebes mit entsprechenden Komorbiditäten, wie beispielsweise ein Lappenhebedefekt in der plastischen Chirurgie oder die Entnahme eines trikortikalen Beckenkammspanes in der orthopädisch-rekonstruktiven Chirurgie, wären somit zukünftig vermeidbar.

## 8. LITERATUR

1. **Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT.** Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445-450, 1994.
2. **Agrawal CM, Ray RB.** Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 55: 141-150, 2001.
3. **Algire GH.** An adaption of the transparent-chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Int* 4: 1, 1943.
4. **Asahara T, Kawamoto A.** Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: 572-579, 2004.
5. **Asaishi K, Endrich B, Gotz A, Messmer K.** Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res* 41: 1898-1904, 1981.
6. **Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N.** Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 49: 32-40, 2003.
7. **Baker M, Wayland H.** On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7: 131-143, 1974.
8. **Beckert S, Farrahi F, Perveen Ghani Q, Aslam R, Scheuenstuhl H, Coerper S, Konigsrainer A, Hunt TK, Hussain MZ.** IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 67-72, 2006.
9. **Benjamin LE, Hemo I, Keshet E.** A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125: 1591-1598, 1998.
10. **Borges J, Tegtmeier FT, Padron NT, Mueller, MC, Lang EM, Stark GB.** Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. *Tissue Eng* 9: 441-450, 2003.
11. **Brown MD, Hudlicka O.** Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* 6: 1-14, 2003.
12. **Burg KJ, Holder WD Jr, Culberson CR, Beiler RJ, Greene KG, Loeb sack AB, Roland WD, Eiselt P, Mooney DJ, Halberstadt CR.** Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. *J Biomed Mater Res* 51: 642-649, 2000.

13. **Capla JM, Ceradini DJ, Tepper OM, Callaghan MJ, Bhatt KA, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC.** Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. *Plast Reconstr Surg* 117: 836-844, 2006.
14. **Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395, 2000.
15. **Carvalho C, Landers R, Hübner U, Mülhaupt R, Schmelzeisen R.** Fabrication of soft and hard biocompatible scaffolds using 3D-Bioplotting™. In: Bártolo PJ et al, *Virtual Modelling and Rapid Prototyping - Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping*, 97-102, 2005.
16. **Choong CS, Hutmacher DW, Triffitt JT.** Co-culture of bone marrow fibroblasts and endothelial cells on modified polycaprolactone substrates for enhanced potentials in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 12: 2521-2531, 2006.
17. **Colton CK.** Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant* 4: 415-436, 1995.
18. **Deasy BM, Li Y, Huard J.** Tissue engineering with muscle-derived stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 15: 419-423, 2004.
19. **Demarchez M, Hartmann DJ, Prunieras M.** An immunohistological study of the revascularization process in human skin transplanted onto the nude mouse. *Transplantation* 43: 896-903, 1987.
20. **Deuel TF, Senior RM, Huang JS, Griffin GL.** Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 69: 1046-1049, 1982.
21. **Dolderer JH, Abberton KM, Thompson EW, Slavin JL, Stevens GW, Penington AJ, Morrison WA.** Spontaneous large volume adipose tissue generation from a vascularized pedicled fat flap inside a chamber space. *Tissue Eng* 13: 673-681, 2007.
22. **Dragoo JL, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhu M, Zuk PA, Benhaim P.** Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue Eng* 13: 1615-1621, 2007.
23. **Druecke D, Langer S, Lamme E, Pieper J, Ugarkovic M, Steinau HU, Homann HH.** Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A* 68: 10-18, 2004.
24. **Dvorak HF.** Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315: 1650-1659, 1986.
25. **Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K.** Technical report- a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177: 125-134, 1980.
26. **Ennett AB, Kaigler D, Mooney DJ.** Temporally regulated delivery of VEGF in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* 79: 176-184, 2006.

27. **Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton, M.** Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 118: 147-159, 2006.
28. **Feng J, Zuo Z.** Isoflurane preconditioning increases endothelial cell tolerance to in-vitro simulated ischaemia. *J Pharm Pharmacol* 63: 106-110, 2011.
29. **Folkman J, Hochberg M.** Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 138: 745-753, 1973.
30. **Folkman J.** Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43: 175-203, 1985.
31. **Freyman TM, Yannas IV, Yokoo R, Gibson LJ.** Fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix. *Biomaterials* 22: 2883-2891, 2001.
32. **Griffith LG.** Polymeric Biomaterials. *Acta Materialia* 48: 263-277, 2000.
33. **Helenius G, Backdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B.** In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A* 76: 431-438, 2006.
34. **Hodde J.** Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. *Tissue Eng* 8: 295-308, 2002.
35. **Hollister SJ.** Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 4: 518-524, 2005.
36. **Jain RK.** Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-693, 2003.
37. **Jiang J, Kojima N, Guo L, Naruse K, Makuuchi M, Miyajima A, Yan W, Sakai Y.** Efficacy of engineered liver tissue based on poly-L-lactic acid scaffolds and fetal mouse liver cells cultured with oncostatin M, nicotinamide, and dimethyl sulfoxide. *Tissue Eng* 10: 1577-1586, 2004.
38. **Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS.** Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 5: 1418-1423, 1999.
39. **Kanczler JM, Oreffo RO.** Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 15: 100-114, 2008.
40. **Kim BS, Mooney DJ.** Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 16: 224-230, 1998.
41. **Kleinman HK, Martin GR.** Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 15: 378-386, 2005.
42. **Kneser U, Polykandriotis E, Ohnolz J, Heidner K, Grabingem L, Euler S, Amann KU, Hess A, Brune K, Greil P.** Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop. *Tissue Eng* 12: 1721-1731, 2006.

43. **Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK.** Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* 428: 138-139, 2004.
44. **Kraft CN, Burian B, Diedrich O, Gessmann J, Wimmer MA, Pennekamp PH.** Microvascular response of striated muscle to common arthroplasty-alloys: A comparative in vivo study with CoCrMo, Ti-6Al-4V, and Ti-6Al-7Nb. *J Biomed Mater Res A* 75: 31-40, 2005.
45. **Kraft CN, Hansis M, Arens, S, Menger MD, Vollmar B.** Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res* 49: 192-199, 2000.
46. **Klyscz T, Junger M, Jung F, Zeintl H.** Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168-175. 1997.
47. **Kojima T, Chang JH, Azar DT.** Proangiogenic role of ephrinB1/EphB1 in basic fibroblast growth factor-induced corneal angiogenesis. *Am J Pathol* 170: 764-773, 2007.
48. **Kremer M, Lang E, Berger AC.** Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix(Integra artificial skin). *Br J Plast Surg* 53: 459-465, 2000.
49. **Krishnan L, Hoying JB, Nguyen H, Song H, Weiss JA.** Interaction of angiogenic microvessels with the extracellular matrix. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: 3650-3658, 2007.
50. **Landers R, Hubner U, Schmelzeisen R, Mulhaupt R.** Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials* 23: 4437-4447, 2002.
51. **Langer R, Vacanti JP.** Tissue engineering. *Science* 260: 920-926, 1993.
52. **Langer S, Sinitsina I, Biberthaler P, Krombach F, Messmer K.** Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters. *Ann Plast Surg* 48: 53-59, 2002.
53. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD.** Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 87: 163-171, 2007a.
54. **Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rucker M, Junker D, et al.** Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12: 2093-2104, 2006.

55. **Laschke MW, Haufel JM, Thorlacijs H, Menger MD.** New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *J Biomed Mater Res A* 74: 696-704, 2005.
56. **Laschke MW, Rücker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD.** Incorporation of growth factor containing Matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 85: 397-407, 2007b.
57. **Laschke MW, Rücker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD.** Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Ann Surg* 248: 939-948, 2008.
58. **Laschke MW, Strohe A, Scheuer C, Eglin D, Verrier S, Alini M, Pohlemann T, Menger MD.** In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater* 5: 1991-2001, 2009.
59. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD.** Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Eng Part B Rev* 15: 455-465, 2009.
60. **Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD.** Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82: 494-505, 2007c.
61. **Lees JG, Lim SA, Croll T, Williams G, Lui S, Cooper-White J, McQuade LR, Mathiyagan B, Tuch BE.** Transplantation of 3D scaffolds seeded with human embryonic stem cells: biological features of surrogate tissue and teratoma-forming potential. *Regen Med* 2: 289-300, 2007.
62. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K.** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-1062, 1993.
63. **Leunig M, Yuan F, Menger MD, Boucher Y, Goetz AE, Messmer K, Jain RK.** Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res* 52: 6553-6560, 1992.
64. **Liu Y, Suwa F, Wang X, Takemura A, Fang YR, Li Y, Zhao Y, Jin Y.** Reconstruction of a tissue-engineered skin containing melanocytes. *Cell Biol Int* 31: 985-990, 2007.
65. **Lokmic Z, Stillaert F, Morrison WA, Thompson EW, Mitchell GM.** An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *Faseb J* 21: 511-522, 2007.
66. **Lukinius A, Jansson L, Korsgren O.** Ultrastructural evidence for blood microvessels devoid of an endothelial cell lining in transplanted pancreatic islets. *Am J Pathol* 146: 429-435, 1995.

67. **Lundborg G.** Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 36: 1-7, 2004.
68. **Marijnissen WJ, van Osch, GJ, Aigner J, van der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA.** Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 23: 1511-1517, 2002.
69. **Masson V VE, Devy L, Grignet-Debrus C, Bernt S, Bajou K, Blacher S, Roland G, Chang Y, Fong T, Carmeliet P, Foidart JM, Noël A.** Mouse Aortic Ring Assay: A New Approach of the Molecular Genetics of Angiogenesis. *Biol Proced Online* 4: 24-31, 2002.
70. **Matsumura G, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, Ikada Y, Matsuda S, Kurosawa H, Shin'oka T.** Evaluation of tissue-engineered vascular autografts. *Tissue Eng* 12: 3075-3083, 2006.
71. **Maxian SH, Di Stefano T, Melican MC, Tiku ML, Zawadsky JP.** Bone cell behavior on Matrigel-coated Ca/P coatings of varying crystallinities. *J Biomed Mater Res* 40: 171-179, 1998.
72. **Menger MD, Hammersen F, Messmer K.** In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg* 40: 19-25, 1992.
73. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B.** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34: 83-91, 2002.
74. **Menger MD, Walter P, Hammersen F, Messmer K.** Quantitative analysis of neovascularization of different PTFE-implants. *Eur J Cardiothorac Surg* 4: 191-196, 1990.
75. **Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B.** Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg* 25: 509-515, 2001.
76. **Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, Langer R.** Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials* 15: 55-58, 1994.
77. **Miller RA, Brady JM, Cutright DE.** Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J Biomed Mater Res* 11: 711-719, 1977.
78. **Morritt AN, Bortolotto SK, Dilley RJ, Han X, Kompa AR, McCombe D, Wright CE, Itescu S, Angus JA, Morrison WA.** Cardiac tissue engineering in an in vivo vascularized chamber. *Circulation* 115: 353-360, 2007.
79. **Nam YS, Yoon JJ, Park TG.** A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive. *J Biomed Mater Res* 53: 1-7, 2000.

80. **Nicosia RF, Ottinetti A.** Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 119-128, 1990.
81. **Nicosia RF, Villaschi S.** Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 73: 658-666, 1995.
82. **Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH.** Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials* 28: 1123-1131, 2007.
83. **Oosterlee A, Rahmel A, van Zwet W.** Annual Report 2006. Eurotransplant International Foundation, Leiden, Holland. 2007.
84. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA.** A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18: 311-318, 1979.
85. **Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S.** Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 29: 106-115, 2005.
86. **Patan S.** Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 117: 3-32, 2004.
87. **Patrick CW.** Breast tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 6: 109-130, 2004.
88. **Peacock DJ, Banquerigo ML, Brahn E.** Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis. *J Exp Med* 175: 1135-1138, 1992.
89. **Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S.** Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A* 65: 489-497, 2003.
90. **Pries AR.** A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 7: 327-345, 1988.
91. **Reynolds, L. P., Killilea, S. D., Redmer, D. A.** Angiogenesis in the female reproductive system. *Faseb J* 6: 886-892, 1992.
92. **Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ.** Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 19: 1029-1034, 2001.
93. **Risau W.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997.
94. **Rophael JA, Craft RO, Palmer JA, Hussey AJ, Thomas GP, Morrison WA, Penington AJ, Mitchell GM.** Angiogenic growth factor synergism in a murine tissue engineering model of angiogenesis and adipogenesis. *Am J Pathol* 171: 2048-2057, 2007.

95. **Rücker M, Kadirogullari B, Vollmar B, Spitzer WJ, Menger MD.** Improvement of nutritive perfusion after free tissue transfer by local heat shock-priming-induced preservation of capillary flowmotion. *J Surg Res.* 123: 102-108, 2005.
96. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mulhaupt R, Gellrich NC, Menger MD.** Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 27: 5027-5038, 2006.
97. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Tavassol F, Mulhaupt R, Gellrich NC, Menger MD.** Vascularization and biocompatibility of scaffolds consisting of different calcium phosphate compounds. *J Biomed Mater Res A* 86: 1002-1011, 2008.
98. **Rupertus K, Dahlem C, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O.** Rapamycin inhibits hepatectomy-induced stimulation of metastatic tumor growth by reduction of angiogenesis, microvascular blood perfusion, and tumor cell proliferation. *Ann Surg Oncol* 16: 2629-2637, 2009.
99. **Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL.** Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 4: 743-765, 2004.
100. **Sandison JC.** The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behavior of living cells and tissues seen with the microscope. *Am J Anat* 41: 447-472, 1928.
101. **Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M.** Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res* 58: 449-455, 2001.
102. **Shepherd BR, Chen HY, Smith CM, Gruionu G, Williams SK, Hoying JB.** Rapid perfusion and network remodeling in a microvascular construct after implantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 898-904, 2004.
103. **Shepherd BR, Enis DR, Wang F, Suarez Y, Pober JS, Schechner JS.** Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell-derived endothelial cells. *Faseb J* 20: 1739-1741, 2006.
104. **Shi, YH, Fang WG.** Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World J Gastroenterol* 10: 1082-1087, 2004.
105. **Smiler D, Soltan M, Lee JW.** A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dent* 16: 42-53, 2007.
106. **Sung HJ, Meredith C, Johnson C, Galis ZS.** The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 25: 5735-5742, 2004.

107. **Tremblay PL, Hudon V, Berthod F, Germain L, Auger FA.** Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* 5: 1002-1010, 2005.
108. **Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, Bulnheim U, Rychly J, Kirkpatrick CJ.** Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 28: 3965-3976, 2007.
109. **Vacanti CA, Upton J.** Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg* 21: 445-462, 1994.
110. **van Cruijssen H, Giaccone G, Hoekman K.** Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer* 117: 883-888, 2005.
111. **van der Schaft DW, Dings RP, de Lussanet QG, van Eijk LI, Nap AW, Beets-Tan RG, Bouma-Ter Steege JC, Wagstaff J, Mayo KH, Griffioen AW.** The designer anti-angiogenic peptide anginex targets tumor endothelial cells and inhibits tumor growth in animal models. *Faseb J* 16: 1991-1993, 2002.
112. **Vollmar B, Laschke MW, Rohan R, Koenig J, Menger MD.** In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol* 159: 1661-1670, 2001.
113. **Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I.** Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng* 84: 205-214, 2003.
114. **Widmer MS, Gupta PK, Lu L, Meszlenyi RK, Evans GR, Brandt K, Savel T, Gurlek A, Patrick CW Jr, Mikos AG.** Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 19:1945-1955, 1998.
115. **Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa, S.** Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408: 92-96, 2000.
116. **Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J.** Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248, 2000.
117. **Zhang Z, Ito WD, Hopfner U, Böhmert B, Kremer M, Reckhenrich AK, Harder Y, Lund N, Kruse C, Machens HG, Egaña JT.** The role of single cell derived vascular resident endothelial progenitor cells in the enhancement of vascularization in scaffold-based skin regeneration. *Biomaterials* 32: 4109-4117, 2011.