

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

**ISOLIERTE MIKROVASKULÄRE FRAGMENTE AUS  
FETTGEWEBE ALS VASKULARISIERUNGSEINHEITEN FÜR  
DAS TISSUE ENGINEERING**

**Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Theoretischen Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

**2014**

vorgelegt von: Sascha Kleer  
geboren am: 14.05.1985 in Ottweiler

**meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	1
<b>2. SUMMARY</b> .....	3
<b>3. EINLEITUNG</b> .....	5
<b>3.1. Tissue Engineering</b> .....	5
3.1.1. Scaffolds .....	5
3.1.2. Vaskularisierung beim Tissue Engineering .....	6
3.1.3. Vaskularisierungsstrategien für Gewebekonstrukte .....	7
3.1.3.1. Vaskularisierung durch Angiogenese .....	7
3.1.3.2. Vaskularisierung durch Inoskulation .....	8
3.1.4. Mikrovaskuläre Fragmente aus Fettgewebe .....	9
<b>3.2. Einsatz mikrovaskulärer Fragmente im Knochen-Tissue Engineering</b> .....	10
3.2.1. Angiogenese und Knochenheilung .....	10
3.2.2. Knochen-Tissue Engineering .....	11
3.2.3. Segmentdefektmodell .....	12
<b>4. ZIEL DER STUDIE</b> .....	13
<b>5. MATERIAL UND METHODIK</b> .....	14
<b>5.1. Versuchstiere</b> .....	14
<b>5.2. Generierung von prävaskularisierten Gewebekonstrukten</b> .....	14
5.2.1. Herstellung der Scaffolds .....	14
5.2.2. Isolierung der Gefäßfragmente .....	16
5.2.3. Besiedlung der Scaffolds .....	17
5.2.4. Kultivierung der besiedelten Scaffolds .....	18
<b>5.3. Modell der Rückenhautkammer</b> .....	19
5.3.1. Implantation der Rückenhautkammer .....	20
5.3.2. Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammer .....	22
<b>5.4. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</b> .....	22
5.4.1. Durchführung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	22
5.4.2. Mikrozirkulatorische Parameter .....	24
5.4.2.1. Perfundierte ROIs .....	24

5.4.2.2. Funktionelle Kapillardichte.....	25
<b>5.5. Histologie und Immunhistochemie.....</b>	<b>25</b>
5.5.1. Histologische Präparate.....	25
5.5.2. CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung.....	26
5.5.3. CD31- $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (SMA)-Doppelfluoreszenzfärbung.....	27
5.5.4. Myeloperoxidase (MPO) Färbung und F4/80 Färbung.....	27
<b>5.6. <i>In vitro</i> Analyse der mikrovaskulären Fragmente.....</b>	<b>28</b>
5.6.1. Vitalitätsfärbung.....	28
5.6.2. Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	28
5.6.3. Durchflusszytometrische Analyse .....	29
<b>5.7. Segmentdefektmodell.....</b>	<b>29</b>
5.7.1. LockingMouseNail <sup>®</sup> .....	29
5.7.2. Implantation des LockingMouseNail <sup>®</sup> mit Scaffold.....	30
<b>5.8. Radiologische Analysen.....</b>	<b>32</b>
5.8.1 Röntgen.....	32
5.8.2. Präparation der Knochen.....	32
5.8.3. <i>In vitro</i> $\mu$ CT.....	33
<b>5.9. Histomorphometrie.....</b>	<b>35</b>
<b>5.10. Western-Blot.....</b>	<b>35</b>
<b>5.11. Experimentelles Protokoll.....</b>	<b>38</b>
5.11.1. Versuchsablauf.....	38
5.11.2. Versuchsgruppen.....	39
<b>5.12. Statistik.....</b>	<b>40</b>
<b>6. Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
<b>6.1. Besiedlung poröser Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten aus Fettgewebe.....</b>	<b>41</b>
6.1.1. Isolierung und Vitalität der mikrovaskulären Fragmente.....	41
6.1.2. Charakterisierung der mikrovaskulären Fragmente.....	42
6.1.3. Besiedlung der Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten.....	42
6.1.4. Vaskularisierung implantierter Scaffolds.....	44
6.1.5. Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds.....	47
<b>6.2. Präkultivierung von besiedelten Scaffolds in angiogenem Medium.....</b>	<b>49</b>
6.2.1. Histomorphologie der frisch besiedelten und präkultivierten Scaffolds.....	49
6.2.2. Vaskularisierung der implantierten Scaffolds.....	50
6.2.3. Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds.....	52

<b>6.3. Mikrovasculäre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten beim Knochen-Tissue Engineering</b> .....	54
6.3.1. Radiologie.....	54
6.3.1.1. Röntgen.....	54
6.3.1.2. $\mu$ CT.....	55
6.3.2. Histomorphometrie.....	58
6.3.3. Western-Blot.....	59
6.3.3.1. GFP-Expression.....	59
6.3.3.2. CD31-Expression.....	59
<b>6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	61
<b>7. DISKUSSION</b> .....	62
<b>7.1. Diskussion von Material und Methoden</b> .....	62
7.1.1. Diskussion der Modelle.....	62
7.1.1.1. Rückenhautkammer.....	62
7.1.1.2. LockingMouseNail®.....	63
7.1.2. Diskussion der Methoden.....	64
7.1.2.1. Scaffolds.....	64
7.1.2.2. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	64
7.1.2.3. Röntgen und $\mu$ CT.....	65
<b>7.2. Diskussion der Ergebnisse</b> .....	66
7.2.1. Besiedlung poröser Scaffolds mit mikrovasculären Fragmenten.....	66
7.2.2. Präkultivierung von besiedelten Scaffolds in angiogenem Medium....	69
7.2.3. Mikrovasculäre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten beim Knochen-Tissue Engineering.....	71
<b>7.3. Schlussfolgerungen</b> .....	73
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	75
<b>9. Danksagung</b> .....	85
<b>10. Lebenslauf</b> .....	86
<b>11. Eidesstattliche Erklärung</b> .....	87
<b>12. Publikationen</b> .....	88

## 1. Zusammenfassung

Das Ziel beim Tissue Engineering ist es, ein funktionsfähiges Ersatzgewebe herzustellen, welches anschließend in einen Gewebedefekt implantiert werden kann. Hierzu werden beim Patienten einzelne Zellen isoliert, in Kultur vermehrt und anschließend alleine oder in Kombination mit Wachstumsfaktoren auf einem Scaffold angesiedelt, das den Zellen als dreidimensionale Trägermatrix dient. Das so entstandene Gewebekonstrukt kann beim Patienten in einen Gewebedefekt implantiert werden. Hierbei ist eine schnelle und ausreichende Vaskularisierung eine wesentliche Voraussetzung für das Überleben und die Langzeitfunktion des Gewebekonstrukts. Um dies zu erreichen, könnte eine mögliche Strategie die Prävaskularisierung von Scaffolds sein. Dies bedeutet, dass bereits vor Implantation präformierte Blutgefäße in Scaffolds generiert werden. Diese müssen dann nach Implantation nur noch Anschluss an das Blutgefäßsystem des Empfängergewebes finden, um schnell mit Blut perfundiert zu werden.

Zum Prüfen dieser Hypothese wurden im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit Nano-Hydroxylapatit-Polyurethan-Scaffolds (nHA/PU-Scaffolds) mit Gefäßfragmenten aus dem epididymalen Fettgewebe von transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J Mäusen besiedelt und in die Rückenhautkammer von Green Fluorescent Protein (GFP)-negativen C57BL/6 Wildtyp-Mäusen implantiert. Hierdurch konnte die Entwicklung neuer Gefäßnetzwerke aus GFP-positiven Gefäßfragmenten mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie sowie Histologie und Immunhistochemie untersucht werden. Im Vergleich zu nicht besiedelten Scaffolds wiesen die Implantate eine deutlich verbesserte Vaskularisierung auf. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Gefäßfragmente innerhalb der Scaffolds proliferieren und außerhalb der Scaffolds Verbindungen mit den Gefäßen des Empfängergewebes eingehen.

In einem zweiten Studienabschnitt wurde untersucht, ob durch die *in vitro* Kultivierung Gefäßfragment-besiedelter Scaffolds in angiogenem Medium ein funktionsfähiges Gefäßnetzwerk generiert werden kann. Hierdurch sollte die Perfusion der Gewebekonstrukte nach Implantation noch weiter beschleunigt werden. Histologische Analysen zeigten, dass die Gefäßfragmente während einer 4-

wöchigen Kultivierung ihre typische Gefäßmorphologie verlieren. Dies führte nach Implantation in die Rückenhautkammer im Vergleich zu frisch besiedelten Kontrollen zu einer verschlechterten Vaskularisierung. Zudem waren die Gefäße im Zentrum der Kontrollgruppe nahezu alle GFP-positiv, während die präkultivierte Gruppe nur etwa 50 % GFP-positive Gefäße aufwies. Hieraus lässt sich schließen, dass das Vaskularisierungspotential der Gefäßfragmente durch eine Kultivierung verschlechtert wird.

Um zu prüfen, ob die Gefäßfragmente durch ihr hohes Vaskularisierungspotential auch zur Prävaskularisierung beim Knochen-Tissue Engineering geeignet sind, wurden Gefäßfragment-besiedelte Scaffolds in einem dritten Studienabschnitt in einem Segmentdefektmodell der Maus getestet. Hierbei wurden die frisch besiedelten Scaffolds für 26 Wochen in einen Femursegmentdefekt von 1,8 mm implantiert, welcher mittels eines LockingMouseNail<sup>®</sup> stabilisiert wurde. Sowohl Röntgen- als auch *in vitro* mikrocomputertomographische ( $\mu$ CT) Analysen zeigten jedoch, dass in der Gruppe der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds der Segmentspalt am Ende des Versuchs nicht knöchern überbrückt war, wohingegen die Gruppe mit leeren Scaffolds eine knöcherne Durchbauung aufwies.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Besiedlung von Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus Fettgewebe eine vielversprechende Strategie zur Prävaskularisierung beim Tissue Engineering darstellt. Eine Präkultivierung der Gefäßfragmente führt jedoch zum Verlust ihres hohen Vaskularisierungspotentials. Weiterhin konnten in dieser Arbeit Gefäßfragment-besiedelte Scaffolds keine verbesserte Heilung in einem Segmentdefektmodell des Femurs der Maus induzieren. Dies zeigt, dass diese Methode für eine erfolgreiche Anwendung beim Knochen-Tissue Engineering noch weiter optimiert werden muss.

## 2. Summary

The aim of tissue engineering is the generation of functional tissue substitutes, which can be implanted into tissue defects. For this purpose, individual cells are isolated from a patient, expanded in culture and seeded either alone or in combination with growth factors on a scaffold which serves as a three-dimensional matrix. The resulting tissue construct can finally be implanted in a tissue defect of the patient. A rapid and adequate vascularization of the implanted tissue construct is a major prerequisite for its survival and long-term function. To achieve this goal, scaffolds may be prevascularized. This means that preformed blood vessels are generated in scaffolds before their implantation. After implantation, the preformed vessels only have to develop interconnections to the host microvasculature to get reperfused in a short period of time.

To test this hypothesis in the first part of this thesis, nano-hydroxyapatite polyurethane scaffolds (nHA/PU scaffolds) were seeded with microvascular fragments from epididymal fat tissue of transgenic C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J mice and implanted into the dorsal skinfold chamber of green fluorescent protein (GFP)-negative C57BL/6 wild-type mice. By this, it was possible to analyze the development of new microvascular networks originating from the GFP-positive microvascular fragments by means of intravital fluorescence microscopy, histology and immunohistochemistry. Of interest, the implants exhibited a markedly improved vascularization when compared to non-seeded empty control scaffolds. In addition, it was found that the microvascular fragments proliferate within the scaffolds and develop interconnections with the vessels of the surrounding host tissue.

The aim of the second part of this thesis was to investigate whether the cultivation of scaffolds seeded with microvascular fragments in an angiogenic medium is an appropriate approach to generate *in vitro* a functional microvascular network. After implantation, this modification may result in an accelerated perfusion of the tissue construct. However, histological analyses showed that the microvascular fragments lost their typical vessel morphology during a 4-week cultivation period. This resulted in an impaired vascularization after implantation into the dorsal skinfold chamber when compared to freshly seeded control scaffolds. In addition, the vessels in the

center of the control group were almost all GFP-positive while only 50% of the vessels in the pre-cultivated group exhibited a GFP-signal. These findings indicate that the vascularization potential of microvascular fragments is markedly impaired by 4 weeks pre-cultivation.

In the third part of this thesis it was analyzed in a segment defect model of the mouse whether microvascular fragments are also suitable for the prevascularization of bone tissue substitutes. For this purpose, vessel fragment-seeded scaffolds and empty scaffolds were implanted into a femur segment defect of 1.8 mm for a period of 25 weeks. The defects were stabilized by a Locking Mouse Nail<sup>®</sup>. Both X-ray and *in vitro*  $\mu$ CT analyses revealed that the segment gap in the group of vessel fragment-seeded scaffolds was not bridged by bone at the end of the observation period whereas the defects in the group of control scaffolds showed appropriate healing.

In summary, the present thesis demonstrates that the seeding of scaffolds with microvascular fragments from fat tissue may represent a promising strategy for the prevascularization of tissue engineering constructs. However, precultivation of microvascular fragments impairs their high vascularization potential. Furthermore, it was found that scaffolds seeded with vessel fragments do not improve bone healing in a segment defect model of the mouse femur. This indicates that this approach still needs to be optimized for a successful application in bone defect healing.

### **3. Einleitung**

Der Ersatz oder die Wiederherstellung der Funktion von Körpergeweben und Organen ist eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin. Zur Behandlung von angeborenen, traumatisch oder tumorös bedingten Substanzdefekten wird körpereigenes oder Fremdmaterial eingesetzt, wobei das körperfremde Material typischerweise zu einer Fremdkörperreaktion führen kann und ein stetiges Infektionsrisiko birgt. Somit eignet sich autologes Spendermaterial vom Patienten am besten zur Rekonstruktion von Substanzdefekten. In diesem Zusammenhang stellt das Tissue Engineering, das sich mit der Herstellung von Ersatzgewebe beschäftigt, einen schnell wachsenden Forschungsbereich dar.

#### **3.1. Tissue Engineering**

Das Ziel beim Tissue Engineering ist es, ein funktionsfähiges Ersatzgewebe zu generieren. Klassischerweise werden hierzu beim Patienten einzelne Zellen isoliert, in Kultur vermehrt und anschließend auf einem Trägermaterial angesiedelt, das auch als Scaffold bezeichnet wird und den Zellen als dreidimensionale Matrix dient. Das so entstandene Gewebekonstrukt kann anschließend in einen Gewebedefekt beim Patienten implantiert werden (Tsang & Bhatia, 2007; Chen et al., 2010).

##### **3.1.1. Scaffolds**

Zur Herstellung dreidimensionaler Gewebekonstrukte stehen als Scaffolds verschiedene Biomaterialien zur Verfügung. Hierbei können sowohl natürliche Biomaterialien wie Kollagen (Freyman et al., 2001) oder Alginat (Marijnissen et al., 2002) als auch synthetische Materialien wie Polylactic-co-Glycolid (PLGA) (Druecke et al., 2004), Hydrogel (Holland et al., 2005), Keramiken und Metalle (Ducheyne & Qiu, 1999; Mastrogiacomo et al., 2005) zum Einsatz kommen. Die Scaffolds geben in der Regel die Form und Struktur des herzustellenden Gewebes oder Organs vor. Deshalb sollten sie flexibel genug sein, um in jede gewünschte dreidimensionale

Form gebracht werden zu können, dabei aber gleichzeitig stabil genug sein, um als dreidimensionale Matrix diese Form zu halten. Zudem müssen Scaffolds biokompatibel sein und eine möglichst geringe Entzündungsreaktion im Empfängerorganismus auslösen. Im Idealfall ist ein Scaffold abbaubar, so dass die neu gebildeten Gewebe das Biomaterial im Laufe der Zeit ersetzen können (Agrawal & Ray, 2000). Diese Strategie zielt darauf, dass das Trägermaterial den Zellen nur ein dreidimensionales Gerüst zur Verfügung stellt, bis diese zu einem zusammenhängenden Verbund gewachsen sind (Ewers et al., 2003).

Zur Herstellung von Scaffolds stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Gängige Methoden zur Produktion poröser Scaffolds sind die Gassättigungstechnik (Nam et al., 2000), die Flüssiggießtechnik oder die Partikelwaschtechnik (Mikos et al., 1994). Der Nachteil dieser Techniken besteht darin, dass die Porengröße sehr heterogen ist. So können sich benachbarte Poren im Durchmesser signifikant unterscheiden, was das Einwachsen neuer Blutgefäße erschweren kann (Temenoff et al., 2000). Eine Studie von Druce et al. (2004) zeigt, dass das Einwachsen neuer Gefäße in Scaffolds wesentlich von deren Porengröße abhängig ist. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten mit Hydroxylapatit-Nanopartikeln beschichteten Poly(Esther-Urethan)-Scaffolds (nHA/PU-Scaffolds) wurden mittels der Salz-Auswasch-Umkehr-Methode hergestellt (Gorna et al., 2006; Boissard et al., 2009), wodurch eine konstante Porengröße von 220 µm bei einer Porosität von 90 % erreicht wurde. Dies fördert das Einwachsen von neuen Mikrogefäßen und Granulationsgewebe aus dem umliegenden Gewebe des Empfängerorganismus (Druce et al., 2004; Laschke et al., 2010a; Laschke et al., 2011a). Weiterhin wurde in früheren Studien gezeigt, dass die nHA/PU-Scaffolds eine exzellente *in vivo* Biokompatibilität aufweisen (Laschke et al., 2010b).

### **3.1.2. Vaskularisierung beim Tissue Engineering**

Eine schnelle und ausreichende Vaskularisierung ist eine wesentliche Voraussetzung für das Überleben und den Funktionserhalt eines implantierten Gewebekonstrukts (Laschke et al., 2006; Bramfeldt et al., 2010; Novosel et al., 2011). Dünne Gewebe können nach der Implantation per Diffusion mit Sauerstoff versorgt werden, wobei die

maximale Sauerstoffdiffusionsstrecke von einem Blutgefäß zu den zu versorgenden Zellen bei ca. 150 - 200 µm liegt (Folkmann & Hochberg, 1973; Colton, 1995). Daher können derzeit bereits dünne Gewebe, wie z.B. Haut, oder Gewebe mit metabolisch geringen Anforderungen, wie z.B. Knorpel, für den klinischen Gebrauch gezüchtet werden. Größere dreidimensionale Gewebekonstrukte sind dagegen auf die Ausbildung eines eigenen Gefäßnetzwerks angewiesen, da durch Diffusion allein keine ausreichende Versorgung der Zellen in ihrem Inneren erfolgen kann (Sanots & Reis, 2010). Aus diesem Grund stellt die Etablierung von effizienten und klinisch umsetzbaren Vaskularisierungsstrategien für Gewebekonstrukte eine wichtige Herausforderung beim Tissue Engineering dar.

### **3.1.3. Vaskularisierungsstrategien für Gewebekonstrukte**

Grundsätzlich können zwei verschiedene Strategien zur Vaskularisierung von Gewebekonstrukten unterschieden werden. Die erste Strategie zielt auf das Einwachsen neuer Blutgefäße aus dem umgebenden Empfängergewebe in die Implantate durch Stimulation der Angiogenese (Laschke et al., 2006). Andererseits ist eine schnelle Blutversorgung von Gewebekonstrukten durch Inoskulation möglich (Laschke et al., 2009b). Hierbei wird vor der Implantation ein mikrovaskuläres Netzwerk in den Gewebekonstrukten generiert. Dieses Netzwerk muss nach der Implantation nur noch Verbindungen zum Gefäßnetzwerk des Empfängergewebes ausbilden, um in kurzer Zeit vollständig durchblutet zu sein.

#### **3.1.3.1. Vaskularisierung durch Angiogenese**

Die Vaskularisierung implantierter Scaffolds durch Angiogenese, d.h. durch Einwachsen neuer Blutgefäße, kann auf verschiedene Arten optimiert werden. Neben der chemischen Zusammensetzung (Rücker et al., 2006; Butler et al., 2007; Rücker et al., 2008) ist hierbei auch die Architektur eines Scaffolds von großer Bedeutung. So kann durch Modifikation der Porengröße eines Scaffolds die Vaskularisierung positiv beeinflusst werden. Beispielsweise konnten Druecke et al.

(2004) zeigen, dass eine Porengröße von 250 - 300  $\mu\text{m}$  das Einwachsen von Blutgefäßen optimal fördert.

Die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren oder die Beladung von Scaffolds mit angiogenen Wachstumsfaktoren stellen weitere Strategien zur Förderung der Angiogenese dar (Perets et al., 2003; Ennett et al., 2006; Nillesen et al., 2007). Dabei müssen die verschiedenen Wachstumsfaktoren zum richtigen Zeitpunkt und im richtigen Verhältnis zueinander freigesetzt werden, um entsprechende Effekte zu erzielen (Amini et al., 2012). Weiterhin können Scaffolds mit Endothelzellen oder endothelialen Vorläuferzellen besiedelt werden (Shepherd et al., 2006; Lees et al., 2007; Smiler et al., 2007). Aus diesen Zellen können sich dann neue Blutgefäße entwickeln. Bei der Verwendung von älteren Endothelzellen aus großen Gefäßen besteht jedoch die Gefahr, dass sie bestimmte Signalwege der Angiogenese negativ beeinflussen (Garlanda & Dejana, 1997; Nomi et al., 2002). Abhängig vom Gewebe, aus welchem die Endothelzellen stammen, weisen diese zusätzlich phäno- und genotypische Unterschiede auf, was zu unterschiedlichen Reaktionen im Empfängergewebe führen kann (Garlanda & Dejana, 1997; Sumpio et al., 2002; Chi et al., 2003).

Die beschriebenen Strategien zielen alle darauf ab, das Einwachsen von Blutgefäßen des Empfängergewebes in Scaffolds über den Prozess der Angiogenese zu fördern. Da die physiologische Wachstumsgeschwindigkeit von Blutgefäßen nur ca. 5  $\mu\text{m}/\text{h}$  beträgt (Zarem, 1969; Orr et al., 2003), nimmt die vollständige Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte mittels Angiogenese jedoch so viel Zeit in Anspruch, dass die Zellen im Zentrum größerer Implantate absterben. Aus diesem Grund wird zur Zeit im Bereich des Tissue Engineering zunehmend nach effektiveren Ansätzen zur raschen Vaskularisierung von Gewebekonstrukten gesucht.

### **3.1.3.2. Vaskularisierung durch Inoskulation**

Die Vaskularisierung von Scaffolds durch Inoskulation stellt eine vielversprechende Alternative zur Vaskularisierung durch Angiogenese dar. Hierbei wird bereits vor

Implantation ein Gefäßnetzwerk innerhalb eines Gewebekonstrukts generiert, was man auch als Prävaskularisierung bezeichnet (Laschke et al., 2009b). Bisher wurden verschiedene Methoden zur Prävaskularisierung entwickelt. Bei der *in vitro* Prävaskularisierung werden Scaffolds mit gefäßbildenden Zellen wie z.B. Endothelzellen oder Stammzellen besiedelt (Koike et al., 2004; Lokmic & Mitchell, 2008). Des Weiteren kann die Prävaskularisierung *in situ* erfolgen. Hierbei dient der Körper als natürlicher Bioreaktor. So wird ein Scaffold in ein gut durchblutetes Gewebe implantiert, wo sich zunächst ein mikrovaskuläres Netzwerk durch das Einwachsen von Blutgefäßen aus dem umliegenden Gewebe in das Implantat entwickelt (Soltysiak & Saxena, 2009; Kokemueller et al., 2010). Danach wird das prävaskularisierte Gewebekonstrukt explantiert und in den eigentlichen Defekt transferiert. Eine weitere Methode der *in situ* Prävaskularisierung stellt das Anlegen einer arterio-venösen Gefäßschleife dar (Ren et al., 2008). Hierbei wird in einer implantierten Kammer um das Gewebekonstrukt eine Gefäßschleife gelegt, in der eine Arterie und eine Vene miteinander anastomosiert werden. Aus der durchbluteten Gefäßschleife wachsen dann durch Scherkräfte Gefäße in das Gewebekonstrukt ein. Wenn sich ein ausreichendes Gefäßnetzwerk ausgebildet hat, wird die Kammer explantiert und das Gewebekonstrukt in den Defekt implantiert (Laschke et al., 2009b).

Das Problem dieser Methoden ist jedoch, dass sie sehr zeitaufwendig sind und zum Teil mit komplexen Zellkulturtechniken bzw. mehrfachen chirurgischen Eingriffen einhergehen. Aus diesem Grund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine neue Prävaskularisierungsstrategie zu etablieren, die klinisch leicht anwendbar ist. Hierzu wurden Scaffolds mit mikrovaskulären Gefäßfragmenten aus Fettgewebe besiedelt.

#### **3.1.4. Mikrovaskuläre Fragmente aus Fettgewebe**

Mikrovaskuläre Fragmente können leicht in großer Anzahl mittels enzymatischer Digestion aus Fettgewebe isoliert werden (Hoying et al., 1996; Shepherd et al., 2004; Nunes et al., 2010a). Die isolierten mikrovaskulären Fragmente besitzen eine typische Gefäßmorphologie mit einem Lumen, das von Endothelzellen ausgekleidet wird, welche wiederum von perivaskulären Zellen umgeben sind. Zudem weisen

mikrovaskuläre Fragmente ein hohes angiogenes Potential auf (Hoying et al., 1996). In einer Studie von Shepherd et al. (2004) konnte gezeigt werden, dass mikrovaskuläre Fragmente in Kultur zunächst unreife Gefäßnetzwerke ausbilden, wenn sie in einem Kollagengel eingebettet werden. Nach Implantation verbinden sich die unreifen Gefäße dann mit den Gefäßen des Empfängergewebes und können sich anschließend zu morphologisch ausgereiften Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen entwickeln. Durch diese Plastizität sowie die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit und einfache Gewinnung von Fettgewebe via Liposuktion stellen mikrovaskuläre Fragmente attraktive Vaskularisierungseinheiten für Gewebekonstrukte dar. In der vorliegenden Arbeit wurde dies erstmalig geprüft, indem Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt und anschließend in ein Empfängergewebe implantiert wurden.

## **3.2. Einsatz mikrovaskulärer Fragmente im Knochen-Tissue Engineering**

### **3.2.1. Angiogenese und Knochenheilung**

Der menschliche Knochen ist kein starres Gebilde, sondern vitales Gewebe, welches vielfältige Aufgaben wie Stütz-, Struktur- und Mobilitätsfunktion, Calciumhomöostase sowie Blutbildung besitzt. Im Falle einer Verletzung verfügt der Knochen über eine ausgeprägte Regenerationsfähigkeit, wodurch Knochenbrüche folgenlos und ohne Narbenbildung ausheilen (McKibbin, 1978). Bei der Knochenheilung können jedoch sowohl nach konservativer als auch nach operativer Behandlung verschiedene Komplikationen wie Fehlstellungen, verzögerte Heilungen, Non-Unions sowie Pseudarthrosen auftreten (Rüter et al., 2003). Insbesondere die Ausbildung von Pseudarthrosen stellt ein großes klinisches Problem dar (Heckman & Sarasohn-Kahn, 1997; Rodriguez-Merchan & Forriol, 2004; Wiese & Pape, 2010). So heilen ca. 10 % aller Frakturen nicht aus (Einhorn, 1995; Goldhahn et al., 2000). Nach Reed et al. (2003) ist eine schlechte Vaskularisierung in der ersten Woche der Knochenheilung eine wesentliche Ursache für die Ausbildung einer Pseudarthrose.

Es wird daher angenommen, dass insbesondere eine frühe Angiogenese im Defekt ausschlaggebend für den Heilungsprozess und dessen Endergebnis ist (Reed et al., 2003). Hierbei ist zu ergänzen, dass die Angiogenese der Osteogenese zeitlich vorausgeht (Winet et al., 1990).

Aus den genannten Gründen ist die rasche Ausbildung eines mikrovaskulären Netzwerks bedeutend für eine erfolgreiche Knochenheilung. Besonders bei Knochensegmentdefekten, welche ohne ein entsprechendes Implantat nicht mehr überbrückt werden können, werden schnell vaskularisierende Implantate benötigt, um eine adäquate Knochenheilung zu gewährleisten.

### **3.2.2. Knochen-Tissue Engineering**

Die Rekonstruktion von großen Knochendefekten ist eine der größten therapeutischen Herausforderungen in der Orthopädie und Traumatologie. Die derzeit übliche Behandlung ist die Transplantation von autologem Knochen in den Defekt. Da das autologe Knochengewebe an anderer Stelle entnommen werden muss, ist hierdurch ein zweiter operativer Eingriff notwendig, welcher mit zusätzlichen Schmerzen und einer möglichen Morbidität an der Entnahmestelle einhergeht (Becker et al., 2011; Dimitriuo et al., 2011). Des Weiteren ist auch die Menge des transplantierbaren Materials begrenzt. Eine Alternative hierzu stellt die Implantation von *in vitro* erzeugten Konstrukten im Rahmen des Knochen-Tissue Engineering dar.

Das Knochen-Tissue Engineering zielt auf die Stimulation der funktionellen Knochenregeneration durch Kombination von Biomaterialien, Wachstumsfaktoren und knochenbildenden Zellen (Amini et al., 2012). Dabei stellt die Etablierung neuer Strategien, welche eine schnelle und ausreichende Vaskularisierung innerhalb der erzeugten Knochenkonstrukte gewährleisten, eine der wichtigsten Ziele beim Knochen-Tissue Engineering dar. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Besiedlung von Scaffolds für das Knochen-Tissue Engineering mit mikrovaskulären Gefäßfragmenten zu einer verbesserten Ausheilung von Segmentdefekten im Mausmodell führt.

### 3.2.3. Segmentdefektmodell

Standardisierte tierexperimentelle Modelle sind für die Untersuchung der grundlegenden Mechanismen einer normalen und gestörten Frakturheilung von entscheidender Bedeutung (O'Loughlin et al., 2008; Dumont et al., 2008; Gerstenfeld et al., 2009). Während früher Frakturheilungsstudien vor allem bei Großtieren durchgeführt wurden, hat in jüngster Zeit die Maus im Bereich der Frakturheilungsforschung zunehmend an Interesse gewonnen. Die Maus bietet im Vergleich zu anderen Spezies den Vorteil, dass viele verschiedene Antikörper, Knockout-Linien und transgene Tiere verfügbar sind, weshalb sich Mausmodelle auch gut dazu eignen, um die molekularen Mechanismen der Frakturheilung zu analysieren (Einhorn, 1998; Hiltunen et al., 1993; Mundlos & Olson, 1997). Des Weiteren hat die Maus den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer kleinen Größe leichter und kostengünstiger zu halten ist und sich die Narkose und das postoperative Management einfacher gestaltet. Die geringe Größe des Tieres macht jedoch eine stabile Fixierung von Knochensegmenten schwierig.

Garcia et al. (2011) haben mit dem LockingMouseNail<sup>®</sup> ein neues Modell entwickelt, welches eine standardisierte Fixierung von Frakturen und Segmentdefekten in der Maus erlaubt. Durch die Erzeugung verschiedener Spaltgrößen kann der Heilungsprozess insoweit beeinflusst werden, dass sowohl eine normale Frakturheilung als auch die Ausbildung von Pseudarthrosen induziert werden können. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass letzteres durch einen Segmentspalt von 1,8 mm erzielt wird (Garcia et al., 2008). Somit eignet sich diese Spaltgröße ideal zur Untersuchung der molekularen Mechanismen bei ausbleibender Frakturheilung. Zudem ermöglicht der LockingMouseNail<sup>®</sup> die Untersuchung der Eigenschaften von Knochenersatzstoffen und im Rahmen des Knochen-Tissue Engineering erzeugten Gewebekonstrukten im stabilisierten Segmentdefekt (Garcia et al., 2011). Zur Untersuchung des Einflusses mikrovaskulärer Gefäßfragmente auf die Knochenheilung wurden in der vorliegenden Arbeit daher Gefäßfragment-besiedelte Scaffolds in einen Segmentdefekt implantiert, welcher mittels LockingMouseNail<sup>®</sup> fixiert wurde.

## 4. Ziel der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Strategie zur Prävaskularisierung von Gewebekonstrukten im Rahmen des Tissue Engineering untersucht.

Im **ersten Studienabschnitt** wurden aus dem Fettgewebe von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J Mäusen mikrovaskuläre Fragmente isoliert. Mittels verschiedener Analysemethoden wurden die Zellzusammensetzung und Morphologie sowie die angiogene Aktivität und Vitalität der isolierten Gefäßfragmente analysiert. Anschließend wurden poröse nHA/PU-Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt und für 14 Tage in die Rückenhautkammer von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen implantiert. Auf diese Weise sollte das Vaskularisierungspotential der Gefäßfragmente *in vivo* getestet werden.

Im **zweiten Studienabschnitt** wurden die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelten Scaffolds zunächst für 28 Tage in angiogenem Medium kultiviert, um bereits vor Implantation in die Rückenhautkammer *in vitro* ein Gefäßnetzwerk zu generieren. Hierdurch sollte getestet werden, ob durch eine Vorkultivierung eine schnellere und bessere Vaskularisierung erzielt werden kann.

Im **dritten Studienabschnitt** wurden Gefäßfragment-besiedelte Scaffolds in einen mittels LockingMouseNail<sup>®</sup> stabilisierten Femur-Segmentdefekt der Maus mit einer Größe von 1,8 mm implantiert. Auf diese Weise sollte geprüft werden, ob sich die mikrovaskulären Fragmente auch als Vaskularisierungseinheiten von Gewebekonstrukten beim Knochen-Tissue Engineering eignen.

## **5. Material und Methodik**

### **5.1. Versuchstiere**

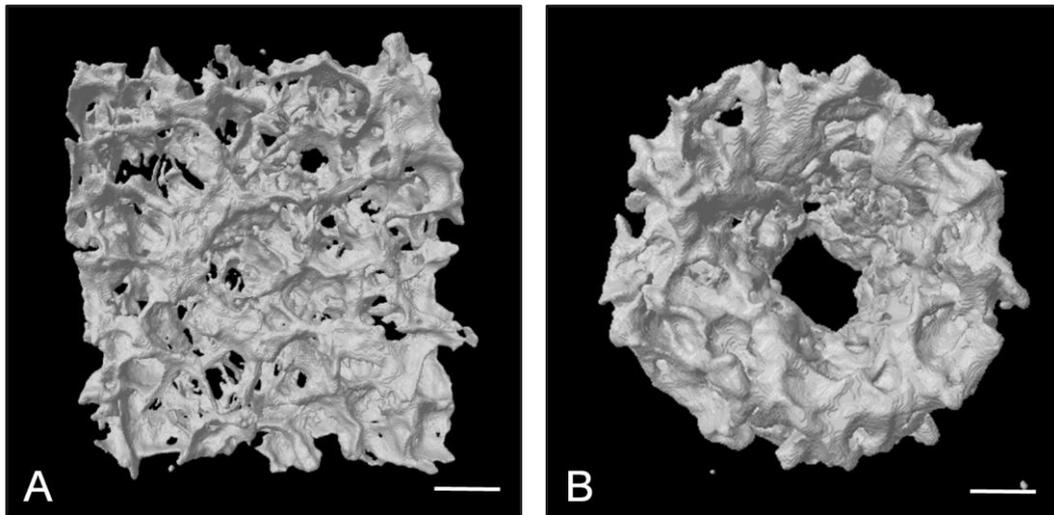
Die Versuche wurden mit 24 - 28 Wochen alten transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J Mäusen (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) mit einem Körpergewicht von 28 - 32 g und 12 - 16 Wochen alten C57BL/6 Wildtyp-Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 22 - 26 g durchgeführt. Während der Versuche wurden die Tiere in einem klimatisierten Raum bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus und unter Gabe von Wasser und Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) *ad libitum* in Einzelkäfigen gehalten. Die Experimente wurden von der entsprechenden Behörde (Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel und Veterinärwesen, Saarbrücken) genehmigt und am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

### **5.2. Generierung von prävasikularisierten Gewebekonstrukten**

#### **5.2.1. Herstellung der Scaffolds**

Für sämtliche Versuche wurden nHA/PU-Scaffolds aus dem AO Research Institut, Davos/Schweiz, verwendet. Diese wurden mit der sogenannten Salz-Auswasch-Umkehr-Methode hergestellt (Gorna et al., 2006; Boissard et al., 2009). Bei dieser Methode werden Salzkristalle mit einer organischen Polymerlösung, welche aus Hydroxylapatit-Nanopartikeln und Polyurethan besteht, vermischt. Nach der mechanischen Durchmischung über 24 Stunden (h) bei Raumtemperatur wird der Lösung das Lösungsmittel entzogen, sodass ein Gemisch aus festem Polymer und Salzkristallen vorliegt. Danach wird das Salz ausgewaschen und es entsteht ein Scaffold, dessen Porosität durch die Menge und Größe der zuvor zugegebenen Salzkristalle definiert wird. Die für die vorliegende Arbeit hergestellten Scaffolds

wiesen eine Porengröße von  $\sim 220 \mu\text{m}$ , eine Porosität von 90 % und eine Wanddicke von  $\sim 31 \mu\text{m}$  auf (Abb. 1).



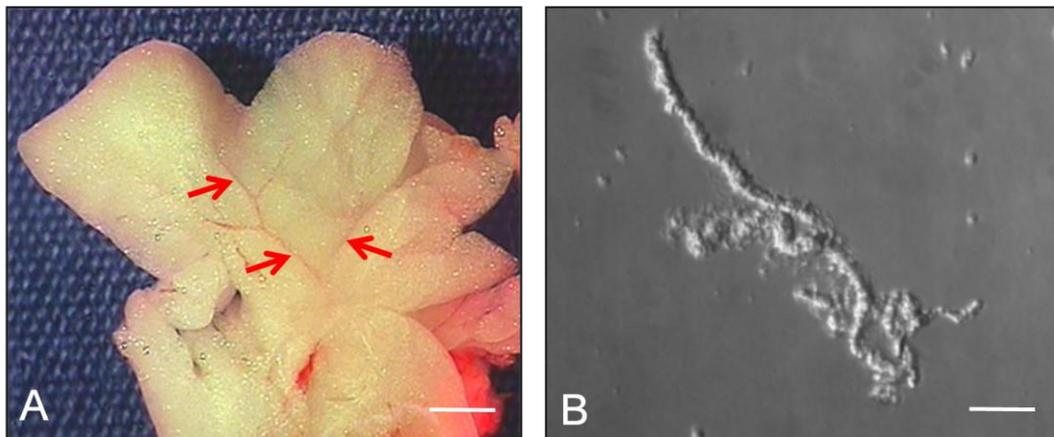
**Abbildung 1:** *Dreidimensionale mikrocomputertomographische Darstellung der verwendeten Scaffolds. A: Scaffold zur Implantation in die Rückenhautkammer (Maßstab: 0,5 mm). B: Scaffold zur Implantation in einen Knochensegmentdefekt. In der Mitte erkennt man das Loch zur Durchführung eines Marknagels (Maßstab: 0,3 mm).*

Die Scaffolds wurden entweder zu Quadern mit einer Größe von  $3 \times 3 \times 1 \text{ mm}$  (Abb. 1A) bzw. zu Zylindern mit einem Durchmesser und einer Länge von  $1,8 \text{ mm}$  geschnitten (Abb. 1B), um sie in die Rückenhautkammer bzw. einen Femur-Segmentdefekt implantieren zu können. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die nHA/PU-Scaffolds eine gute Biokompatibilität besitzen, keine zytotoxischen Bestandteile enthalten und nach Implantation nur eine geringe Leukozytenaktivierung im Empfängergewebe hervorrufen (Laschke et al, 2009a). Des Weiteren bieten sie mit ihrer Porengröße von  $\sim 220 \mu\text{m}$  sehr gute Voraussetzungen für das Einwachsen von neuen Blutgefäßen und Granulationsgewebe (Laschke et al., 2009a; Laschke et al., 2010a).

### 5.2.2. Isolierung der Gefäßfragmente

Die mikrovaskulären Fragmente wurden aus den epididymalen Fettpolstern von männlichen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Os/J Spendermäusen (The Jackson Laboratory) isoliert. Diese transgenen Mäuse weisen in allen Geweben eine Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) cDNA auf, welche über einen Huhn- $\beta$ -Aktin-Promotor und einen Cytomegalievirus-Enhancer reguliert wird. Somit wird in allen Geweben dieser Tiere mit Ausnahme der Erythrozyten und der Haare GFP exprimiert, was durch die Anregung mit blauem Licht sichtbar gemacht werden kann (Okabe et al., 1997). Dadurch konnten in der vorliegenden Arbeit die GFP-positiven Gefäßfragmente nach der Implantation in Wildtyp-Mäuse durch ihr GFP-Signal leicht detektiert werden.

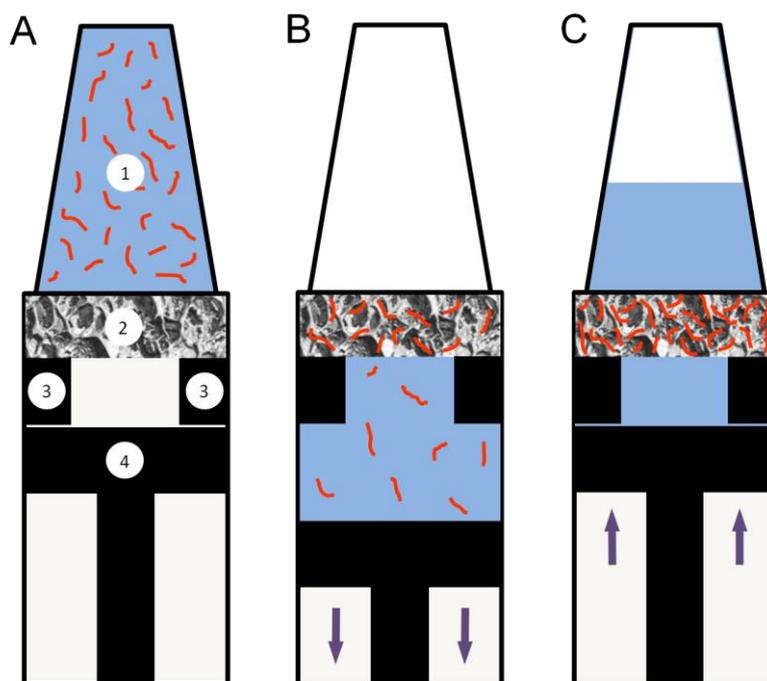
Die Spendermäuse wurden mittels einer intraperitonealen (i.p.) Injektion einer Narkoselösung aus Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Ketavet, Pharmacia GmbH, Berlin, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert. Danach wurde der Bauch mit einem Elektrorasierer (Elektra II GH 204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) enthaart und mit warmem Wasser und 70 %-igem Ethanol (Softasept N, Braun, Melsungen, Deutschland) gereinigt. Nach medianer Laparotomie wurden die epididymalen Fettpolster entnommen (Abb. 2A) und nach dem Waschen in phosphate-buffered saline (PBS) in 10% Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM; 100U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe; Deutschland) überführt. Nachdem die Fettpolster 3-mal in PBS gewaschen wurden, wurden sie mit einer Mikroschere fein zerkleinert und in Kollagenase NB4G (0,5 U/ml; Serva, Heidelberg, Deutschland) unter starkem Rühren für 5 bis 7 Minuten (min) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> digestiert, was zur Destruktion der Fettzellen führte. Nach dem Neutralisieren der Kollagenase mit PBS + 20 % fötalem Kälber-Serum (FKS) (PAA) wurde die Suspension für 5 min bei 37°C inkubiert und danach der Überstand abgenommen. Das Inkubieren und Abnehmen des Fettüberstandes wurde 5-mal wiederholt. Die verbleibende Zellsuspension enthielt mikrovaskuläre Fragmente (Abb. 2B), welche durch Zentrifugieren über 10 min bei 40 x g in einem kleinen Volumen angereichert werden konnten. Dann wurden die Gefäßfragmente in PBS + 20 % FKS resuspendiert, um ihre Verklumpung zu verhindern.



**Abbildung 2:** **A:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines entnommenen epididymalen Fettpolsters. Die Blutgefäße innerhalb des Fettgewebes (A, Pfeile) sind gut zu erkennen (Maßstab: 2 mm). **B:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines aus dem Fettgewebe isolierten mikrovaskulären Gefäßfragments (Maßstab: 22 µm).

### 5.2.3. Besiedlung der Scaffolds

Die Besiedlung der nHa/PU-Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten erfolgte umgehend nach der Isolierung. Hierzu wurden die Scaffolds mit Hilfe eines Gummiringes im Lumen einer modifizierten 1 ml-Spritze (BD Plastipak; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) fixiert. Die Spritzenspitze wurde mit einer Suspension von 20 µl PBS gefüllt, welche die Gefäßfragmente enthielt (Abb. 3A). Anschließend wurde der Spritzenkolben mehrmals auf und ab bewegt (Abb. 3B). Durch den so erzeugten Über- bzw. Unterdruck wurde das PBS durch die Scaffolds gesogen bzw. gepresst, so dass die Gefäßfragmente in den Poren hängen bleiben konnten (Abb. 3C). Danach wurden die Scaffolds vorsichtig aus der Spritze entnommen und für histologische Analysen eingebettet oder direkt (s. *Studienabschnitt 1*) bzw. nach Präkultivierung (s. *Studienabschnitt 2*) in die Rückenhautkammer bzw. einen Femur-Segmentdefekt (s. *Studienabschnitt 3*) implantiert.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Besiedlung eines Scaffolds. **A:** Spritze zu Beginn des Besiedlungsvorgangs. 1 Suspension der mikrovaskulären Fragmente in der Spritzenspitze; 2 Scaffold; 3 Gummiring; 4 Spritzenkolben. **B:** Durch Herausziehen des Spritzenkolbens wird die Gefäßsuspension durch das Scaffold gesogen. **C:** Durch anschließendes Hineindrücken des Kolbens wird die Suspension durch das Scaffold gepresst und die Gefäßfragmente bleiben in den Poren hängen.

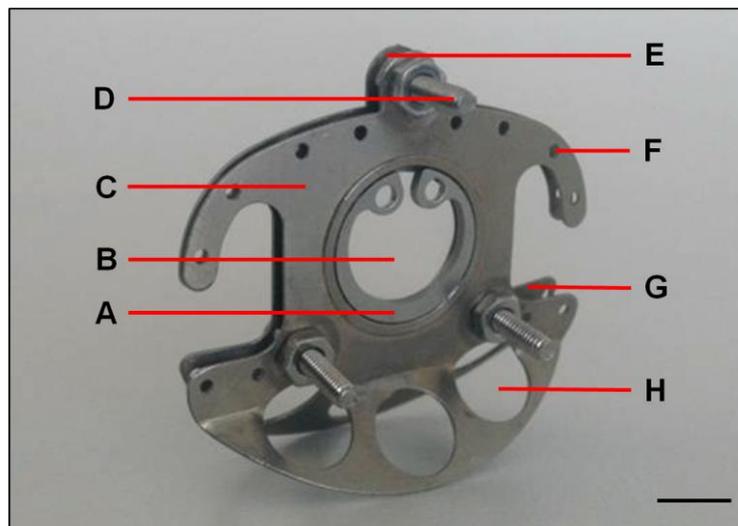
#### 5.2.4. Kultivierung der besiedelten Scaffolds

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die mit Gefäßfragmenten besiedelten Scaffolds zur Generierung eines Gefäßnetzwerks zunächst für 4 Wochen in angiogenem Medium kultiviert, bevor sie anschließend in die Rückenhautkammer transferiert wurden. Hierbei wurden mit den aus einer Spendermaus isolierten mikrovaskulären Fragmenten jeweils zwei Scaffolds besiedelt. Danach wurden die Scaffolds in 6-Well Platten in Endothelial Cell Growth (EC)-Medium (Promocell, Heidelberg, Deutschland) mit Zusatz von angiogenen Wachstumsfaktoren bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Als angiogene Wachstumsfaktoren wurden dem EC-Medium Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (25 ng/ml; Promokine, Berlin, Deutschland) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (25 ng/ml, Promokine) zugesetzt. Nach 4 Wochen Kultivierungszeit wurden die Scaffolds in die

Rückenhautkammer implantiert oder direkt für histologische und immunhistochemische Analysen eingebettet.

### 5.3. Modell der Rückenhautkammer

Das von Lehr et al. (1993) für die Anwendung an Mäusen etablierte Rückenhautkammermodell wird heute häufig für *in vivo* Studien zur Angiogenese eingesetzt.



**Abbildung 4:** Perspektivische Sicht auf eine Rückenhautkammer, die sich aus zwei symmetrischen Titanrahmen zusammensetzt (Gewicht: ~3,2 g). **A:** Sprengring zur Fixierung des Deckglases; **B:** Beobachtungsfenster (Durchmesser: 10 mm) mit Deckglas; **C:** Vorderer Titanrahmen; **D:** Verbindungsschraube; **E:** Schraubenmutter als Abstandshalter; **F:** Bohrungen für Fixationsfäden; **G:** Hinterer Titanrahmen; **H:** Materialaussparungen zur Gewichtsreduktion (Maßstab: 6 mm).

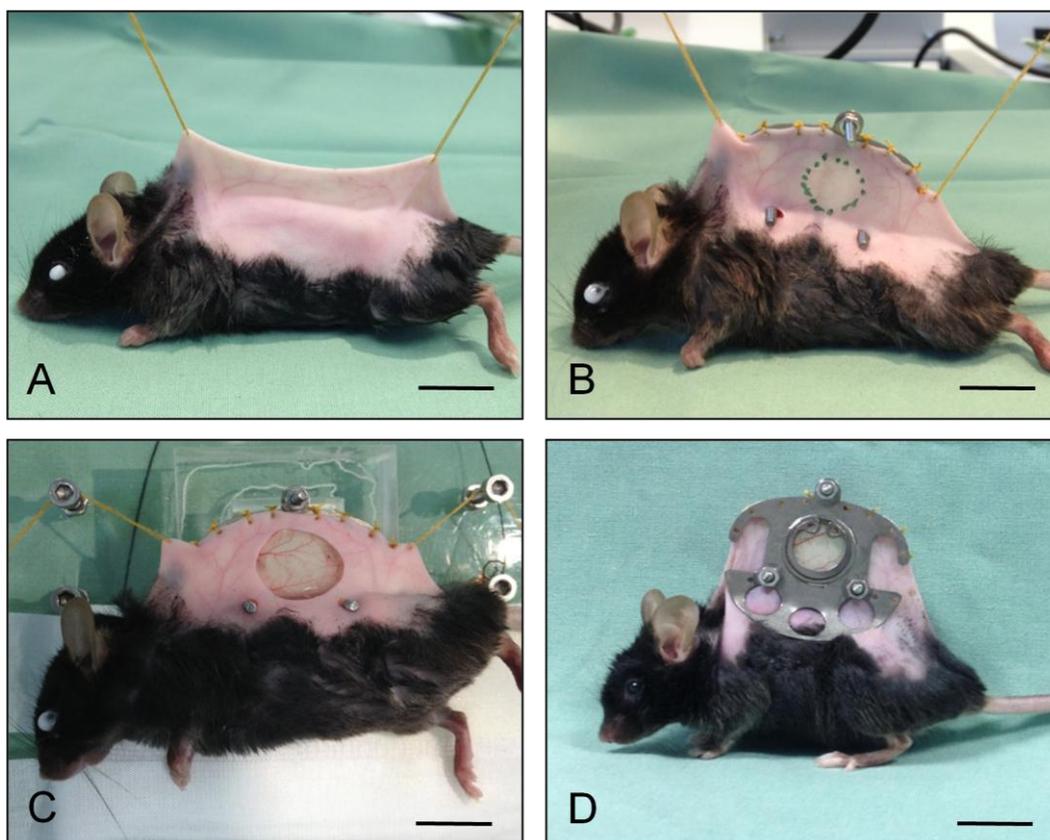
Nach der intravenösen Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht das Modell mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die Messung mikrozirkulatorischer Parameter im freipräparierten Rückenhautmuskel und darunterliegendem Subkutangewebe. Somit ist auch eine Untersuchung der Neubildung von Blutgefäßen innerhalb von Transplantaten und Implantaten in der Rückenhautkammer möglich. Die einzelnen Schritte der Angiogenese können

repetitiv über einen Zeitraum von ca. 2 Wochen visualisiert und anschließend mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems quantifiziert werden.

### **5.3.1. Implantation der Rückenhautkammer**

Vor der chirurgischen Implantation der Rückenhautkammer (Abb. 4) wurden die Versuchstiere mittels einer i.p. Injektion einer Narkoselösung aus Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Ketavet, Pharmacia GmbH) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Rompun, Bayer) narkotisiert. Danach wurde die Rückenhaut zunächst mittels Elektrorasur (Elektra II GH 204, Aesculap) und danach chemisch (Pilca med Creme, Asid Bonz, Böblingen, Deutschland) enthaart. Nach der Reinigung der Rückenhaut mit warmen Wasser und 70 %-igem Ethanol (Softasep N, Braun) konnte mit der eigentlichen Kammerpräparation begonnen werden.

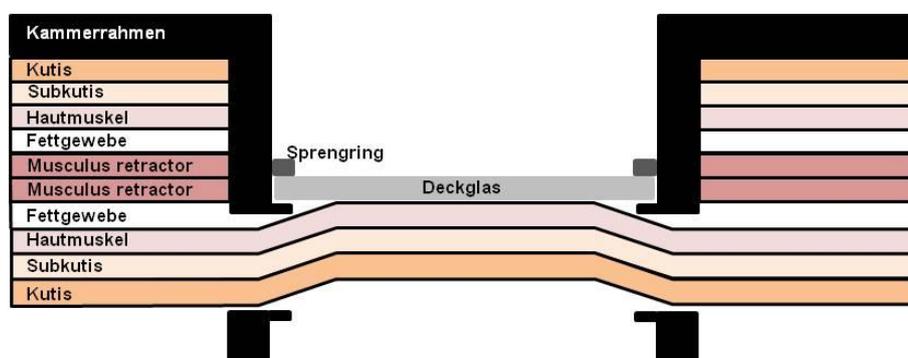
Die Rückenhaut des sich in Bauchlage befindlichen Versuchstieres wurde hierzu angehoben und mit zwei Haltefäden entlang ihrer Mittellinie horizontal aufgespannt (Abb. 5A). Dadurch war es möglich, unter Gegenlichtkontrolle die Rückseite der aus zwei Titanrahmen zusammengesetzten Rückenhautkammer an ihrem oberen Rand mit Nahtfäden an der Hautfalte zu fixieren. Im basalen Bereich der Hautfalte wurden mit einem Skalpell zwei kleine Inzisionen für die Verbindungsschrauben zur Kammervorderseite geschaffen. Danach wurden an den Verbindungsschrauben Gefäßklemmen angebracht, um den Rahmen zu fixieren und das Präparationsfeld unter Spannung zu halten. Bevor die Haltefäden gelöst und das Versuchstier in Seitenlage positioniert wurde, musste unter Gegenlichtkontrolle der Bereich des späteren Beobachtungsfensters markiert werden (Abb. 5B). Der markierte Bereich des zu präparierenden Gewebes wurde dabei in seinem Durchmesser größer gewählt als das eigentliche Beobachtungsfenster, um eine Gewebekompression zu vermeiden und eine physiologische Blutversorgung des Gewebes nach dem Anbringen der Kammervorderseite sicherzustellen. Im nächsten Schritt konnte mit Hilfe eines Stereo-Operationsmikroskops (Wild M650; Leica, Wetzlar, Deutschland) in dem markierten Bereich die Kutis, Subkutis mit quergestreiftem Hautmuskel sowie die beiden Schichten des Retraktormuskels einschließlich subkutanem Fettgewebe entfernt werden (Abb. 5C).



**Abbildung 5:** Einzelschritte der Kammerpräparation. **A:** Unter Gegenlichtkontrolle wird die Rückenhautfalte angehoben und mit Fäden fixiert, so dass die großen Gefäße der Rückenhaut genau aufeinander liegen (Maßstab: 10 mm). **B:** Die Kammerrückseite wird kranial des Insertionsgebietes des Retractor Muskels und kaudal der entlang der Schulterbasis verlaufenden Versorgungsgefäße implantiert. Anschließend wird unter Gegenlichtkontrolle das Beobachtungsfenster auf der Rückenhaut eingezeichnet (Maßstab: 10 mm). **C:** Entfernung der Kutis, Subkutis, des quergestreiften Unterhautmuskels und der zwei Schichten des Musculus retractor (Maßstab: 10 mm). **D:** Nach Fixierung des vorderseitigen Titanrahmens sind im Beobachtungsfenster die Blutgefäße des freipräparierten quergestreiften Hautmuskels zu erkennen (Maßstab: 12 mm).

Das verbleibende Gewebe, welches aus kontralateralem quergestreiftem Hautmuskel, Subkutangewebe und Haut bestand (Abb. 6), wurde mehrmals mit Kochsalzlösung gespült, bevor der vordere Titanrahmen auf den Verbindungsschrauben mit einem Abstand von 400 bis 500  $\mu\text{m}$  zum hinteren Rahmen positioniert und mit Stahlmuttern fixiert wurde. Das Deckglas wurde durch Adhäsion auf den freipräparierten Muskel unter Vermeidung von Lufteinschlüssen im Beobachtungsfenster platziert und mit einem Sprengring im Titanrahmen fixiert (Abb. 5D). Durch Abnahme des Sprengrings und des Deckglases war während des gesamten Versuchs jederzeit ein Zugang zum Beobachtungsfeld möglich. Nach der Implantation der Rückenhautkammer konnten sich die Versuchstiere 48 h von dem

chirurgischen Trauma und der Narkose erholen, bevor die Versuche fortgesetzt wurden.



**Abbildung 6:** Schematischer Querschnitt der Rückenhaut nach Kammerpräparation.

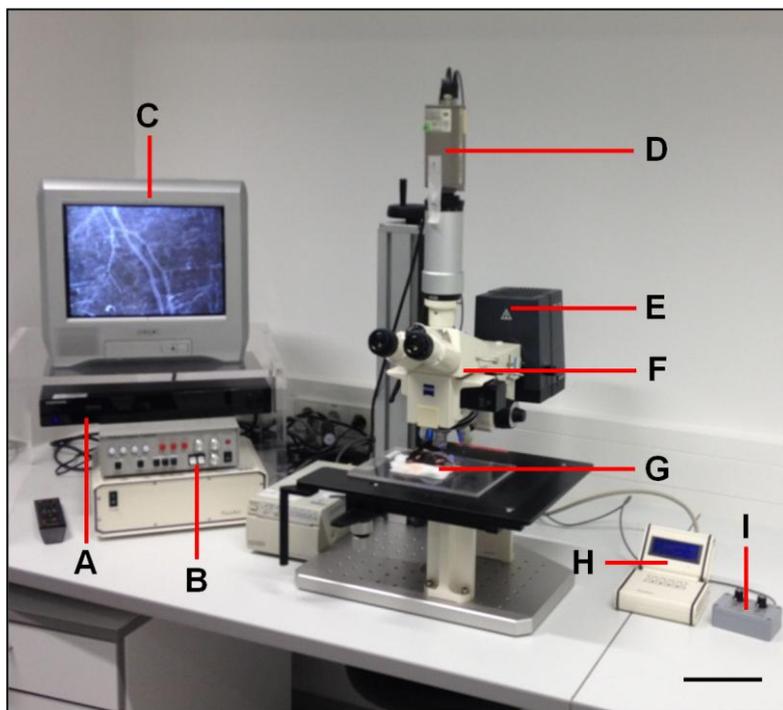
### 5.3.2. Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammer

Für die Implantation eines Scaffolds in die Rückenhautkammer wurden die Empfängertiere mittels einer i.p. Injektion einer Narkoselösung aus Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Ketavet, Pharmacia GmbH) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Rompun, Bayer) narkotisiert und auf einer speziell angefertigten Plexiglasbühne fixiert. Nachdem der Sprengring und das Deckglas entfernt waren, wurde das Scaffold zentral im Beobachtungsfenster platziert. Anschließend wurden einige Tropfen 0,9 %-ige NaCl-Lösung (Braun) hinzugegeben, um beim erneuten Verschließen der Kammer mit einem neuen Deckglas Lufteinschlüsse zu vermeiden.

## 5.4. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

### 5.4.1 Durchführung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Vaskularisierung der implantierten Scaffolds innerhalb der Rückenhautkammer (s. Studienabschnitt 1 und 2) wurde mit Hilfe der Technik der intravitale Fluoreszenzmikroskopie analysiert.



**Abbildung 7:** Arbeitsplatz für intravitale Fluoreszenzmikroskopie. **A:** DVD-Recorder. **B:** Videotimer. **C:** Monitor. **D:** Kamera. **E:** Quecksilberdampfampe. **F:** Mikroskop. **G:** Versuchstier. **H:** Lampensteuerung. **I:** Kamerasteuerung (Maßstab: 12 cm).

Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurden die Mäuse mit einer i.p. Injektion einer Narkoselösung aus Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Ketavet, Pharmacia GmbH) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Rompun, Bayer) narkotisiert. Danach wurden sie auf einer speziellen Plexiglasbühne in Seitenlage fixiert, was eine horizontale Positionierung des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer unter dem Mikroskop ermöglichte. Zuerst erfolgte die Mikroskopie ohne Injektion eines Kontrastmittels, um in Blaulicht-Epi-Illumination GFP-positive Gefäße identifizieren zu können. Anschließend wurden den Tieren 0,05 ml des Plasmamarkers 5 % Fluoreszein-Isotiozyanat (FITC)-markiertes Dextran (Molekulargewicht: 150.000 Da; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) retrobulbär injiziert, um Blut-perfundierte Gefäße in Blaulicht-Epi-Illumination darzustellen. Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde ein modifiziertes Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet, welches mit einer 100 Watt Quecksilber (HBO)-Dampfampe und einem zwischengeschalteten Filterblock ausgestattet war. Dies ermöglichte eine Anregung mit Licht der Wellenlängen 330 -390 nm, 450 - 490 nm und 530 - 560 nm. Die Visualisierung der mikroskopischen Bilder erfolgte mit

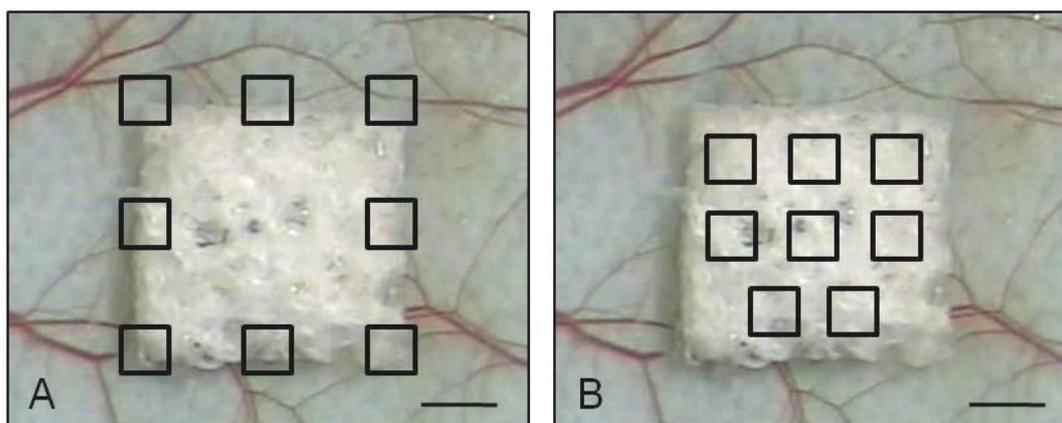
einer CCD (charge coupled-device)-Videokamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Germany) auf einem 14 Zoll Monitor (Trinitron, Sony, Tokyo, Japan). Die Aufnahmen wurden auf einem DVD-System für weitere Verwendung gespeichert (Abb. 7). Hierbei konnten mit Hilfe von 5x, 10x und 20x Objektiven mit langem Arbeitsabstand (Zeiss) Vergrößerungen von x115, x230, x460 auf dem Monitor erzielt werden.

#### **5.4.2. Mikrozirkulatorische Parameter**

Die auf DVD aufgezeichneten mikroskopischen Bilder wurden mit Hilfe des Computer-assistierte Bildverarbeitungssystems CapImage (Version 6.02; Dr. Zeintl, Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Hierzu wurden an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammer im Randbereich und im Zentrum der Implantate Aufnahmen im 20x Objektiv gemacht. An diesen wurden jeweils die Zahl der perfundierten Regions of Interest (ROIs) und die funktionelle Kapillardichte bestimmt. Dabei wurden die Implantate jeweils in 8 ROIs im Randbereich und 8 ROIs im Zentrum eingeteilt (Abb. 8). Diese Einteilung wurde für alle Untersuchungstage und alle Versuchstiere beibehalten, um eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse gewährleisten zu können.

##### **5.4.2.1. Perfundierte ROIs**

Die Analyse der Vaskularisierung der implantierten Gewebekonstrukte erfolgte durch die Auszählung perfundierter ROIs (Abb. 8). Anhand der Mikroskopiebilder im 20x-Objektiv wurde ermittelt, wie viele ROIs perfundierte Blutgefäße aufwiesen. Diese wurden dann als prozentualer Anteil aller ausgewerteten ROIs angegeben.



**Abbildung 8:** Stereomikroskopische Aufnahmen eines Scaffolds nach Implantation in die Rückenhautkammer. **A:** 8 definierte ROIs im Randbereich. **B:** 8 definierte ROIs im Zentrum des Scaffolds (Maßstab: 0,85 mm).

#### 5.4.2.2. Funktionelle Kapillardichte

Zur Messung der funktionellen Kapillardichte wurden alle neugebildeten und reperfundierten Blutgefäße in den jeweiligen ROIs auf dem Computer mit der Maus nachgefahren, wodurch ihre Gesamtlänge und Dichte pro Beobachtungsfeld ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) ermittelt werden konnte. Dabei wurden nur Gefäße berücksichtigt, welche zum Untersuchungszeitpunkt mit Blut perfundiert waren.

### 5.5. Histologie und Immunhistochemie

#### 5.5.1. Histologische Präparate

Nach der letzten intravitalmikroskopischen Untersuchung an Tag 14 wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Anästhetikum euthanasiert und das Gewebe der Rückenhautkammer für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen entnommen. Die Proben wurden in 4 %-iger Formaldehydlösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei  $20^\circ\text{C}$  für 24 h fixiert. Danach wurden  $2\ \mu\text{m}$  dicke Serienschritte angefertigt, welche entsprechend gefärbt wurden.

Mittels einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach Standardprotokoll konnte das neugebildete Granulationsgewebe um und in den Implantaten dargestellt werden.

Zur Unterscheidung von neugebildeten GFP-negativen Gefäßen und sich aus den Gefäßfragmenten entwickelnden GFP-positiven Gefäßen wurde eine CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung durchgeführt. Endothelzellen sowie Gefäßwandstabilisierende Zellen in den mikrovaskulären Fragmenten wurden mittels einer CD31- $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (SMA)-Doppelfluoreszenzfärbung detektiert. Zur Untersuchung der Immunreaktion des Empfängergewebes wurde eine Myeloperoxidase (MPO) Färbung und eine F4/80 Färbung durchgeführt.

### **5.5.2. CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung**

Für die CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung wurde ein Ratte-Anti-Maus CD31-Antikörper (1:25; BD Biosciences) als Primärantikörper verwendet. Als Sekundärantikörper diente ein Ziege-Anti-Ratte Cy3 Antikörper (1:600; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland). Die zu färbenden Schnitte wurden in Plastikkuvetten eine Stunde bei 97°C mit 0,05 % Citraconsäureanhydrid Puffer (pH 7,4; Sigma-Aldrich) gekocht und danach bei Raumtemperatur abgekühlt. Über Nacht erfolgte bei 4°C die Inkubation mit einem Ziege-Anti-GFP Antikörper (1:200; Biomol, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad (GFL 1083; GFL, Burgwedel, Deutschland) mit einem Biotin-markierten Affe-Anti-Ziege-Antikörper (1:15; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, MD, USA), welcher zur Verstärkung des GFP-Signals diente, inkubiert. Um das GFP-Signal nachzuweisen, wurde FITC-markiertes Streptavidin (1:50; Vector Labs, Burlingame, LA, USA) hinzugegeben, welches grün leuchtete. Die Kernfärbung erfolgte mittels Hoechst (1:500; Sigma-Aldrich). Für nicht implantierte Scaffolds, die direkt nach der Besiedlung untersucht wurden, wurde das gleiche Färbeprotokoll verwendet.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem BZ-8000 Mikroskopsystem (Keyence, Osaka, Japan). Die GFP-positiven und GFP-negativen Gefäße wurden im Randbereich und Zentrum der Gewebekonstrukte ausgezählt und ihr Anteil an der Gesamtgefäßzahl (in %) angegeben.

### 5.5.3. CD31- $\alpha$ -SMA-Doppelfluoreszenzfärbung

Zur Detektion von Endothelzellen und Gefäßwand-stabilisierenden Zellen wurden die Schnitte von frisch besiedelten Scaffolds gegen CD31 und  $\alpha$ -SMA gefärbt. Als Primärantikörper wurde ein Ratte-Anti-Maus Antikörper gegen CD31 (1:30; Dianova GmbH) verwendet, mit welchem der Schnitt über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper, einem monoklonalen Maus-Anti- $\alpha$ -SMA Antikörper (1:50; Sigma-Aldrich) über 2 h bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Sekundärantikörper hinzugegeben. Als Sekundärantikörper dienten ein Ziege-Anti-Ratte Cy3 Antikörper (1:50; Dianova GmbH) und ein Ziege-Anti-Maus Alexa488 Antikörper (1:200; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Schließlich folgte die Kernfärbung mittels Hoechst (1:500; Sigma-Aldrich). Die Visualisierung der Färbung erfolgte ebenfalls mit Hilfe des BZ-8000 Mikroskopsystems (Keyence).

### 5.5.4. MPO Färbung und F4/80 Färbung

Die Visualisierung MPO-positiver neutrophiler Granulozyten und F4/80-positiver Makrophagen in dem die Implantate umschließenden Granulationsgewebe erfolgte mittels einer Avidin-Biotin-Komplex-Immunhistochemie. Hierzu wurden ein polyklonaler Kaninchen-Anti-MPO Antikörper (0,01 mg/ml; Abcam, Cambridge, UK) und ein monoklonaler Ratte-Anti-F4/80 Antikörper (1:50; Abcam) als Primärantikörper verwendet. Als Sekundärantikörper folgten ein Ziege-Anti-Kaninchen IgG Biotin Antikörper (gebrauchsfertig; Abcam) und ein Ziege-Anti-Ratte IgG Biotin Antikörper (1:50; Dianova GmbH). Als Chromogen wurde 3,3' Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich) benutzt. Die Schnitte wurden mit Mayer's Hemalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Die quantitative Analyse der Zahl neutrophiler Granulozyten und Makrophagen im Granulationsgewebe erfolgte mit Hilfe eines BX60 Mikroskops (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Dabei wurde der prozentuale Anteil neutrophiler Granulozyten und Makrophagen an der Gesamtzellzahl in 10 High-Power-Fields bestimmt.

## **5.6. *In vitro* Analyse der mikrovaskulären Fragmente**

### **5.6.1. Vitalitätsfärbung**

Apoptotischer und nekrotischer Zelltod in den mikrovaskulären Fragmenten wurde in kleinen Gefäßfragmentproben mittels Fluoreszenzmikroskopie direkt nach dem Isolierungsprozess sowie nach 24 h Kultivierung in 10 % DMEM (PAA) untersucht. Hierzu wurden die Gefäßfragmente 10 min in 2 µg/ml Bisbenzimid (Sigma-Aldrich) gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich in die DNA ein. Somit können apoptotische Zellen anhand vermehrter Chromatinkondensation und -fragmentation identifiziert werden. Zur Visualisierung nekrotischer Zellen wurden die Gefäßfragmente zusätzlich mit 2 µg/ml Propidiumiodid (Sigma-Aldrich) gefärbt. Propidiumiodid kann nur die Zellmembran von toten Zellen durchdringen. Somit konnten nekrotische Zellen auf Grund ihrer rötlichen Färbung identifiziert werden. Die Analysen erfolgten mit Hilfe eines BZ-8000 Mikroskops (Keyence).

### **5.6.2. Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)**

Um zu prüfen, ob mikrovaskuläre Fragmente auch angiogene Wachstumsfaktoren freisetzen, wurden Gefäßfragmente aus 4 Spendermäusen isoliert und für 72 h in 600 µl DMEM (10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin; PAA) in einer 48-Well Platte (Greiner Bio-one GmbH, Melsungen, Deutschland) kultiviert. Anschließend wurden von jedem Well 100 µl des Überstandes im ELISA analysiert, wobei jede Probe doppelt untersucht wurde. Die erhaltenen Werte wurden gegenüber Kontrollwerten von Messungen in reinem Kulturmedium korrigiert. Die Bestimmung der Menge des von den kultivierten Gefäßfragmenten in das Medium abgegebenen VEGF, bFGF und Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) erfolgte mit Hilfe von ELISA-Kits (VEGF, PDGF-BB: R&D Systems, Abingdon, UK; bFGF: RayBiotech, Norcross, GA, USA) unter Verwendung von rekombinatem murinen VEGF, bFGF und PDGF-BB als Standard.

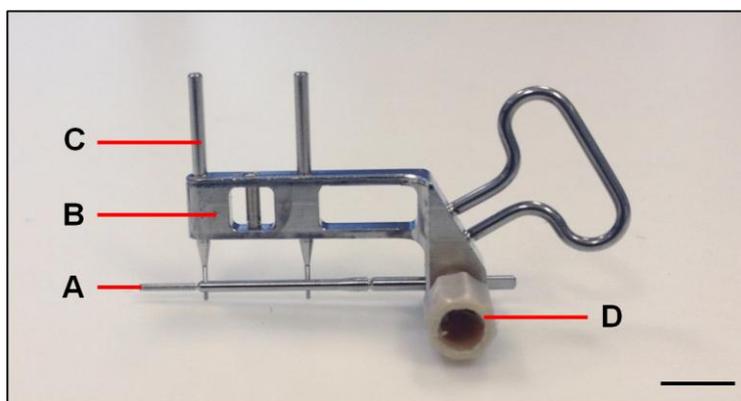
### 5.6.3. Durchflusszytometrische Analyse

Um zu analysieren, ob mikrovaskuläre Fragmente mesenchymale Stammzellen (MSCs) oder endotheliale Progenitorzellen (EPCs) enthalten, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierzu wurden Gefäßfragmente aus 4 Spendermäusen isoliert und für 30 min in Akkutase (PAA) zu Einzelzellen digestiert. Anschließend wurden die Zellen auf die Expression sowohl der mesenchymalen Stammzellmarker CD117-FITC (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) und unmarkiertem Ratte-Anti-Maus CD73 (BD Pharmingen) als auch die EPC-Marker-Kombination Sca-1-FITC (BD Pharmingen) und VEGFR-2-PE (BD Pharmingen) untersucht, wobei Isotyp-identisches Ratten IgG2ak (BD Pharmingen) und Ziege-Anti-Ratte IgG-Cy3 (Dianova GmbH) als Kontrolle dienten. Die Durchflusszytometrie wurde mittels eines FACScan (BD Pharmingen) durchgeführt und die Daten mit dem Software-Paket CellQuest (BD Pharmingen) ausgewertet.

## 5.7. Segmentdefektmodell

### 5.7.1. LockingMouseNail®

Die *in vivo* Versuche des dritten Studienabschnitts der vorliegenden Arbeit erfolgten in einem Femur-Segmentdefektmodell, bei dem der Defekt mittels eines LockingMouseNail® (Abb. 9) (RI-Systems, Davos, Schweiz) stabilisiert wurde. Der LockingMouseNail® wurde 2010 von Garcia et al. etabliert und ermöglicht eine standardisierte Fixierung von Femurfrakturen sowie die Stabilisierung von Segmentdefekten bei der Maus. Der Vorteil dieser Fixierung gegenüber anderen Implantaten liegt in der verbesserten axialen Stabilität und Rotationsstabilität (Garcia et al., 2011). Des Weiteren kann die Größe des Defektspalts im Bereich von 0,25 - 2 mm gewählt werden. Dadurch bietet der LockingMouseNail® die Möglichkeit, die biologischen Eigenschaften sowie die Wirksamkeit von Knochenersatzstoffen und Gewebekonstrukten in unterschiedlich großen Defekten zu untersuchen.

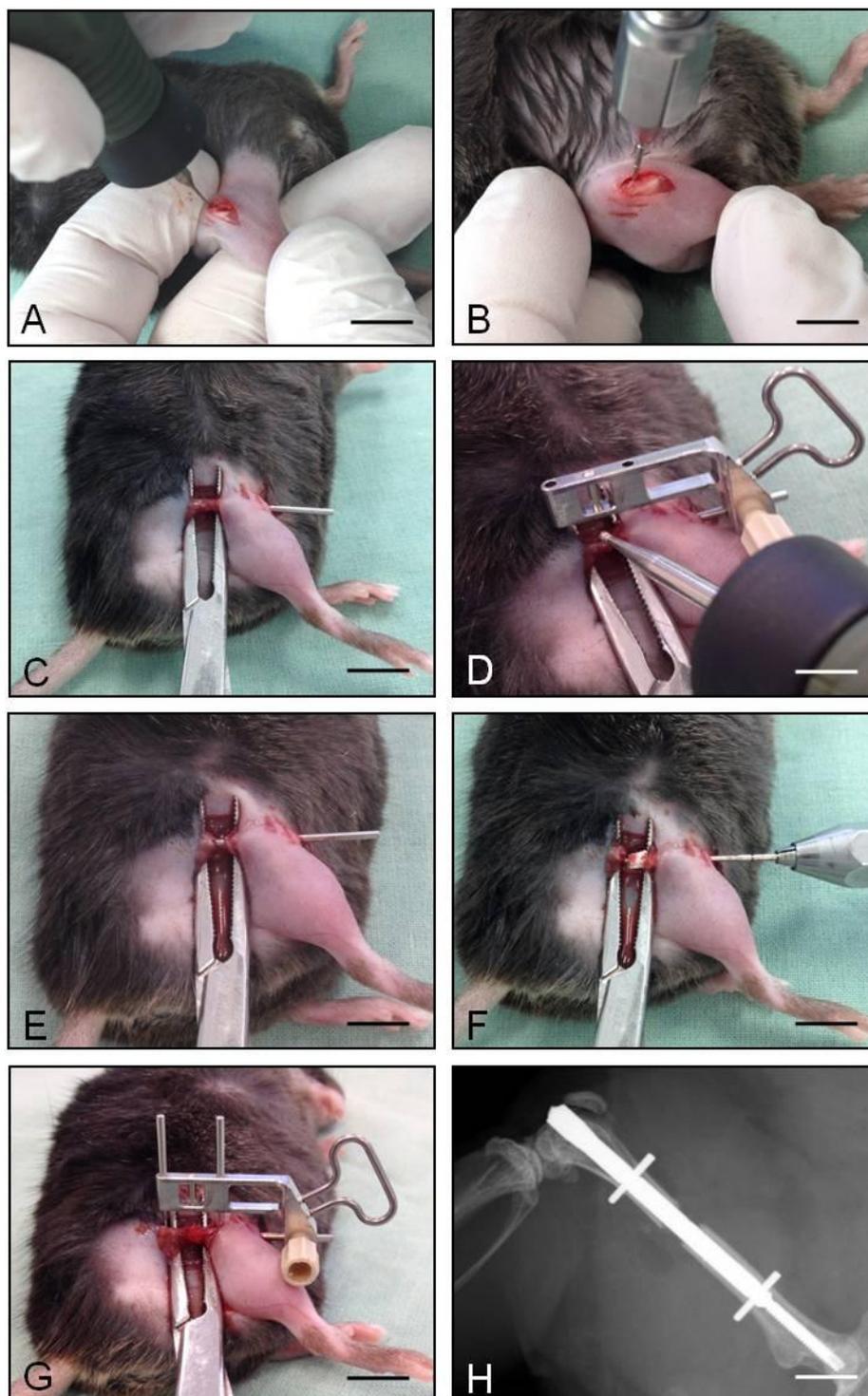


**Abbildung 9:** Perspektivische Sicht auf einen LockingMouseNail® inklusive Zielbügel. **A:** Marknagel. **B:** Zielbügel. **C:** Verriegelungspin. **D:** Feststellschraube (Maßstab: 5 mm).

### 5.7.2. Implantation des LockingMouseNail® mit Scaffold

Vor der Implantation des LockingMouseNail® wurden die Versuchstiere mittels einer i.p. Injektion einer Narkoselösung aus Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Ketavet, Pharmacia GmbH) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Rompun, Bayer) anästhesiert. Danach wurde der Bereich des rechten Knies und Oberschenkels zuerst mittels einer Elektrorasur (Elektra II GH 204, Aesculap) und danach chemisch (Pilca med Creme, Asid Bonz) enthaart. Nachdem der depilierte Bereich mit warmem Wasser und 70 %igem Alkohol (Softasept N, Braun) gereinigt wurde, konnte mit der Implantation begonnen werden.

Am rechten Knie des Versuchstieres wurde ein etwa 4 mm langer Schnitt gemacht und die Patella lateral zur Seite geschoben, um die interkondyläre Notch freizulegen. Nachdem ein 0,8 mm großes Loch in die interkondyläre Notch gebohrt wurde (Proxxon GG12; Niersbach, Deutschland) (Abb. 10A), konnte der Marknagel in den Markkanal eingebracht werden (Abb. 10B). Danach wurde die Mitte des Femurs lateral freigelegt (Abb. 10C), der Zielarm am LockingMouseNail® angebracht und mit einer Schraube fixiert (Abb. 10D). Anschließend wurde mittels einer Diamantfräse (Proxxon 1,8 mm) unter ständiger Kühlung mit Kochsalzlösung ein 1,8 mm breiter Segmentdefekt zirkulär um den Pin herum erzeugt (Abb. 10E). Danach wurde der Marknagel bis zu dem Defekt wieder aus dem Markkanal herausgedreht.



**Abbildung 10:** Implantation des LockingMouseNail®. **A:** Mit dem Fräsbohrer wird die Kortikalis der interkondylären Notch durchbohrt. **B:** Der Marknagel wird mit Hilfe des Marknageldrehers in den Markkanal gedreht. **C:** Der Femurknochen wird freipräpariert. **D:** Nach Befestigung des Zielbügels wird mittels einer Diamantfräse ein Segmentspalt in der Mitte zwischen den Verriegelungspins erzeugt. **E:** Erzeugter Segmentdefekt. **F:** Implantation eines nHA/PU-Scaffolds durch Herausziehen des Marknagels bis zum Segmentdefekt und Durchführen durch das Scaffold. **G:** Nach dem Einführen des Marknagels im oberen Segmentdefekt wird der Zielarm angebracht und die beiden Verriegelungspins im Marknagel positioniert (Maßstab A-G: 7 mm). **H:** Repräsentative Röntgenaufnahme des implantierten LockingMouseNails® mit einem Segmentspalt von 1,8 mm (Maßstab: 2,3 mm).

Der Marknagel wurde zuerst durch ein nHA/PU-Scaffold (Abb. 1) geschoben und dann wieder in den Markkanal des oberen Femursegments gedreht (Abb. 10F), wodurch die beiden Femursegmente stabilisiert waren und das Scaffold die Verbindung über den Segmentdefekt bildete. Mit Hilfe des Zielarms wurden nun zwei Löcher mit einem Durchmesser von jeweils 0,3 mm in das Femur gebohrt, in welche die Fixierungspins gedreht wurden (Abb. 10G), bis sie an der Sollbruchstelle brachen. Nach dem Entfernen des Zielarmes und dem Abtrennen des Marknagels am distalen Ende wurde die Wunde mit einem 6-0 Polypropylenfaden (Prolene; Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Unmittelbar nach der Implantation wurde mit Hilfe eines hochauflösenden Faxitron MX-20D (Faxitron, Lincolnshire, IL, USA) eine Röntgenaufnahme des Femurs gemacht, um den korrekten Sitz des Nagels und der Pins zu überprüfen (Abb. 10H).

## **5.8. Radiologische Analysen**

### **5.8.1. Röntgen**

Die Detektion der Knochenheilung im dritten Studienabschnitt erfolgte mittels Röntgenaufnahmen. Hierzu wurden in Woche 2, 5, 10 und 25 nach Implantation der Scaffolds in den Segmentdefekt eine ventro-dorsale Röntgenaufnahme des Femurs gemacht (MX-20D; Faxitron). Die Röntgenbilder von Woche 25 wurden mittels des semiquantitativen Goldberg-Scores ausgewertet (Goldberg et al., 1985). Hierbei wurden für eine eindeutige Überbrückung des Segmentspaltes zwei Punkte, eine eventuelle Überbrückung ein Punkt und für keine Überbrückung null Punkte vergeben.

### **5.8.2. Präparation der Knochen**

Nach 25 Wochen wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Anästhetikum euthanasiert. Das operierte Femur wurde durch Exartikulation am Hüft- und

Kniegelenk entnommen und für weitere Untersuchungen präpariert, wobei der Weichteilmantel entfernt und der LockingMouseNail<sup>®</sup> vorsichtig explantiert wurde.

### 5.8.3. *In vitro* $\mu$ CT

Die Femora wurden in einem *in vitro*  $\mu$ CT (Skyscan 1172, Software Version 1.5; Bruker-Microct, Kontich, Belgien) mit folgenden Parametern gescannt:

- Kamerapixelgröße = 8,60  $\mu$ m
- Source Voltage = 40 kV
- Source Current = 250  $\mu$ A
- Bildpixelgröße = 8,0  $\mu$ m
- Filter = Al 0,5 mm
- Rotationsschritt = 0,4°
- Frame Averaging = 2
- Random Movement = 10
- 360° Drehung

Danach mussten die Scans mit der Software Skyscan NRecon 1.6.2.0 (Bruker-Microct) rekonstruiert werden, um sie anschließend mit der Analysesoftware (Skyscan CT Analyser, Version: 1.10.1.0; Bruker-Microct) auswerten zu können.

Die Rekonstruktion wurde mit folgenden Programmeinstellungen durchgeführt:

- Smoothing = 3
- Ring Artifact Correction = 5
- Beam Hardening Correction = 85 %
- Object Bigger than FOV = ON

Mittels der Analysesoftware wurde zunächst die Größe des Segmentspaltes in den einzelnen Proben gemessen. Für das auszuwertende Volumen wurde anhand der Größe des Segmentdefekts eine Höhe von 0,4 mm gewählt und zur Beschreibung der Fläche wurden die Proben in den einzelnen Querschnitten konturiert. Bei jedem Femur wurden zwei 3D-Analysen durchgeführt, welche sich nur in der Festlegung der

Graustufengrenzwerte unterschieden. Hoch mineralisierter Knochen wurde mit einer Knochendichte von mehr als  $0,642 \text{ g/cm}^3$  (Morgan et al., 2009) und niedrig mineralisierter Knochen mit einer Dichte von  $0,410 - 0,642 \text{ g/cm}^3$  (Isaksson et al., 2009) definiert. Diesen Dichtewerten wurden nach der Studie von Bosemark et al. (2013) die Grauwerte von 98 bis 225 für hochmineralisierten bzw. von 68 bis 97 für niedrigmineralisierten Knochen zugeordnet. Eine visuelle Kontrolle der Proben nach der Einstellung der entsprechenden Grauwerte bestätigte die Ergebnisse der genannten Studien.

Folgende Parameter wurden bei der 3D-Analyse für hoch und niedrig mineralisierten Knochen bestimmt:

- Gesamtgewebe
- Knochengewebe
- Anteil Knochen an Gesamtgewebe
- Trabekeldicke
- Trabekelanzahl
- Abstand zwischen den Trabekeln

Zudem erfolgte eine 2D-Analyse, bei der sich die Graustufen über den Bereich von hoch und niedrig mineralisiertem Knochen erstreckten. Basierend auf diesen Grauwerten und den o.g. Einstellungen konnte mittels einer in das  $\mu\text{CT}$  eingebauten und voreingestellten Auswertemethode der polare Torsionswiderstand (PMOI) im Bereich der ROI ermittelt werden. Der PMOI beschreibt den Widerstand von Schaftquerschnitten gegen Torsion. Dabei ist er proportional zum Quadrat des Abstandes ( $\text{mm}^2$ ) eines Flächenelements zur Torsions- bzw. Biegeachse sowie zum Flächeninhalt eines Flächenelements ( $\text{mm}^2$ ). Der PMOI berechnet sich bei einer Röhre mit der Formel  $J = \pi (R^4 - r^4) / 2$ . Dabei ist R der äußere und r der innere Schaftabstand von der Rotationsachse (Budynas & Nisbett, 2008). Daraus ergibt sich die Einheit  $\text{mm}^4$ .

## 5.9. Histomorphometrie

Die Histomorphometrie diente zur Analyse der Zusammensetzung des Gewebes im Bereich des Femur-Segmentdefekts.

Nach der abgeschlossenen Analyse der Femora im  $\mu$ CT wurden die Knochen für 48 h in 4 % gepuffertem Formalin fixiert und über 4 Wochen in 10 % EDTA bei 4°C entkalkt. Anschließend wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 1 h mit 70 %, 80 %, 90 %, sowie viermal 1 h mit 100 % Alkohol (Braun)) die entkalkten Präparate entwässert. Danach wurden die Proben dreimal für je 1 h mit Xylol behandelt, um das Gewebe paraffingängig zu machen. Abschließend folgte die Einbettung der Knochen für 1 h in heißem Paraffin. Von den eingebetteten Präparaten wurden im weiteren Verlauf 5  $\mu$ m dicke Schnittpräparate in sagittaler longitudinaler Schnittführung angefertigt und nach der Masson-Goldner-Methode gefärbt.

Hierzu wurden die Präparate 1 - 2 min in Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt und danach 10 - 15 min unter fließendem Wasser gespült. Anschließend folgte die Färbung über 5 - 7 min in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin. Nach Spülung mit 1 % Essigsäure (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurden die Schnitte mit Molybdätophosphorsäure-Orange bzw. Wolframatophosphorsäure-Orange behandelt, bis die völlige Entfärbung des Bindegewebes erreicht war. Danach folgte eine weitere Spülung mit 1 % Essigsäure (VWR International GmbH). Die Schnitte wurden mit Lichtgrün für 5 min gegengefärbt und abschließend mit 1 % Essigsäure (VWR International GmbH) für 5 min ausgewaschen sowie in Isopropanol (Heidinger, Stuttgart, Deutschland) entwässert.

Die Visualisierung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines BZ-8000 Mikroskopsystems (Keyence).

## 5.10. Western-Blot

Das Western- oder Immunoblotting wird als Methode zur quantitativen Messung der Proteinexpression in Geweben verwendet.

Die Expression des Endothelzellmarkers CD31 und des Fluoreszenzproteins GFP in Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds, die in Femur-Segmentdefekte implantiert wurden, wurde nach zweiwöchiger Heilungsphase mittels Western-Blot-Analyse quantifiziert. Hierzu wurden vor der Tötung der Tiere die Scaffolds unter Narkose explantiert. Das um die Scaffolds befindliche Gewebe wurde exzidiert, sodass die Proben nur noch aus Scaffold und dem darin eingewachsenen Gewebe bestanden. Die Proben wurden nach der Entnahme direkt in je 50 µl Lyse-Puffer (4 °C) mit einem Proteinaseinhibitor-Cocktail (1:75; Sigma-Aldrich), 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1:500; Sigma-Aldrich) und einem Phosphataseninhibitor-Cocktail (1:200; Sigma-Aldrich) gegeben. Anschließend wurden die Proben für 120 min auf Eis inkubiert und für 30 min bei 13000 U/min (16000 x g) und 4°C (Biofuge Fresco, Kendro, Hanau, Deutschland) zentrifugiert. Danach wurden die Überstände abpipettiert und zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry eingesetzt (Lowry et al., 1951).

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Standardkurve ermittelt, wobei für jedes Proteinextrakt eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Danach wurden die Extrakte auf gleiche Proteingehalte (15 µg/15 µl) eingestellt und mit Laemmli-Puffer 2x (Sigma-Aldrich) für 5 min in kochendem Wasser denaturiert. Die Western-Blot-Analysen wurden als SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter diskontinuierlichen Bedingungen nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dabei betrug die Acrylamidkonzentration 5 % im Sammelgel und 10 % im Trenngel (30 % Acrylamid/ Bis Solution; 29:1, BioRad, München, Deutschland).

Die Proteine wurden nach ihrer Molekülgröße mittels einer vertikalen Elektrophorese (Mini-Protean II, BioRad) in einem TRIS/Glycinpuffer (0,125 M TRIS Base, 0,96 M Glycin, 0,5 % SDS, Roth) aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mittels Semi-Dry-Blotting (Trans-Blot Turbo; BioRad) auf eine PVDF-Membran (0,2 µm Porengröße, BioRad) transferiert.

Die Detektion der Targetproteine erfolgte mittels einer spezifischen Antikörperfärbung. Hierzu erfolgte zunächst die Inkubation der Primärantikörper (Tab. 1).

<b>Antikörper</b>	<b>Klon/Spezies</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Verdünnung/ Inkubation über Nacht</b>	<b>Verdünnung/ Inkubation für 3,5 h bei RT</b>
CD31	Ratte	Dianova, Hamburg, Deutschland	1 : 100	1 : 300
GFP	Ziege	Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA, USA	1 : 50	1 : 300

*Tabelle 1: Primärantikörper für die Western-Blot-Analysen*

Nach der Sekundärantikörper-Inkubation (Tab. 2) wurden die Membranen einer Chemilumineszenzreaktion unterzogen (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland).

<b>Primär- Antikörper</b>	<b>Sekundär- Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle des Sekundär- Antikörpers</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubation</b>
CD31	Kaninchen- $\alpha$ - Ratte-IgG- POD	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland	1 : 5000	1,5 h bei RT
GFP	Kaninchen- $\alpha$ - Ziege-IgG- POD	Dako Cytomation	1 : 1000	1,5 h bei RT

*Tabelle 2: Sekundärantikörper für die Western-Blot-Analysen*

Die Visualisierung der Signale der behandelten Membranen erfolgte durch die Exposition von Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, GE Healthcare).  $\beta$ -Aktin ist eines der höchst-konservierten eukaryotischen Proteine mit konstanter intrazellulärer Verteilung. Daher wurde der monoklonale  $\beta$ -Aktin-Antikörper Klon AC-15 (Sigma-Aldrich) zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers verwendet. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass durch die enzymatische Extraktion der Zellen aus den Scaffolds  $\beta$ -Aktin nicht mehr exprimiert wurde. Aus diesem Grund wurden die zu analysierenden Proben lediglich auf gleiche Proteingehalte eingestellt.

Die Auswertung der Röntgenfilme erfolgte mittels eines Gel-Dokumentationssystems (Gel Doc, BioRad) und eines entsprechenden Quantifizierungsprogramms (Quantity One-Gel Doc, BioRad). Die quantitative Analyse der Proteinmuster wurde durch die densitometrische Bestimmung ermittelt. Hierbei wurde die optische Dichte der Banden über die Fläche ihrer Ausdehnung analysiert.

## **5.11. Experimentelles Protokoll**

### **5.11.1. Versuchsablauf**

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 31 Scaffolds in die Rückenhautkammer von 31 C57BL/6 Mäusen und 29 Scaffolds mittels LockingMouseNail<sup>®</sup> in 29 Femur-Segmentdefekte von C57BL/6 Mäusen implantiert. Zudem wurden 8 Scaffolds direkt nach der Besiedlung histologisch und immunhistochemisch analysiert. Je nach Versuchsgruppe wurden leere Scaffolds, frisch besiedelte oder 4 Wochen vorkultivierte Scaffolds in die Rückenhautkammer implantiert. In den Femur-Segmentdefekt wurden leere oder frisch mit Gefäßfragmenten besiedelte Scaffolds eingesetzt.

Die Präparation der Rückenhautkammer erfolgte 48 h vor Implantation der Scaffolds, um den Tieren eine ausreichende Erholung von der Narkose und dem chirurgischen Trauma zu ermöglichen. Direkt nach der Implantation sowie an Tag 3, 6, 10 und 14 erfolgte die Analyse der Gewebekonstrukte mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie. Durch die tägliche makroskopische Beurteilung der Kammern während des Versuchs konnten Tiere mit entzündeten Kammern rechtzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen werden. Nach Beendigung der mikroskopischen Untersuchung an Versuchstag 14 wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkose eingeschläfert und Gewebeproben für histologische und immunhistochemische Analysen entnommen.

Während der Implantation des LockingMouseNails<sup>®</sup> wurden die Scaffolds in die Femur-Segmentdefekte eingesetzt. Direkt nach der Operation und nach 2, 5, 10 und 25 Wochen wurden Röntgenaufnahmen des Oberschenkels angefertigt, um den

Fortschritt der Knochenheilung zu dokumentieren. Nach dem Röntgen in Woche 25 wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Narkose euthanasiert. Danach wurden die Femura für die *in vitro*  $\mu$ CT Analyse und die immunhistochemischen Analysen explantiert.

### 5.11.2. Versuchsgruppen

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 6 Versuchsgruppen, die sich auf 3 Studienabschnitte verteilen, analysiert.

**Studienabschnitt 1:** Besiedlung poröser Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten aus Fettgewebe.

Gruppe 1 (Kontrolle): 7 leere nHA/PU-Scaffolds wurden in die Rückenhautkammer implantiert.

Gruppe 2: 12 nHA/PU-Scaffolds wurden mit mikrovaskulären Gefäßfragmenten besiedelt. 8 dieser Scaffolds wurden in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen implantiert. 4 Scaffolds wurden direkt nach der Besiedlung histologisch und immunhistochemisch analysiert.

**Studienabschnitt 2:** Präkultivierung von besiedelten Scaffolds in angiogenem Medium.

Gruppe 1 (Kontrolle): 12 Scaffolds wurden mit mikrovaskulären Gefäßfragmenten besiedelt. 8 dieser Scaffolds wurden in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen implantiert. 4 Scaffolds wurden direkt nach der Besiedlung histologisch und immunhistochemisch analysiert.

Gruppe 2: 12 Scaffolds wurden über 4 Wochen in EC Medium mit Zusatz von angiogenen Wachstumsfaktoren kultiviert. 8 Scaffolds wurden in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen implantiert. 4 Scaffolds wurden direkt nach der

Kultivierung histologisch und immunhistochemisch untersucht.

**Studienabschnitt 3:** Mikrovaskuläre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten beim Knochen-Tissue Engineering.

Gruppe 1 (Kontrolle): 7 Leere Scaffolds wurden für 25 Wochen in einen Femur-Segmentdefekt, der mit dem LockingMouseNail<sup>®</sup> stabilisiert wurde, implantiert.

Gruppe 2: 22 Scaffolds wurden mit mikrovaskulären Gefäßfragmenten besiedelt. Hiervon wurden 7 Scaffolds für 25 Wochen in einen Femur-Segmentdefekt, der mit dem LockingMouseNail<sup>®</sup> stabilisiert wurde, implantiert. Von 4 Scaffolds wurde direkt nach der Besiedlung und von 11 Scaffolds 2 Wochen nach Implantation in den Segmentdefekt die Proteinexpression der enthaltenen Zellen untersucht.

## 5.12. Statistik

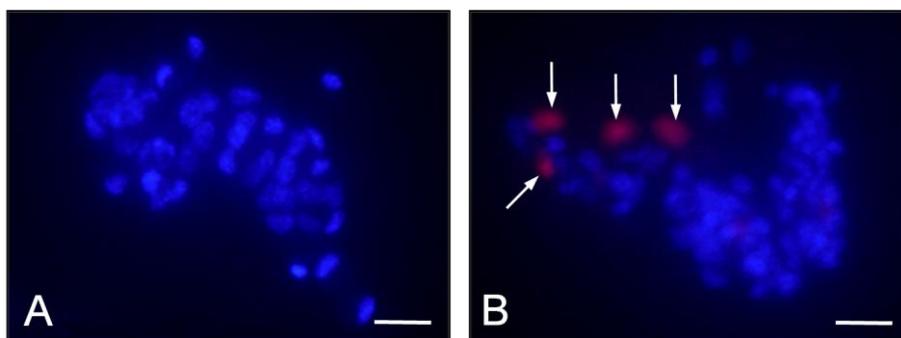
Alle Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) angegeben. Nach der Überprüfung der Daten auf Normalverteilung und gleicher Varianz wurden die Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen mit dem ungepaarten Student's t-Test analysiert. Der Vergleich der verschiedenen Versuchszeitpunkte innerhalb der einzelnen Gruppen erfolgte mittels ANOVA für wiederholte Messungen. Anschließend folgte der Student-Newman-Keuls Test unter Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen. Für die statistischen Tests wurde das Softwarepaket SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) genutzt. Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden bei der Testung als signifikant definiert.

## 6. ERGEBNISSE

### 6.1. Besiedlung poröser Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten aus Fettgewebe

#### 6.1.1. Isolierung und Vitalität der mikrovaskulären Fragmente

Die Isolierung mikrovaskulärer Fragmente aus dem epididymalen Fettgewebe von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J Spendermäusen dauerte ca. 1,5 h. Aus einer Spendermaus konnten ca. 600 mikrovaskuläre Fragmente isoliert werden. Die durchschnittliche Länge dieser Fragmente betrug  $154 \pm 13 \mu\text{m}$ . Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung Bisbenzimid/Propidiumiodid-gefärbter Fragmente direkt nach der Isolierung und nach einer Kultivierungszeit von 24 h zeigte, dass sich die Isolierung nicht wesentlich auf die Vitalität der Fragmente auswirkte. So enthielten sie nur vereinzelt apoptotische und nekrotische Zellen (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Multifluoreszenzmikroskopie mikrovaskulärer Fragmente direkt nach der Isolierungsprozedur (A) und nach 24 Stunden Kultivierung in DMEM (B). Die Fragmente sind mit Bisbenzimid zur Darstellung des Chromatins in den Zellkernen (blau) und Propidiumiodid zur Visualisierung von nekrotischen Zellen (rot) gefärbt. In den Fragmenten können keine apoptotischen Zellen mit erhöhter Chromatinkondensation und Chromatinfragmentierung nachgewiesen werden. Die kultivierten Fragmente weisen auch nur wenige nekrotische Zellen (B, Pfeile) auf (Maßstab:  $18 \mu\text{m}$ ).

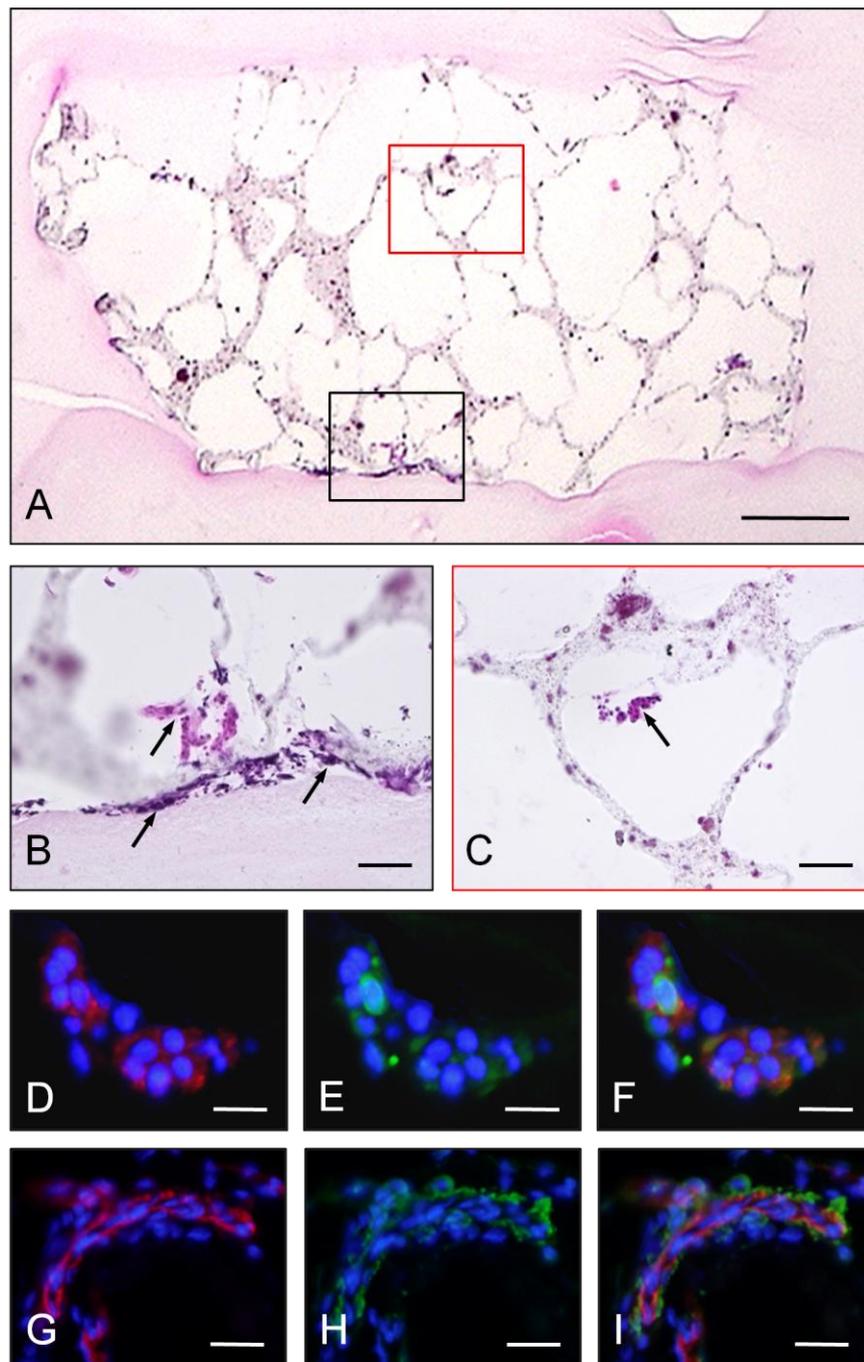
### 6.1.2. Charakterisierung der mikrovaskulären Fragmente

Mittels ELISA wurde überprüft, ob die isolierten mikrovaskulären Fragmente dazu fähig sind, die Angiogenese durch Produktion und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren zu stimulieren. Nach einer Kultivierung mikrovaskulärer Fragmente über 72 h konnten im Kulturmedium  $30 \pm 6$  pg/ml VEGF und  $679 \pm 58$  pg/ml bFGF, aber kein PDGF-BB, nachgewiesen werden.

Des Weiteren zeigte die durchflusszytometrische Analyse isolierter Fragmente, dass diese  $21 \pm 1$  % und  $5 \pm 1$  % Zellen enthielten, welche die mesenchymalen Stammzellmarker CD73 und CD117 exprimierten. Weiterhin enthielten die Fragmente  $5 \pm 1$  % Sca-1/VEGFR-2-positive EPCs.

### 6.1.3. Besiedlung der Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten

Zur Besiedlung der nHA/PU-Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten wurde in einem ersten Schritt zunächst versucht, die Scaffolds durch einfaches Aufpipettieren von PBS, welches die mikrovaskulären Fragmente enthielt, zu beladen. Hierbei blieben jedoch die Fragmente nur an der Oberfläche der Scaffolds hängen und drangen nicht ins Innere ein. Aus diesem Grund wurde ein neues, dynamisches Verfahren entwickelt, bei dem die Fragmente durch den Wechsel von Über- und Unterdruck in die inneren Poren der Scaffolds gelangen konnten (Abb. 12A, C). Dies konnte durch die Fixierung der Scaffolds in einer 1 ml-Spritze, in der durch Auf- und Abbewegen des Spritzenkolbens ein entsprechender Über- bzw. Unterdruck erzeugt wurde, erzielt werden. Dadurch wurde die Suspension mit den Gefäßfragmenten durch das Scaffold gesogen bzw. gepresst. Nach Beladung der Scaffolds betrug die Fragmentdichte  $5,8 \pm 0,4$  mm<sup>-2</sup>. Die Endothelzellen der Fragmente waren doppelt positiv für CD31 und GFP (Abb. 12D-F). Des Weiteren waren die mikrovaskulären Fragmente von einer stabilisierenden Schicht  $\alpha$ -SMA-positiver Muskelzellen umgeben (Abb. 12G-I). Dies zeigt, dass es sich um Fragmente von ausgereiften Blutgefäßen handelte. Histologische Analysen bestätigten weiterhin, dass sich nach der Besiedlung mikrovaskuläre Fragmente sowohl auf der Scaffold-oberfläche (Abb. 12B), als auch in den Poren innerhalb der Scaffolds befanden (Abb. 12C).

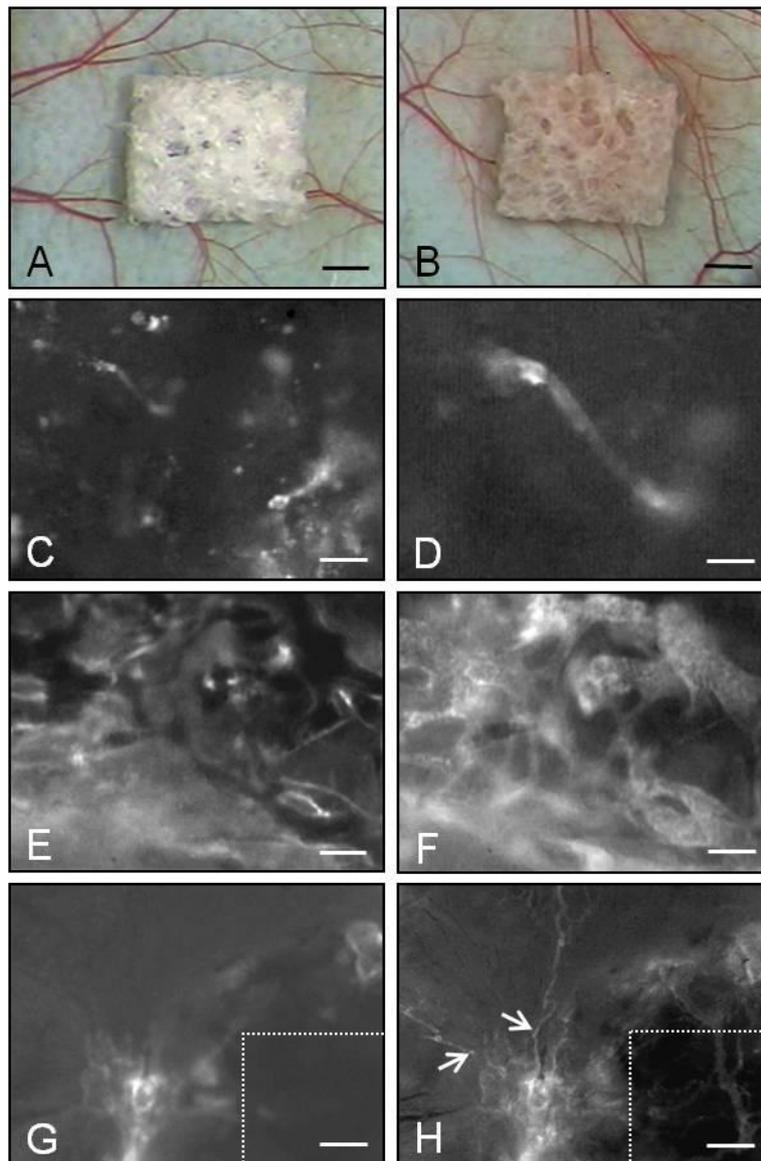


**Abbildung 12:** A-C: HE-gefärbte Schnitte eines nHA/PU-Scaffolds, welches mit mikrovaskulären Fragmenten (B, C, Pfeile) besiedelt wurde. B und C zeigen eine höhere Vergrößerung des Randbereichs (schwarzes Rechteck) und des Zentrums (rotes Rechteck) des Scaffolds in A. D-I: Immunhistochemische Charakterisierung mikrovaskulärer Fragmente innerhalb des Scaffolds. Die histologischen Schnitte wurden zur Identifizierung von Zellkernen mit Bisbenzimid (D-I, blau), einem Antikörper gegen CD31 zur Detektion von Endothelzellen (D, G, rot), einem Antikörper gegen GFP (E, grün) und einem Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA (H, grün) gefärbt. F und I zeigen ein Overlay aus D und E bzw. G und H (Maßstab: A = 370  $\mu$ m; B, C = 55  $\mu$ m; D - I = 16  $\mu$ m).

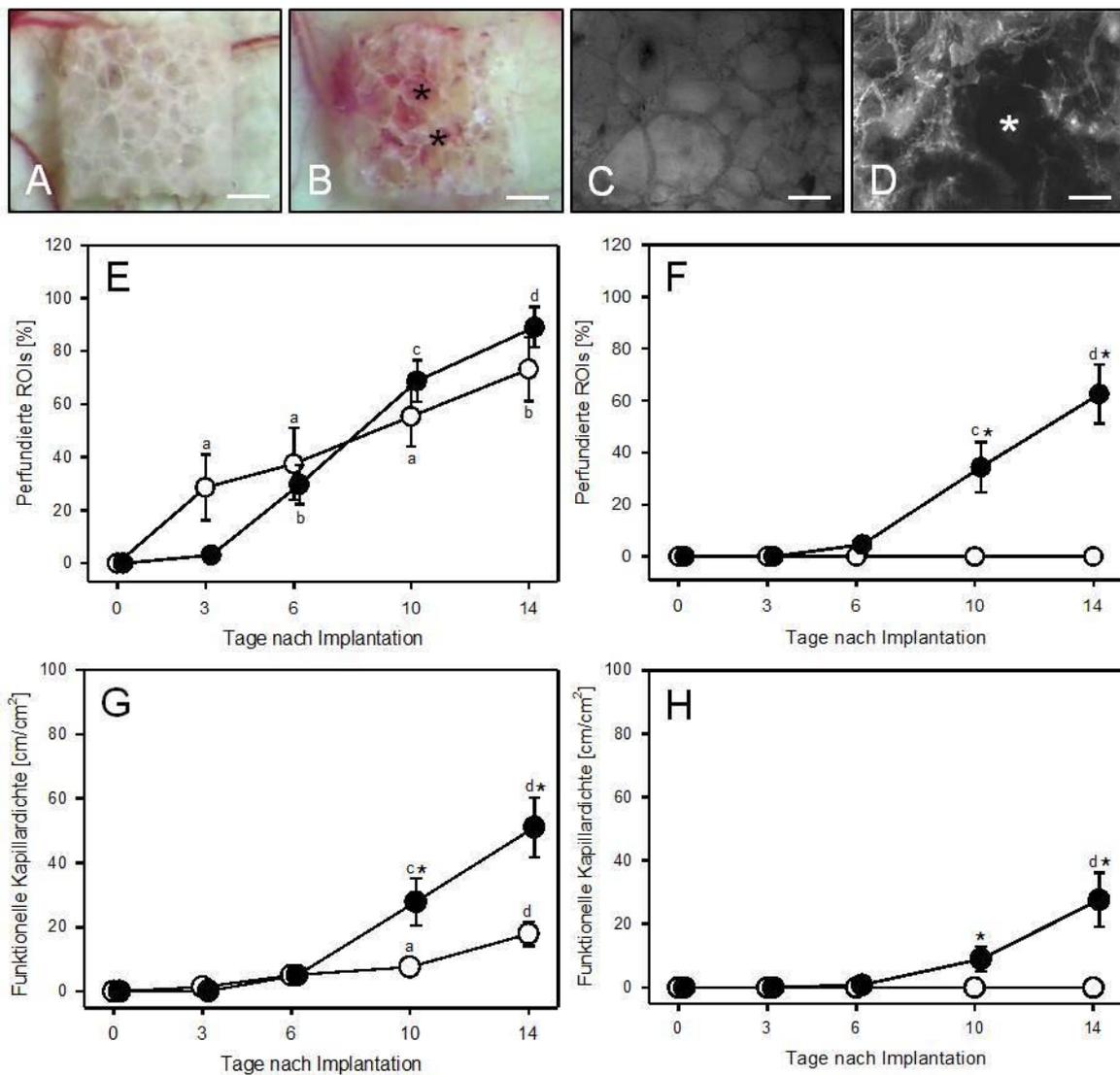
#### 6.1.4. Vaskularisierung implantierter Scaffolds

Die besiedelten Scaffolds erschienen im Gegensatz zu den leeren Kontrollscaffolds direkt nach der Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen rötlich, was durch die mikrovaskulären Fragmente bedingt war (Abb. 13A, B). Aufgrund ihres GFP-positiven Signals konnten die Fragmente auf der Scaffoldoberfläche leicht mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden (Abb. 13C, D). Während der folgenden Tage begannen die Fragmente zu proliferieren und sich zu verbinden, um schließlich ein neues mikrovaskuläres Netzwerk mit einem GFP-positiven Endothel auszubilden (Abb. 13E, F). Die Durchblutung dieses Gefäßnetzwerks konnte durch die Injektion des Plasma-Markers 5 % FITC-markiertes Dextran 150.000 detektiert werden. Vor und nach der Injektion des Plasma-Markers wurden von identischen Bereichen intravitalmikroskopische Aufnahmen gemacht. Ohne die Injektion des Plasma-Markers konnten die GFP-positiven Gefäße visualisiert werden. Nach der Injektion des Plasma-Markers zeigte sich, dass diese nach wenigen Tagen eine Blutperfusion aufwiesen. Dies beweist, dass sie sich innerhalb des 14-tägigen Beobachtungszeitraums durch den Prozess der Inoskulation mit dem Gefäßnetzwerk des Empfängergewebes verbinden konnten (Abb. 13G, H).

Der Vergleich der besiedelten Scaffolds mit den leeren Kontrollscaffolds zeigte, dass beide Implantattypen eine angiogene Reaktion des Empfängergewebes hervorriefen, welche durch die Bildung neuer Mikrogefäße im Randbereich der Implantate ab dem 3. Tag gekennzeichnet war. Im weiteren Verlauf wiesen die Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds eine deutlich bessere Vaskularisierung auf, was durch eine signifikant höhere funktionelle Kapillardichte zwischen Tag 10 und 14 in den Randbereichen im Vergleich zu den Kontrollscaffolds belegt wurde (Abb. 14G). Des Weiteren konnte ab dem 6. Tag eine Zunahme der Zahl durchbluteter Gefäße im Zentrum der besiedelten Scaffolds detektiert werden, während im Zentrum der Kontrollscaffolds keine Durchblutung nachweisbar war (Abb. 14F). Die verbesserte Vaskularisierung der besiedelten Scaffolds ging weiterhin mit Einblutungen innerhalb der Implantate einher (Abb. 14A-D).



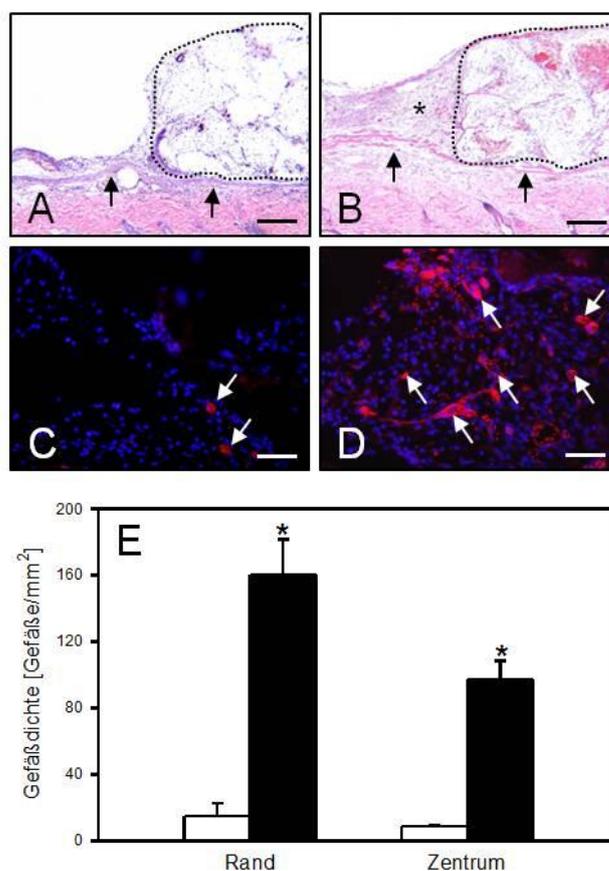
**Abbildung 13:** **A, B:** Stereomikroskopische Aufnahmen eines unbesiedelten Kontrollscaffolds (A) und eines mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelten Scaffolds (B) direkt nach der Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen. Das besiedelte Scaffold erscheint leicht rötlich, was durch die verbliebenen roten Blutzellen in den Scaffoldporen bedingt ist, da die Spendermäuse vor der Gewinnung der mikrovaskulären Fragmente aus dem Fettgewebe nicht mit PBS perfundiert wurden. **C-H:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie eines mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelten Scaffolds direkt nach der Besiedlung (C, D) und an Tag 14 nach Implantation (E - H). Die GFP-positiven mikrovaskulären Fragmente können in Blaulicht-Epi-Illumination leicht auf der vom Empfängergewebe abgewandten Scaffoldoberfläche visualisiert werden (C, höhere Vergrößerung in D). Nach 14 Tagen haben diese Fragmente ein dichtes mikrovaskuläres Netzwerk mit einem GFP-positiven Endothel ausgebildet (E). Die Blutperfusion dieses Netzwerkes wird durch Injektion des Plasmamarkers 5 % FITC-markiertes Dextran 150.000 in Blaulicht-Epi-Illumination nachgewiesen (F stellt die gleiche ROI wie in E dar) und resultiert aus der Verbindung GFP-positiver Mikrogefäße mit GFP-negativen Mikrogefäßen des Empfängergewebes. Diese Verbindungen (H, Pfeile) können durch einen direkten Vergleich von identischen mikroskopischen ROIs vor (G, Visualisierung des GFP-Signals) und nach der Injektion von 5 % FITC-markiertem Dextran 150,000 (H, Detektion aller Blutgefäße) im Randbereich des Scaffolds (markiert durch gepunktete Linie) identifiziert werden (Maßstab: A, B = 650 µm; C = 75 µm; D = 25 µm; E, F = 50 µm; G, H = 200 µm).



**Abbildung 14:** A – D: Stereomikroskopie (A, B) und intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Blaulicht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5 % FITC-markiertes Dextran 150.000 (C, D) der Oberfläche eines Kontrollscaffolds (A, C) und eines mit Gefäßfragmenten besiedelten Scaffolds (B, D) an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Es zeigt sich eine deutlich verbesserte Vaskularisierung des besiedelten Scaffolds im Vergleich zum Kontrollscaffold, was mit Einblutungen (Sterne) innerhalb der Implantate (B, D) einhergeht. (Maßstab: A, B = 700 µm; C, D = 400 µm). E – H: Perfundierte ROIs (in % aller analysierten ROIs, welche eine individuelle Größe von 0,4 mm<sup>2</sup> hatten) (E, F) und funktionelle Kapillardichte (cm/cm<sup>2</sup>) (G, H) im Randbereich (E, G) und im Zentrum (F, H) von Kontrollscaffolds (weiße Punkte, n = 7) und Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds (schwarze Punkte, n = 8) nach Implantation in die Rückenhautkammer. Mittelwert ± SEM. <sup>a</sup>p < 0,05 vs. 0 d innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup>p < 0,05 vs 0 d und 3 d innerhalb einer Gruppe; <sup>c</sup>p < 0,05 vs. 0 d, 3 d und 6 d innerhalb einer Gruppe; <sup>d</sup>p < 0,05 vs. 0 d, 3 d, 6 d und 10 d innerhalb einer Gruppe; \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

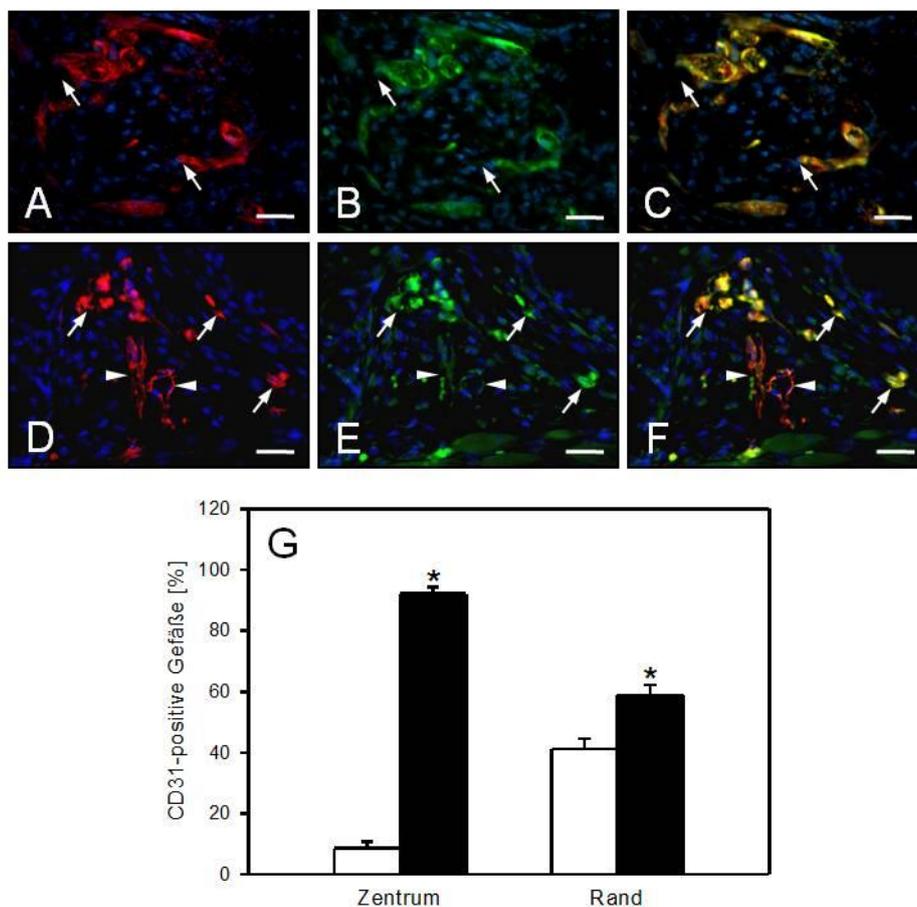
### 6.1.5. Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds

Die histologische Analyse der Scaffolds an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer zeigte, dass die Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds besser in das Empfängergewebe eingewachsen waren, da sich im Vergleich zu den Kontrollscaffolds mehr Granulationsgewebe an den Rändern der Implantate ausgebildet hatte (Abb. 15A, B).



**Abbildung 15:** **A, B:** HE-gefärbte Schnitte eines nicht besiedelten Kontrollscaffolds (A, die Grenzen sind durch gepunktete Linie markiert) und eines mit Gefäßfragmenten besiedelten Scaffolds (B, die Grenzen sind durch gepunktete Linie markiert) an Tag 14 nach Implantation auf den quergestreiften Muskel des Empfängergewebes (A, B, Pfeile) innerhalb der Rückenhautkammer. Die besiedelten Scaffolds sind im Gegensatz zu den Kontrollscaffolds besser inkorporiert, was sich durch ein dichtes Granulationsgewebe (B, Stern) zeigt. **C, D:** Immunhistochemische Detektion CD31-positiver Mikrogefäße (C, D, Pfeile) im Zentrum eines Kontrollscaffolds (C) und eines besiedelten Scaffolds (D) an Tag 14. Die Schnitte sind zur Identifizierung der Zellkerne zusätzlich mit Bisbenzimid gefärbt. (Maßstab: A, B = 230  $\mu\text{m}$ ; C, D = 70  $\mu\text{m}$ ). **E:** Gefäßdichte (Gefäße/ $\text{mm}^2$ ) im Randbereich und Zentrum von Kontrollscaffolds (weißer Balken,  $n = 7$ ) und Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds (schwarzer Balken,  $n = 8$ ) an Tag 14 nach der Implantation in die Rückenhautkammer. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Dies wurde nicht durch eine verstärkte Immunantwort gegen die besiedelten Scaffolds verursacht, denn das Granulationsgewebe in beiden Gruppen wies eine vergleichbare Zahl infiltrierender MPO-positiver neutrophiler Granulozyten (besiedelte Scaffolds:  $12 \pm 1$  % vs. Kontrollscaffolds:  $13 \pm 2$  %;  $p > 0,05$ ) und F4/80-positiver Makrophagen (besiedelte Scaffolds:  $8 \pm 1$  % vs. Kontrollscaffolds  $10 \pm 1$  %;  $p > 0,05$ ) auf. Weiterhin wiesen die besiedelten Scaffolds sowohl im Randbereich als auch im Zentrum eine signifikant höhere Gefäßdichte auf (Abb. 15C-E).



**Abbildung 16:** A-F: Immunhistochemische Charakterisierung der Mikrogefäße im Zentrum (A-C) und im Randbereich (D-F) eines mit Gefäßfragmenten besiedelten Scaffolds an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die histologischen Schnitte wurden mit Bisbenzimid zur Identifizierung der Zellkerne (A-F, blau), einem Antikörper gegen CD 31 zur Detektion der Endothelzellen (A, D, rot) und einem Antikörper gegen GFP (B, E, grün) gefärbt. C und F zeigen ein Overlay von A und B bzw. B und E. Die Mikrogefäße im Zentrum (A-C, Pfeile) sind doppelt positiv für CD31 und GFP. In dem die Scaffolds umgebenden Granulationsgewebe können neben GFP-negativen Blutgefäßen des Empfängergewebes (D-F, Pfeilspitzen) auch aus dem Scaffold ausgewachsene GFP-positive Mikrogefäße (D-F, Pfeile) gefunden werden (Maßstab: A-F =  $36 \mu\text{m}$ ). G: CD31-positive Mikrogefäße (%) im Zentrum und Randbereich der mit Gefäßfragmenten besiedelten Scaffolds an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer, welche GFP-positiv (schwarzer Balken,  $n = 8$ ) oder GFP-negativ (weißer Balken,  $n = 8$ ) waren. Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs. GFP-negative Gefäße.

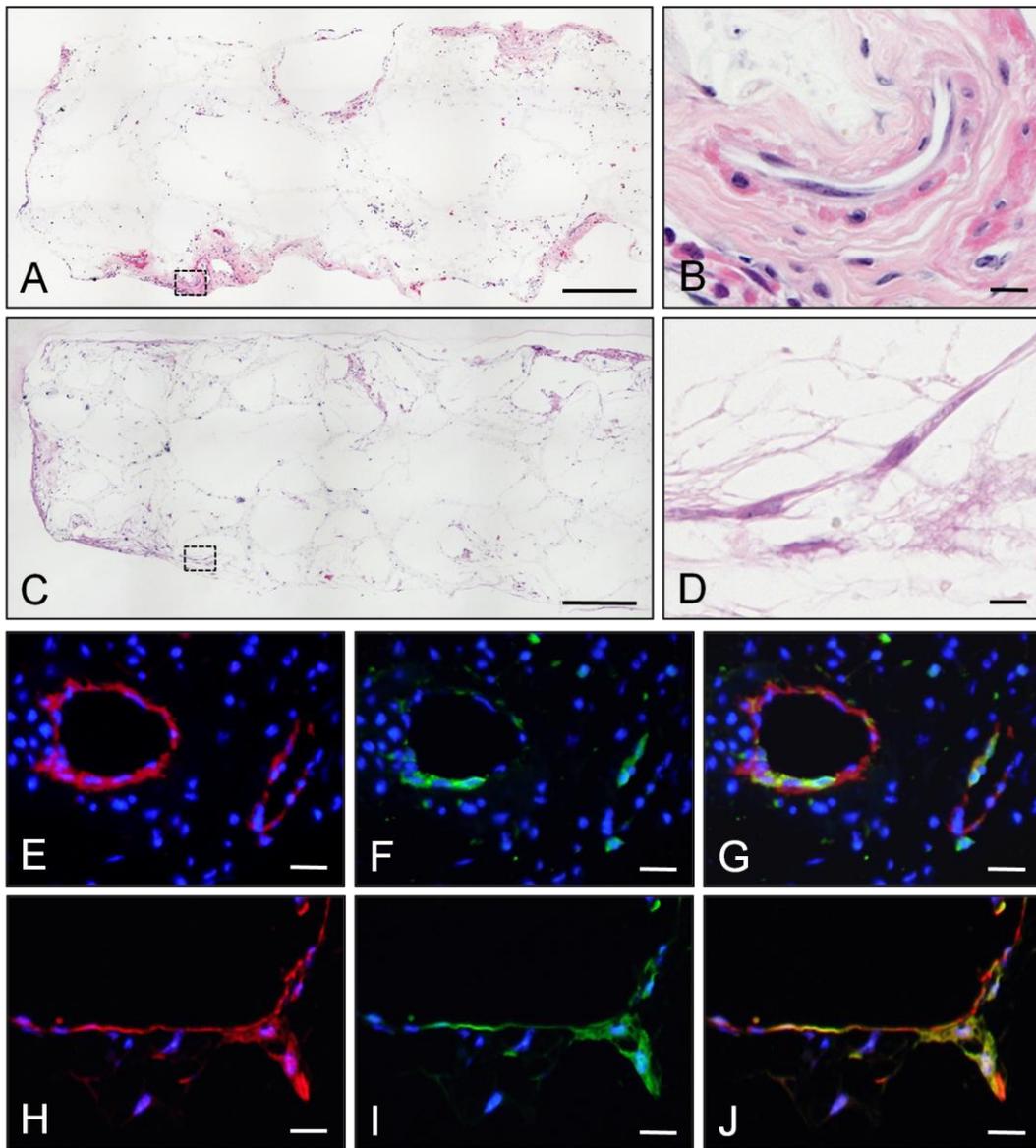
Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen in der Gruppe der besiedelten Scaffolds zeigten, dass 90 % der Gefäße im Zentrum der Implantate GFP-positiv waren (Abb. 16A-G). Dies belegt, dass nahezu das gesamte Gefäßnetzwerk innerhalb der Implantate aus den GFP-positiven Gefäßfragmenten entstanden war und nicht durch das Einwachsen von GFP-negativen Gefäßen aus dem Empfängergewebe. Des Weiteren waren ~60 % der Gefäße im Granulationsgewebe, welches die Scaffolds umgab, ebenfalls GFP-positiv. Dies zeigt, dass während des 14-tägigen Versuchs viele GFP-positive Gefäße in das umliegende Empfängergewebe auswachsen konnten.

## **6.2. Präkultivierung besiedelter Scaffolds in angiogenem Medium**

### **6.2.1. Histomorphologie frisch besiedelter und präkultivierter Scaffolds**

Das Ziel dieses Studienabschnitts war es zu untersuchen, ob aus den mikrovaskulären Fragmenten *in vitro* ein neues Gefäßnetzwerk generiert werden kann, um auf diese Weise die Vaskularisierung nach Implantation zu beschleunigen. Hierzu wurden die besiedelten Scaffolds zunächst für 4 Wochen in angiogenem Medium kultiviert.

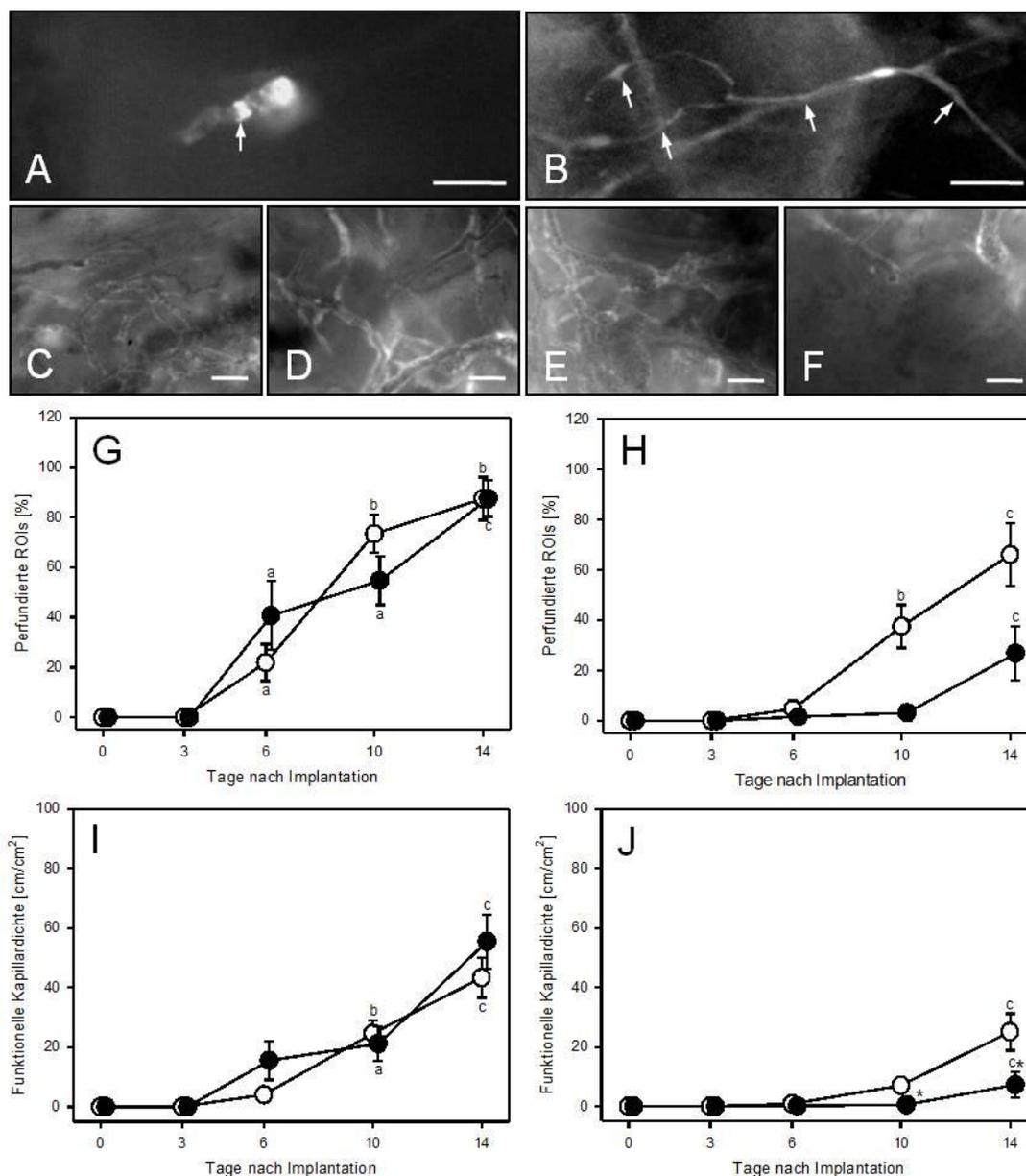
Die histologische Analyse frisch besiedelter Scaffolds zeigte, dass die mikrovaskulären Fragmente zufällig über die Oberfläche und die Poren innerhalb der Scaffolds verteilt waren (Abb. 17A, C). Diese Gefäßfragmente waren teilweise von Bindegewebsresten umgeben und zeigten eine typische Gefäßmorphologie mit einem Gefäßlumen, welches von einer Endothelzellschicht und perivaskulären Zellen umgeben war (Abb. 17B). Weitere immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die mikrovaskulären Fragmente doppelt-positiv für den Endothelzellmarker CD31 und für GFP waren (Abb. 17E-G). Im Gegensatz zu den frisch besiedelten Scaffolds wiesen die präkultivierten Scaffolds eine veränderte Morphologie auf. Sie enthielten ein Netzwerk aus dünnen, langgezogenen Zellen, welche entlang der Scaffoldstränge wuchsen (Abb. 17C, D). Des Weiteren zeigte die immunhistochemische Detektion von CD31 und GFP, dass viele dieser Zellen aus dem Endothel der mikrovaskulären Fragmente stammten (Abb. 17H-J).



**Abbildung 17:** A-D: HE-gefärbte Schnitte eines frisch besiedelten Kontrollscaffolds (A; B = Ausschnitt aus A) und eines präkultivierten Scaffolds (C; D = Ausschnitt aus C). Die höhere Vergrößerung zeigt, dass die mikrovaskulären Fragmente im Kontrollscaffold eine typische Gefäßstruktur aufweisen (B), während die präkultivierten Scaffolds ein Netzwerk aus dünnen langgezogenen Zellen enthalten, welche entlang der Scaffoldstränge wachsen (D). E-J: Immunhistochemische Charakterisierung der mikrovaskulären Fragmente in einem Kontrollscaffold (E-G) und der langgezogenen Zellen in einem präkultivierten Scaffold (H-J). Die histologischen Schnitte wurden mit Bisbenzimid zur Identifizierung der Zellkerne (E-J, blau), einem Antikörper gegen CD31 zur Detektion der Endothelzellen (E, H, rot) und einem Antikörper gegen GFP (F, I, grün) gefärbt. G und H zeigen ein Overlay aus E und F bzw. H und I (Maßstab: A, C = 320  $\mu\text{m}$ ; B, D = 12  $\mu\text{m}$ ; E-J = 30  $\mu\text{m}$ ).

### 6.2.2. Vaskularisierung der implantierten Scaffolds

Direkt nach der Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen konnten die einzelnen mikrovaskulären Fragmente auf der Oberfläche der



**Abbildung 18:** **A, B:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie eines frisch besiedelten Kontrollcaffolds (A) und eines präkultivierten Scaffolds (B) direkt nach der Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen. Auf der Oberfläche des Kontrollcaffolds kann ein GFP-positives mikrovaskuläres Fragment (A, Pfeil) in Blaulicht-Epi-Illumination visualisiert werden. Im Gegensatz dazu ist die Oberfläche des präkultivierten Scaffolds mit einem Netzwerk langgestreckter GFP-positiver Zellen mit filigranen Zellauswüchsen (B, Pfeile) überwachsen. **C-F:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Blaulicht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5 % FITC-markiertes Dextran 150.000 der Randbereiche (C, D) und des Zentrums (E, F) eines frisch besiedelten Kontrollcaffolds (C, E) und eines präkultivierten Scaffolds (D, F) an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die Vaskularisierung im Zentrum der Kontrollcaffolds (E) ist im Vergleich zu der Vaskularisierung des prävaskularisierten Scaffolds deutlich verbessert (Maßstab: A, B = 40 µm; C - F = 55 µm). **G-J:** Perfundierte ROIs (in % aller analysierten ROIs, welche eine individuelle Größe von 0,4 mm<sup>2</sup> hatten) (G, H) und funktionelle Kapillardichte (cm/cm<sup>2</sup>) (I, J) im Randbereich (G, I) und im Zentrum (H, J) besiedelter Kontrollcaffolds (weiße Punkte, n = 8) und präkultivierter Scaffolds (schwarze Punkte, n = 8) nach Implantation in die Rückenhautkammer. Mittelwert ± SEM. <sup>a</sup>p < 0,05 vs. 0 d und 3 d innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup>p < 0,05 vs 0 d, 3 d und 6 d innerhalb einer Gruppe; <sup>c</sup>p < 0,05 vs. 0 d, 3 d, 6 d und 10 d innerhalb einer Gruppe; \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

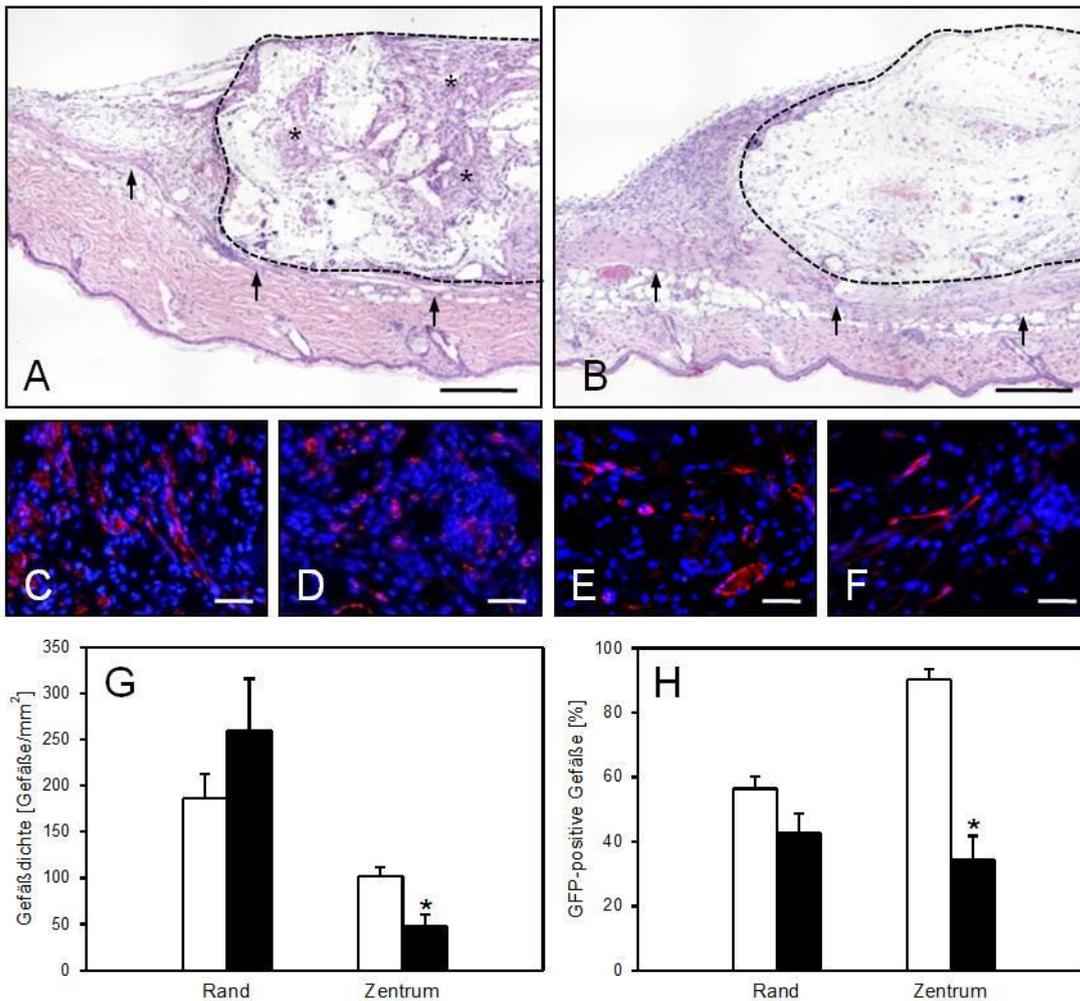
frisch besiedelten Scaffolds mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Abb. 18A). Die Oberfläche der präkultivierten Scaffolds war mit einem Netzwerk aus fadenförmigen GFP-positiven Zellen überwachsen (Abb. 18B). Trotz der unterschiedlichen Morphologie lösten beide Scaffoldtypen eine vergleichbare angiogene Reaktion des Empfängergewebes in ihren Randbereichen aus (Abb. 18C, D, G, I). Diese war gekennzeichnet durch die Bildung von Gefäßsprossen, welche aus dem mikrovaskulären Netzwerk des umliegenden Empfängergewebes in die Scaffolds einwuchsen. Durch die Verbindung dieser einwachsenden Gefäße miteinander entwickelte sich schließlich ein neues Gefäßnetzwerk innerhalb der Scaffolds.

Im Gegensatz zum Randbereich unterschied sich die Vaskularisierung im Zentrum der frisch besiedelten und der präkultivierten Scaffolds deutlich von einander (Abb. 18E, F). Die frisch isolierten Gefäßfragmente waren in der Lage, zu proliferieren und Verbindungen sowohl untereinander als auch mit den Gefäßen des Empfängergewebes einzugehen (Abb. 18D). Dies konnte bei den präkultivierten Implantaten jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 18F). Folglich wiesen die frisch besiedelten Scaffolds in ihrem Zentrum eine signifikant höhere Anzahl perfundierter Felder und eine höhere funktionelle Kapillardichte an Tag 10 und 14 im Vergleich zu den präkultivierten Scaffolds auf (Abb. 18H, J).

### **6.2.3. Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds**

Am Ende der *in vivo* Experimente an Tag 14 nach Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammer erfolgte die histologische und immunhistochemische Analyse der Implantate. Dabei zeigte sich, dass die meisten Poren der frisch besiedelten Scaffolds mit einem dichten, neugebildeten Granulationsgewebe gefüllt waren, wohingegen die Poren der präkultivierten Scaffolds nur einzelne Zellen enthielten (Abb. 19A, B). Entsprechend war die Inkorporation der frisch besiedelten Scaffolds im Vergleich zu den präkultivierten Scaffolds deutlich verbessert. Des Weiteren wurde eine höhere Dichte CD31-positiver Mikrogefäße im Zentrum frisch besiedelter Scaffolds detektiert. Außerdem konnten sowohl im Zentrum, als auch im Randbereich beider Implantattypen GFP-positive Gefäße nachgewiesen werden,

wobei der Anteil der GFP-positiven Gefäße im Zentrum der präkultivierten Scaffolds (~ 40 %) im Vergleich zu den frisch besiedelten Scaffolds (~ 90 %) signifikant reduziert war (Abb. 19C-H).



**Abbildung 19:** **A, B:** HE-gefärbte Schnitte eines frisch besiedelten Kontrollscaffolds (A, die Grenzen sind durch gepunktete Linie markiert) und eines präkultivierten Scaffolds (B, die Grenzen sind durch gepunktete Linie markiert) an Tag 14 nach Implantation auf den quergestreiften Muskel des Empfängergewebes (A, B, Pfeile) innerhalb der Rückenhautkammer. Die Poren des frisch besiedelten Kontrollscaffolds sind mit einem dichten, neu gebildeten Granulationsgewebe gefüllt (A, siehe Sterne), wobei die Poren im präkultivierten Scaffold nur einzelne Zellen enthalten. **C-F:** Immunhistochemische Detektion CD31-positiver Mikrogefäße (rot) im Randbereich (C, D) und im Zentrum (E, F) eines frisch besiedelten Kontrollscaffolds (C, E) und eines präkultivierten Scaffolds (D, F) an Tag 14. Die Schnitte sind zur Identifizierung der Zellkerne zusätzlich mit Bisbenzimid gefärbt (Maßstab: A, B = 320 µm; C – F = 40 µm). **G-H:** Gefäßdichte (Gefäße/mm<sup>2</sup>) (G) und GFP-positiv Gefäße (%) im Randbereich und Zentrum frisch besiedelter Kontrollscaffolds (weißer Balken, n = 8) und präkultivierter Scaffolds (schwarzer Balken, n = 8) an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Mittelwert ± SEM.  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

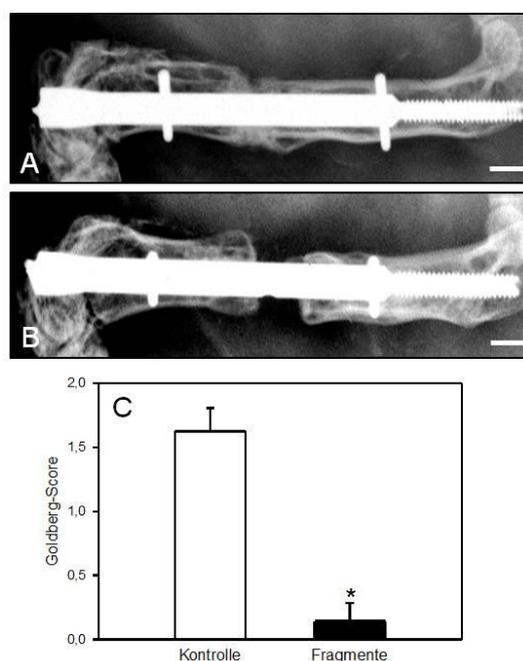
### 6.3. Mikrovaskuläre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten beim Knochen-Tissue Engineering

Im dritten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte getestet werden, ob die mikrovaskulären Fragmente auch zur Vaskularisierung von Gewebekonstrukten beim Knochen-Tissue Engineering geeignet sind. Hierzu wurden nHA/PU-Scaffolds mit Gefäßfragmenten besiedelt und für 25 Wochen in Femur-Segmentdefekte, welche mittels LockingMouseNails<sup>®</sup> stabilisiert wurden, implantiert.

#### 6.3.1. Radiologische Analysen

##### 6.3.1.1. Röntgen

Die radiologischen Untersuchungen und Auswertungen mittels Goldbergscore zeigten, dass der Defekt nach 25 Wochen in der Gruppe der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds nicht knöchern durchbaut war.

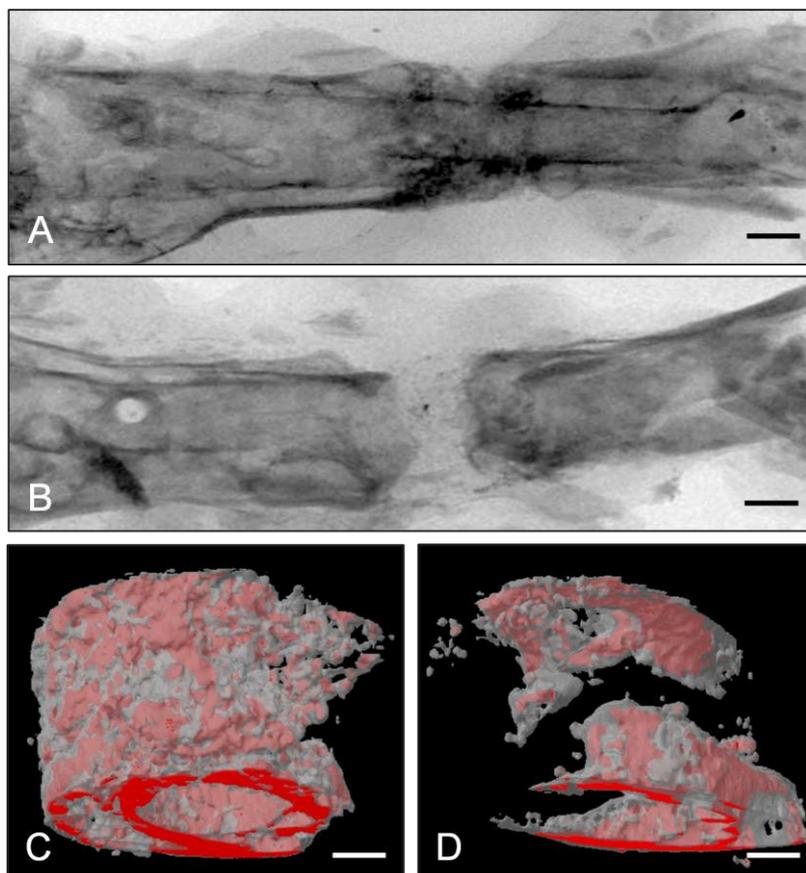


**Abbildung 20:** **A, B:** Röntgenaufnahmen eines mittels LockingMouseNail<sup>®</sup> stabilisierten Segmentdefekts eines Mäusefemurs in der 25. postoperativen Woche mit einem leeren (A) und einem Gefäßfragment-besiedelten Scaffold (B) (Maßstab: 1 mm). **C:** Auswertung der Röntgenaufnahmen 25 Wochen postoperativ mittels Goldberg-Score der Gruppe mit Kontrollscaffolds (weißer Balken; n = 7) und der Gruppe mit besiedelten Scaffolds (schwarzer Balken; n = 7). Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

Die Kontrollgruppe zeigte im Vergleich dazu im überwiegenden Teil der Versuchstiere einen knöchern überbauten Segmentdefekt (Abb. 20).

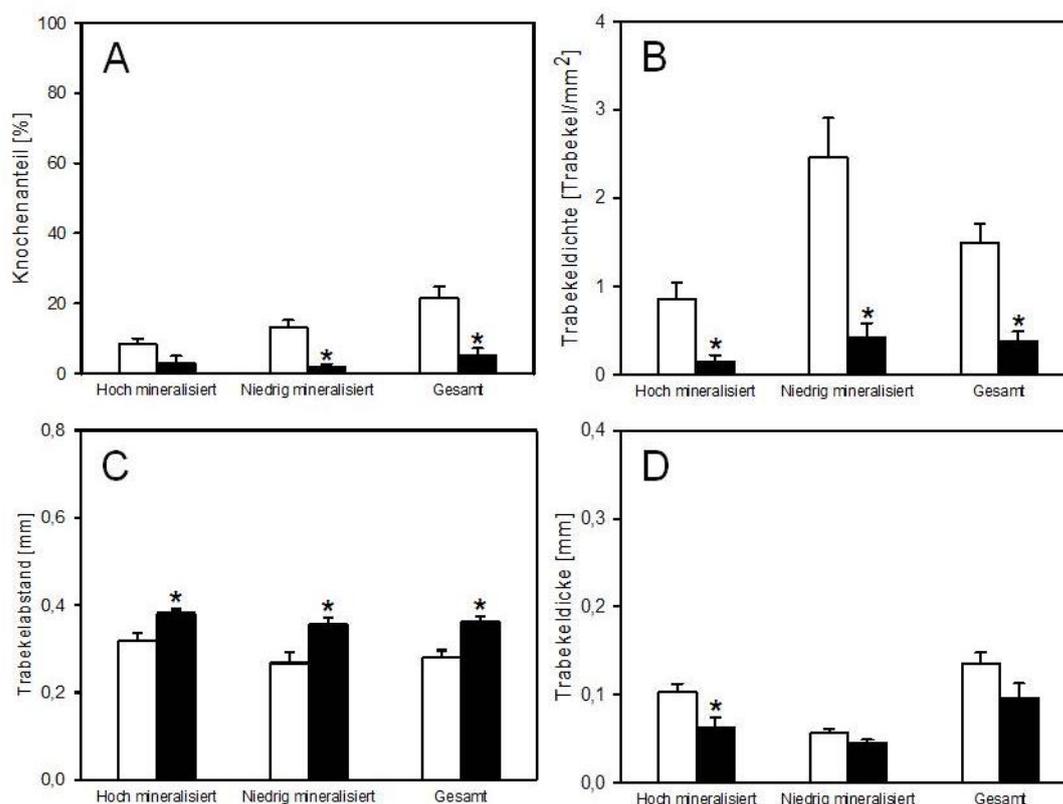
### 6.3.1.2. $\mu$ CT

Die mikrocomputertomographische Analyse der explantierten Femora, in welche die Scaffolds implantiert wurden, bestätigte die Ergebnisse der Röntgenanalyse bezüglich der knöchernen Durchbauung des Segmentdefekts (Abb. 21).



**Abbildung 21:** **A, B:** Mikrocomputertomographische Aufnahme eines Femurs mit leerem Kontroll Scaffold (A) und besiedeltem Scaffold (B) nach Explantation und Entfernung des LockingMouseNail® in der 25. postoperativen Woche. **C-D:** Dreidimensionale Darstellung des Segmentspalts mit leerem Kontroll Scaffold (C) und besiedeltem Scaffold (D) sowie mit Differenzierung von hoch mineralisiertem (C, D, rot) und niedrig mineralisiertem Knochen (C, D, grau). (Maßstab: A, B = 1 mm; C, D = 400  $\mu$ m).

Bei der mikrocomputertomographischen Auswertung wurden jeweils für die Dichtewerte des hoch und niedrig mineralisierten Knochens der Knochenanteil, die Trabekelzahl und Trabekeldicke sowie der trabekuläre Abstand gemessen. Als biomechanischer Parameter wurde der PMOI erfasst.

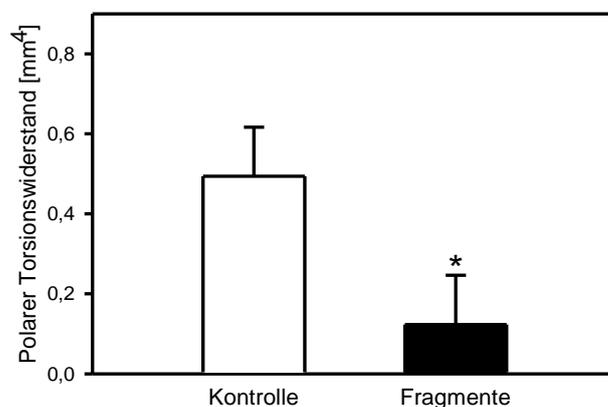


**Abbildung 22:** A-D: Knochenanteil (%) (A), Trabekeldichte (Trabekel/mm<sup>2</sup>) (B), trabekulärer Abstand (mm) (C) und Trabekeldicke (mm) (D) im Bereich der ROI innerhalb des Segmentspalts mit leeren Kontrollcaffolds (A-D: weißer Balken; n = 7) und mit Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds (A-D: schwarzer Balken; n = 7) 25 Wochen postoperativ. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

Im Bereich der ROI wies die Kontrollgruppe einen Knochenanteil von  $8,4 \pm 1,6$  % für hoch mineralisierten und  $13,7 \pm 2,1$  % für niedrig mineralisierten Knochen auf. Im Gegensatz dazu zeigte die Gruppe der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds einen Knochenanteil von  $3,0 \pm 1,9$  % für hoch mineralisierten und  $1,9 \pm 0,7$  % für niedrig mineralisierten Knochen. Daraus resultierte ein signifikant höherer Knochenanteil des niedrig mineralisierten Knochens und des Knochenanteils über die gesamte Knochendichte der Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds (Abb. 22A). Weiterhin waren in der Gruppe der Gefäßfragment-

besiedelten Scaffolds die Trabekeldichte signifikant erniedrigt und der Trabekelabstand signifikant erhöht (Abb. 22B, C). Die Trabekeldicke lag bei der Kontrollgruppe bei  $0,103 \text{ mm} \pm 0,009 \text{ mm}$  für hoch mineralisierten und  $0,056 \pm 0,005 \text{ mm}$  für niedrig mineralisierten Knochen, während in der Gruppe der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds eine Trabekeldicke von  $0,062 \pm 0,012 \text{ mm}$  für hoch mineralisierten und  $0,045 \pm 0,004 \text{ mm}$  für niedrig mineralisierten Knochen gemessen wurde. Daraus resultiert, dass die Trabekel in der Gruppe der besiedelten Scaffolds nur im Dichtebereich des hoch mineralisierten Knochens signifikant dünner als die der Kontrollgruppe waren (Abb. 22D).

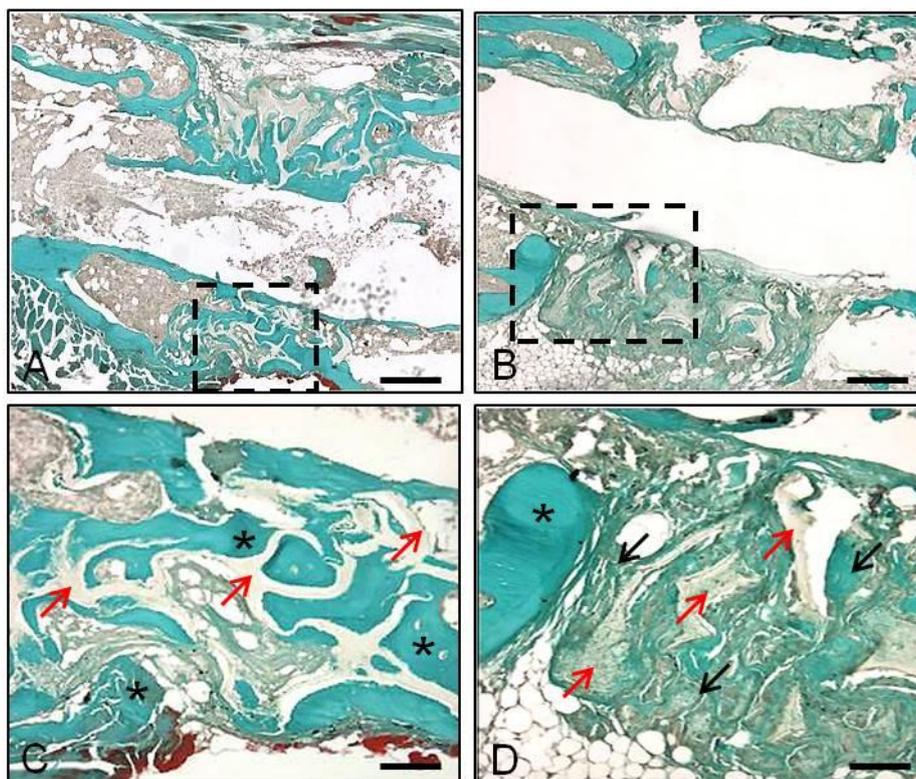
Die Berechnung der biomechanischen Eigenschaften des Gewebes innerhalb des Segmentspalts erfolgte durch die ermittelten Grauwerte aus dem  $\mu\text{CT}$ -Datensatz. Daraus ließ sich der PMOI als Parameter für die Rotationssteifigkeit des Segmentdefekts ermitteln. Gemäß der makroskopischen Befunde zeigte die Kontrollgruppe einen PMOI von  $0,49 \pm 0,12 \text{ mm}^4$ , während die Gruppe der besiedelten Scaffolds lediglich einen PMOI von  $0,15 \pm 0,12 \text{ mm}^4$  aufwies ( $p < 0,05$ ) (Abb. 23).



**Abbildung 23:** PMOI ( $\text{mm}^4$ ) im Bereich der ROI innerhalb des Segmentspalts mit leeren Kontrollscaffolds (weißer Balken;  $n = 7$ ) und mit Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds (schwarzer Balken;  $n = 7$ ) 25 Wochen postoperativ. Mittelwert  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

### 6.3.2. Histomorphometrie

Die histologische Untersuchung der nach 25 Wochen explantierten Femora zeigte, dass in beiden Versuchsgruppen die Scaffolds mit Gewebe durchwachsen und auch nur teilweise resorbiert waren. In der Kontrollgruppe waren die Scaffolds mit Knochengewebe durchwachsen und der Segmentdefekt knöchern überbrückt (Abb. 24A, C). Im Gegensatz dazu war in der Gruppe der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds der Segmentdefekt ausschließlich mit Bindegewebe durchwachsen (Abb. 24B). In dieser Gruppe war auch kein Knochengewebe von den Defektenden aus in das Scaffold eingewachsen (Abb. 24D).

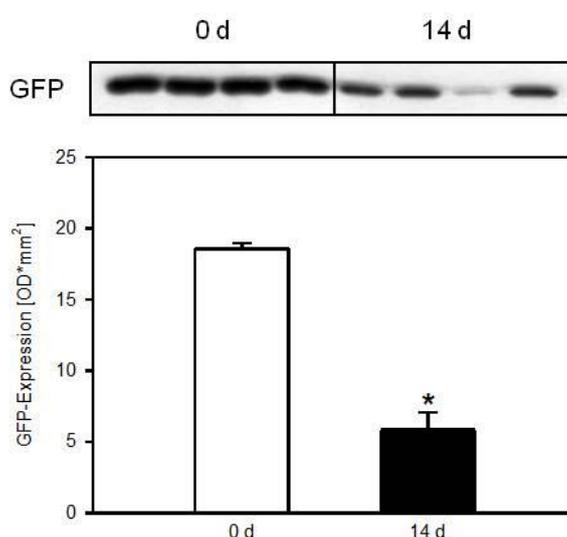


**Abbildung 24:** A-D: Histologische Schnittpräparate des Segmentdefekts im Bereich des maximalen Femurdurchmessers in der Masson-Goldner-Färbung (C, D = Ausschnitte aus A und B) in der 25. postoperativen Woche von einem leeren Scaffold (A,C) und einem Gefäßfragment-besiedelten Scaffold (B,D). C-D: Das leere Scaffold (C; rote Pfeile) ist mit Knochengewebe (C; Sterne) und das besiedelte Scaffold (D; rote Pfeile) mit Bindegewebe (D; schwarze Pfeile) durchwachsen. Bei dem Gefäßfragment-besiedelten Scaffold ist kein eingewachsener Knochen von den Knochenenden (D; Stern) aus zu erkennen. (Maßstab: A, B = 360 µm; C, D = 130 µm).

### 6.3.3. Western-Blot

#### 6.3.3.1. GFP-Expression

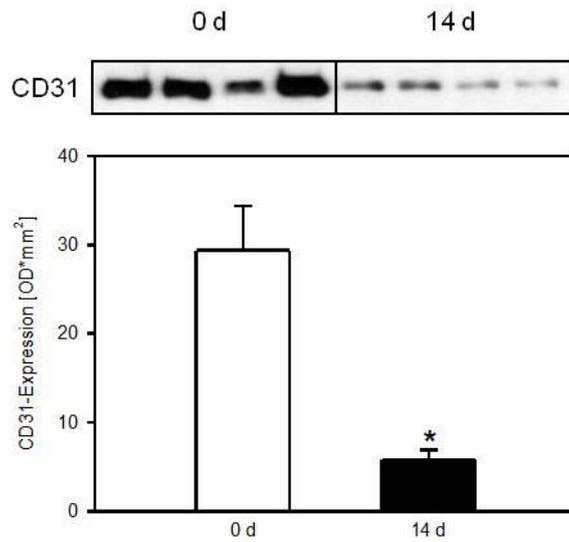
Die GFP-Expression innerhalb Gefäßfragment-besiedelter Scaffolds wurde direkt nach der Besiedlung und nach einer 14-tägigen Implantation in den Segmentspalt analysiert. Dabei zeigte sich, dass die GFP-Expression innerhalb der 14-tägigen Implantationsphase deutlich abnahm (Abb. 25).



**Abbildung 25:** GFP-Expression [OD\*mm<sup>2</sup>] der besiedelten Scaffolds unmittelbar nach der Besiedlung (weißer Balken; n = 4) und 2 Wochen nach Implantation in den Segmentdefekt (schwarzer Balken; n = 4). Mittelwert ± SEM.  $p < 0,05$  vs. 0 d.

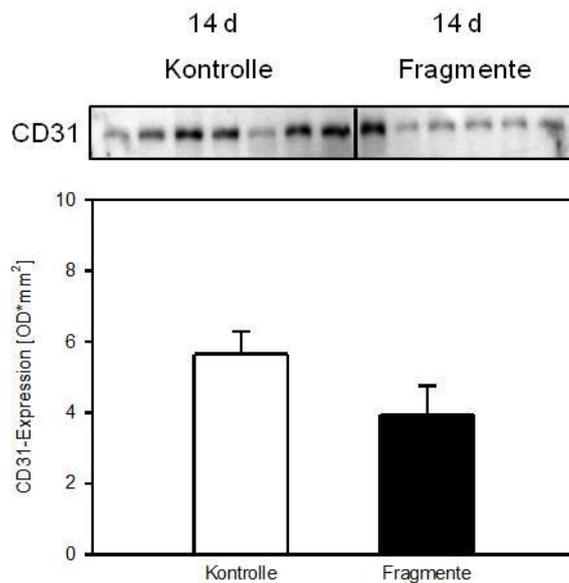
#### 6.3.3.2. CD31-Expression

Die Expression des Endothelzellmarkers CD31 innerhalb der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds wurde ebenfalls unmittelbar nach der Besiedlung der Scaffolds und nach einer 14-tägigen Implantationsdauer gemessen. Des Weiteren wurde auch die CD31-Expression innerhalb der Scaffolds in der Kontrollgruppe nach 14-tägiger Implantationsdauer analysiert. In der Gruppe der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds zeigte die CD31-Expression eine signifikante Abnahme an Tag 14 im Vergleich zu Tag 0 (Abb. 26).



**Abbildung 26:** Expression des Endothelzellmarkers CD31 [OD\*mm<sup>2</sup>] innerhalb der mit Gefäßfragmenten besiedelten Scaffolds unmittelbar nach der Besiedlung (weißer Balken; n = 4) und 2 Wochen nach Implantation in den Segmentdefekt (schwarzer Balken; n = 4). Mittelwert ± SEM. \* p < 0,05 vs. 0 d.

Nach der 14-tägigen Implantationsdauer in den Segmentdefekt war weiterhin die Expression von CD31 in der Kontrollgruppe mit leeren Scaffolds vergleichbar hoch wie in der Gruppe der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds (Abb. 27).



**Abbildung 27:** Expression des Endothelzellmarkers CD31 [OD\*mm<sup>2</sup>] innerhalb der leeren Kontrollcaffolds (weißer Balken; n = 7) und der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds (schwarzer Balken; n = 6) 2 Wochen nach Implantation in den Segmentdefekt. Mittelwert ± SEM. \* p < 0,05 vs. Kontrolle.

## 6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften von mikrovaskulären Gefäßfragmenten aus dem Fettgewebe als Vaskularisierungseinheiten für das Tissue Engineering untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Im **ersten Studienabschnitt** konnte gezeigt werden, dass die mikrovaskulären Gefäßfragmente Stammzellen enthalten und die angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF ausschütten. Mittels einer dynamischen Besiedlungsprozedur können poröse Scaffolds gleichmäßig mit den Gefäßfragmenten besiedelt werden. Nach Implantation in die Rücken- hautkammer von Empfängertieren führte dies zu einer verbesserten Vaskularisierung, da die mikrovaskulären Fragmente innerhalb der Scaffolds proliferieren und in das umliegende Empfängergewebe auswachsen.
2. Im **zweiten Studienabschnitt** konnte gezeigt werden, dass eine Präkultivierung Gefäßfragment-besiedelter Scaffolds für 4 Wochen in angiogenem Medium dazu führt, dass die ursprüngliche Morphologie der mikrovaskulären Fragmente verloren geht. Entsprechend führt die Präkultivierung nach Implantation in die Rücken- hautkammer zu einer verschlechterten Vaskularisierung der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds im Vergleich zu frisch besiedelten Scaffolds.
3. Im **dritten Studienabschnitt** konnte gezeigt werden, dass eine Implantation Gefäßfragment-besiedelter Scaffolds über 25 Wochen in einen Femur- Segmentdefekt, welcher mittels eines LockingMouseNail<sup>®</sup> stabilisiert wurde, zu keiner Knochendurchbauung führt. Stattdessen bildet sich im Scaffold ein dichtes Bindegewebe aus. Des Weiteren nimmt die Expression von CD31 und GFP innerhalb der Scaffolds in den ersten beiden Wochen nach Implantation deutlich ab. Dies zeigt, dass viele Gefäßfragmente bereits in dieser frühen Phase innerhalb der Implantate regredieren.

## **7. Diskussion**

### **7.1. Diskussion von Material und Methoden**

#### **7.1.1. Diskussion der Modelle**

##### **7.1.1.1. Rückenhautkammer**

Das Modell der Rückenhautkammer ist ein vielseitiges Modell zur Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Dieses Modell ermöglicht mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die Untersuchung der gesamten Mikrozirkulation bestehend aus terminalen Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen, sowie die quantitative Erfassung hämodynamischer Parameter über einen Zeitverlauf von 2 - 3 Wochen (Lehr et al., 1993). Durch ein kurzzeitiges Entfernen des Deckglases ist es leicht möglich, verschiedene Implantate in die Kammer zu platzieren, weshalb sich das Modell besonders zur Untersuchung der entzündlichen und angiogenen Gewebereaktion auf Biomaterialien oder transplantierte Gewebekonstrukte eignet. Nach der Präparation der Rückenhautkammer schließt sich für das Tier zunächst eine Erholungsphase von 48 h an, bevor ein Implantat in die Kammer platziert wird. Dadurch kann der Einfluss des mikrochirurgischen Traumas durch die Kammerpräparation in den nachfolgenden Analysen auf ein Minimum reduziert werden.

Da das Modell in der Vergangenheit schon oft zur Analyse der Vaskularisierung von Implantaten genutzt wurde, können die gewonnenen Daten direkt mit Ergebnissen aus früheren Studien verglichen werden (Menger et al., 1990; Laschke et al., 2005). Allerdings können in die Rückenhautkammer aufgrund der limitierten Größe des Beobachtungsfensters nur Implantate mit einer Größe von 3 x 3 x 1 mm implantiert werden.

Das Rückenhautkammermodell kann in Mäusen, Ratten und Hamstern angewendet werden. Dabei bietet die Maus den Vorteil, dass neben der Verfügbarkeit von zahlreichen Knockout-Linien und transgenen Tieren auch viele verschiedene Antikörper für immunhistochemische Analysen zur Verfügung stehen (Menger et al., 1993). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um mittels Immunhistochemie

und unter Verwendung von GFP-positiven transgenen Mäusen zwischen den Blutgefäßen der Spendertiere und der Empfängertiere zu differenzieren.

#### **7.1.1.2. LockingMouseNail®**

Der LockingMouseNail® ermöglicht die stabile Osteosynthese von Segment-defekten verschiedener Größe. Durch die Variation der Defektgröße, welche beim LockingMouseNail® zwischen 0 und 2,0 mm liegt, können unterschiedliche Heilungsverläufe simuliert werden, sodass sowohl eine normale Frakturheilung als auch eine Pseudarthrosenbildung induziert werden kann (Garcia et al., 2011). Des Weiteren bietet der LockingMouseNail® durch seinen offenen Zugang neben einer möglichen topischen Applikation verschiedener Substanzen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, auch die Möglichkeit der stabilen Integration von Knochenersatzstoffen in den Segmentdefekt. Somit kann in diesem Modell einerseits die Wirkung bestimmter Wachstumsfaktoren auf die Frakturheilung untersucht werden (Yoshimura et al., 2001; Peng et al., 2005; Kugimiya et al., 2005). Andererseits ist es auch möglich, neue Knochenersatzstoffe im Rahmen des Tissue Engineering zu analysieren (Garcia et al., 2011).

Weiterhin weist der LockingMouseNail® im Vergleich zu den derzeit etablierten Marknageltechniken für Mäuse eine höhere Stabilität auf und stellt ein intramedulläres Osteosyntheseverfahren dar, welches durchaus mit dem Verriegelungsmarknagel beim Menschen vergleichbar ist. Entsprechend werden mit dem LockingMouseNail® klinische Frakturheilungsverfahren besser nachgeahmt (Garcia et al., 2011).

## **7.1.2. Diskussion der Methoden**

### **7.1.2.1. Scaffolds**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten nHA/PU-Scaffolds wurden mit der Salz-Auswasch-Umkehrmethode hergestellt (Gorna et al., 2006; Boissard et al., 2009). Diese Methode bietet den Vorteil, dass durch die Menge und Größe der verwendeten Salzkristalle die Porosität und Porengröße der Scaffolds genau definiert werden kann. Dies ist von großer Bedeutung für die Vaskularisierung der Scaffolds nach Implantation, da das Einwachsen von Blutgefäßen in die Implantate wesentlich von ihrer Porengröße abhängig ist (Druecke et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden Scaffolds mit einer Porengröße von ~220 µm und einer Porosität von 90 % verwendet. Diese Kenndaten haben in früheren Studien bereits zu guten Vaskularisierungsergebnissen geführt (Druecke et al., 2004; Laschke et al. 2009; Laschke et al., 2010b). Zudem wurde durch das Einbringen von Hydroxylapatit-Nanopartikeln in die Scaffolds die Osteoinduktivität erhöht, was im Falle des Knochen-Tissue Engineering die Bildung von neuem Knochen innerhalb der Scaffolds verbessern könnte (Laschke et al., 2010b). Wegen ihrer Elastizität und gleichmäßigen Architektur sind die verwendeten nHA/PU Scaffolds auch sehr gut für die klinische Praxis geeignet, da sie ohne Qualitätsverlust schnell und einfach auf die entsprechende Größe und Form zurechtgeschnitten werden können.

### **7.1.2.2. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Untersuchung mikrovaskulärer Netzwerke verschiedenster Gewebe. Durch die Anwendung der Epi-Illuminationstechnik ist auch eine Visualisierung des Gefäßsystems von nicht transilluminierbaren Organen möglich. In der vorliegenden Arbeit konnten nach der intravenösen Applikation von 5 % FITC-markiertem Dextran sowohl alle Gefäßabschnitte der Rückenhautkammerpräparation als auch die sich in den implantierten Scaffolds entwickelnden mikrovaskulären Netzwerke dargestellt werden. Mit den entsprechenden Bildverarbeitungstechniken (Intaglietta & Tompkins, 1972; Pries, 1988; Klyscz et al., 1997) können die bei der intravitale Fluoreszenzmikroskopie auf

DVD aufgezeichneten Bilder am Ende des Versuchs ohne weitere Belastung für das Versuchstier analysiert werden. Somit beschränkte sich in der vorliegenden Arbeit die repetitive Mikroskopie der Mikrozirkulation innerhalb der Rückenhautkammer auf ca. 15 min pro Untersuchungszeitpunkt.

### 7.1.2.3. Röntgen und $\mu$ CT

Neben der konventionellen Röntgenaufnahme stellen die 2D- und 3D-Mikrocomputertomographie weitere etablierte bildgebende Verfahren zur Darstellung knöcherner Strukturen dar. Die Röntgenuntersuchung liefert nur eine zweidimensionale Übersichtsaufnahme des Knochens und lässt somit nur eine Beurteilung der Größe und Dichte des Kallusgewebes zu (Augat et al., 2005; Holstein et al., 2007; Garcia et al., 2008). Im Gegensatz dazu bietet die Computertomographie eine dreidimensionale Rekonstruktion des Knochens einschließlich einer Berechnung anatomischer und biomechanischer Parameter des Knochens (Cano et al., 2008). Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten hochauflösenden *in vitro*  $\mu$ CT ist hierbei eine Detektierbarkeit von Strukturen mit einer Größe von 0,5  $\mu$ m und eine Auflösung von 8000x8000 Pixeln bei jedem Schnitt möglich.

Bei den Untersuchungen wurde mittels Röntgenaufnahmen des operierten Femurs die korrekte Implantatlage direkt nach der Implantation und vor der Tötung überprüft, sowie durch repetitive Röntgenaufnahmen der Heilungsverlauf dokumentiert. Die dreidimensionale Rekonstruktion des  $\mu$ CT-Datensatzes ermöglichte darüber hinaus eine Visualisierung des explantierten Femurs in sagittaler, axialer sowie koronarer Ebene. Durch die Auswertung des  $\mu$ CT-Datensatzes konnten neben dem Knochenanteil, der Trabekeldichte, der Trabekelzahl und dem trabekulären Abstand auch der PMOI als biomechanischer Parameter bestimmt werden.

## 7.2. Diskussion der Ergebnisse

### 7.2.1. Besiedlung poröser Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten

Die Prävascularisierung von Gewebekonstrukten stellt einen vielversprechenden Ansatz beim Tissue Engineering dar, um eine schnelle und ausreichende Vaskularisierung der Implantate mittels Inoskulation zu erzielen (Laschke et al., 2009b). In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Vaskularisierung von implantierten porösen nHA/PU-Scaffolds durch Besiedlung mit isolierten mikrovaskulären Fragmenten aus Fettgewebe deutlich verbessert werden kann. Die Gefäßfragmente zeichneten sich nach dem Isolierungsprozess durch eine gute Zellviabilität aus. Weiterhin konnten sie ein mikrovaskuläres Netzwerk innerhalb der Implantate ausbilden und durch die Freisetzung der pro-angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF die Angiogenese im Empfängergewebe stimulieren.

Im Gegensatz zu bestehenden *in vivo* und *in vitro* Methoden zur Prävascularisierung bietet die in dieser Arbeit untersuchte Prävascularisierungsstrategie die Möglichkeit, in kurzer Zeit poröse Scaffolds mit voll funktionsfähigen Mikrogefäßen zu besiedeln. Dabei ist es denkbar, diesen Ansatz mit der Besiedlung von Stromazellen zur Herstellung eines gewebespezifischen Konstrukts zu kombinieren. Hierfür sind keine komplexen Zellkulturtechniken oder repetitive chirurgische Eingriffe notwendig. Des Weiteren stellt Fettgewebe eine attraktive Quelle für mikrovaskuläre Fragmente dar, da es unter klinischen Bedingungen durch minimal-invasive Liposuktion mit einem geringen Morbiditätsrisiko gewonnen werden kann (Sterodimas et al., 2009). Außerdem enthält Fettgewebe eine große Zahl mesenchymaler Stammzellen. Diese haben die Fähigkeit in adipogene, chondrogene, osteogene, myogene, neurogene und endotheliale Linien zu differenzieren (Gimble et al., 2007; Müller et al., 2010, Witowska-Zimny & Walenko, 2011). Entsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die isolierten mikrovaskulären Fragmente sowohl Zellen enthalten, welche die mesenchymalen Stammzellmarker CD73 und CD117 exprimieren, als auch Sca-1/VEGFR-2-positive endotheliale Progenitorzellen. Diese einmalige Mischung aus funktionellen Gefäßeinheiten mit pluripotenten Zellen könnte

zukünftig zur Generierung von Gewebekonstrukten mit hohem Vaskularisierungs- und Regenerationspotential genutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden nHA/PU-Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt und für *in vivo* Analysen in die Rückenhautkammer implantiert. Das Ausbleiben einer starken inflammatorischen leukozytären Reaktion des Empfängergewebes nach Implantation spricht für eine exzellente Biokompatibilität der Scaffolds (Laschke et al., 2010b). Um eine gleichmäßige Besiedlung der Scaffolds zu erreichen, war hier zunächst die Entwicklung einer effektiven Besiedlungstechnik notwendig. In Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur (Dai et al., 2009) konnte gezeigt werden, dass die Effizienz einer statischen Besiedlung mittels Pipettieren von mikrovaskulären Fragmenten enthaltendem PBS auf die Oberfläche der Scaffolds trotz einer optimalen Porengröße von ~220 µm niedrig war. Aus diesem Grund wurde eine dynamische Besiedlungstechnik etabliert, bei der im Wechsel Über- und Unterdruck in den Scaffoldporen ohne großen technischen Aufwand erzeugt werden konnte. Dadurch war es möglich, die Luft aus den Scaffoldporen zu verdrängen und Oberflächenspannungen, welche an der Grenzfläche zwischen Luft und PBS entstehen, zu eliminieren. Durch den Wechsel von Über- und Unterdruck konnten die mikrovaskulären Fragmente die Scaffolds von beiden Seiten durchdringen, was zu ihrer homogenen Verteilung in den Scaffoldporen führte. Zukünftige Studien müssen nun zeigen, ob sich diese Besiedlungstechnik auch auf größere Scaffolds oder andere Scaffoldtypen übertragen lässt.

Durch die Verwendung von transgenen Mäusen als Spendertiere konnten die GFP-positiven Gefäße der Spendertiere leicht von den GFP-negativen Blutgefäßen der Wildtyp-Empfängertiere unterschieden werden. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die mikrovaskulären Fragmente dazu in der Lage waren, ein neues mikrovaskuläres Netzwerk auszubilden, welches mittels Inoskulation Verbindungen mit dem Gefäßnetzwerk des Empfängergewebes einging.

Generell können zwei Arten der Inoskulation unterschieden werden (Laschke et al., 2009b). Interne Inoskulation bedeutet, dass Mikrogefäße aus dem umliegenden Gewebe in ein prävascularisiertes Gewebekonstrukt einwachsen und Verbindungen zu überlebenden Gefäßen innerhalb des Implantats ausbilden. Andererseits können

präformierte Mikrogefäße auch aus einem Gewebekonstrukt auswachsen und sich außerhalb mit den Blutgefäßen des Empfängergewebes verbinden. In diesem Fall spricht man von externer Inoskulation. 14 Tage nach der Implantation von besiedelten Scaffolds in die Rückenhautkammer waren ~90 % der Mikrogefäße im Zentrum und ~60 % der Mikrogefäße im umliegenden Empfängergewebe GFP-positiv. Hieraus lässt sich schließen, dass die Durchblutung der implantierten Scaffolds in erster Linie durch externe Inoskulation erfolgte. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass bei diesem Ansatz die mikrovaskulären Fragmente überleben und eine hohe angiogene Aktivität aufweisen.

Die Vaskularisierung der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds ging mit Einblutungen einher. Dies ist typisch für eine VEGF-vermittelte Angiogenese, da VEGF die vaskuläre Permeabilität erhöht (Connolly 1991; Jin Kim et al., 2011). Entsprechend wird auch in früheren Studien zur Analyse der Vaskularisierung von Scaffolds berichtet, dass eine gute angiogene Reaktion auf verschiedene Implantate mit Einblutungen verbunden war (Laschke et al., 2008b; Laschke et al., 2010a).

Obwohl die Vaskularisierung der Scaffolds durch die Besiedlung mit mikrovaskulären Fragmenten deutlich verbessert wurde, konnte bis Tag 6 nach Implantation keine Blutperfusion im Zentrum der Implantate detektiert werden. Dies ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass die mikrovaskulären Fragmente zunächst Verbindungen untereinander und zu den Gefäßen des Empfängergewebes aufbauen müssen, um vollständig reperfundiert zu sein. Entsprechend vergehen einige Tage bis zur vollständigen Perfusion der Implantate. Aus diesem Grund ist es zukünftig notwendig, Strategien zur Optimierung der Inoskulation und Vaskularisierung der besiedelten Scaffolds zu entwickeln, um somit dem massiven Zelltod im Zentrum von gewebespezifischen Konstrukten in den ersten Tagen nach Implantation vorzubeugen. Dies könnte zum einen durch eine höhere Besiedlungsdichte der Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten erfolgen. Eine weitere Möglichkeit könnte die Kultivierung der besiedelten Scaffolds in angiogenem Medium sein, um die Bildung eines mikrovaskulären Netzwerks vor der Implantation zu stimulieren. Dieser Ansatz wurde im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

### 7.2.2. Präkultivierung von besiedelten Scaffolds in angiogenem Medium

Die Ausbildung eines neuen mikrovaskulären Netzwerks aus Gefäßfragmenten innerhalb eines Scaffolds dauert einige Tage (Shepherd et al., 2004; Shepherd et al., 2007; Laschke et al., 2012). In dieser Zeit sind die Zellen innerhalb des Scaffolds einer Hypoxie ausgesetzt, was zu ihrem Absterben führen kann. Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese kritische Phase durch die Präkultivierung Gefäßfragment-besiedelter Scaffolds nicht verkürzt werden kann.

Die Kultivierung mikrovaskulärer Fragmente innerhalb poröser nHA/PU-Scaffolds für 4 Wochen in angiogenem Medium führte zum Verlust ihrer ursprünglichen Gefäßmorphologie. So enthielten die präkultivierten Scaffolds hauptsächlich ein Netzwerk aus einzelnen Endothelzellen mit filigranen Zellfortsätzen, welche entlang der Scaffoldstränge wuchsen. Diese Dedifferenzierung der Gefäße stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein, in denen mikrovaskuläre Fragmente oder *in situ* generierte mikrovaskuläre Netzwerke teilweise ihre  $\alpha$ -SMA-positive perivaskuläre Zellschicht während einer Kultivierungsphase verloren (Shepherd et al., 2004; Laschke et al., 2011b). Die Interaktion der Endothelzellen und dieser stabilisierenden Zellschicht ist jedoch wesentlich für den Erhalt der mikrovaskulären Integrität (Diaz-Flores et al., 1991; Lindahl et al., 1997). Der fehlende Blutfluss während der Kultivierung könnte ebenfalls zur Regression der Gefäßfragmente beigetragen haben. So konnten Studien zeigen, dass die durch den Blutfluss erzeugten Scherkräfte die Proliferation und das Überleben von Endothelzellen regulieren (Kadohama et al., 2007).

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen berichten Hoying et al. (1996) und Shepherd et al. (2004; 2007), dass Gefäßfragmente *in vitro* durchaus mikrovaskuläre Netzwerke ausbilden können. In diesen Studien waren die Fragmente im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit zusätzlich jedoch in ein Kollagen-Gel eingebettet. Das Kollagen bot möglicherweise eine physiologischere Umgebung, welche der extrazellulären Matrix in Geweben entsprach. In der Tat wurde in den Versuchen von Ingber (2002) und Yang et al. (2004) gezeigt, dass die extrazelluläre Matrix nicht nur als dreidimensionaler Wachstumsraum für neugebildete Blutgefäße dient, sondern auch intrazelluläre Signalwege stimulieren kann, welche für die Angiogenese eine

große Rolle spielen. Es sollte daher in Folgestudien geprüft werden, ob durch Modifikation der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Scaffolds nicht ein besseres Vaskularisierungsergebnis erzielt werden kann.

Die Poren der Scaffolds könnten hierzu mit einem extrazellulären Matrix-Äquivalent gefüllt werden. Dabei wäre es möglich, dem extrazellulären Matrix-Äquivalent angiogene Wachstumsfaktoren zuzusetzen, um die Angiogenese und die Bildung eines mikrovaskulären Netzwerks innerhalb der Scaffolds zu optimieren (Laschke et al., 2008b). Andererseits muss bedacht werden, dass jede zusätzliche Modifikation eines Gewebekonstrukts die Einführung in die klinische Praxis erschwert, da es hier große regulatorische Hürden zu überwinden gilt. Somit stellt die Implantation von Scaffolds mit frisch isolierten, nicht kultivierten mikrovaskulären Fragmenten derzeit die am ehesten realisierbare Strategie für einen potentiellen Einsatz in der Klinik dar.

Sowohl die intravitale Fluoreszenzmikroskopie als auch die histomorphologische Charakterisierung der präkultivierten und frisch besiedelten Scaffolds zeigte, dass beide Scaffoldtypen ein unterschiedliches Vaskularisierungsverhalten nach der Implantation in die Rückenhautkammer aufweisen. Während sich in den Randbereichen der Scaffolds eine vergleichbare Zahl an Mikrogefäßen ausbildete, zeigten die frisch besiedelten Scaffolds im Vergleich zu den präkultivierten Scaffolds in ihrem Zentrum eine deutlich verbesserte Vaskularisierung. Die Tatsache, dass ~90 % der Gefäße innerhalb der frisch besiedelten Scaffolds GFP-positiv waren, spricht dafür, dass diese verbesserte Vaskularisierung durch die Ausbildung eines Gefäßnetzwerks aus den frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten bedingt war. Daraus resultierte auch ein höherer Gewebeanteil in den Implantaten. Dies verdeutlicht, wie wichtig eine ausreichende Vaskularisierung für das Überleben und die erfolgreiche Inkorporation von Gewebekonstrukten ist (Laschke et al., 2006; Auger et al., 2013).

Trotz der schlechten Vaskularisierung konnten an Tag 14 nach Implantation bei den präkultivierten Scaffolds sowohl im Randbereich als auch im Zentrum ebenfalls GFP- positive Gefäße detektiert werden. Dies zeigt, dass die Endothelzellen der mikrovaskulären Fragmente auch nach einer Präkultivierung über 28 Tage noch an der Ausbildung eines mikrovaskulären Netzwerks innerhalb der Implantate beteiligt sind. Die nahezu vergleichbare Vaskularisierung in den Randbereichen der beiden

Scaffoldtypen lässt sich durch eine unspezifische angiogene Reaktion des Empfängergewebes erklären. Diese ist durch eine angiogene Stimulation bedingt, welche von den Zellen im Scaffold verursacht wird. Diese Zellen waren in der initialen Phase nach Implantation einer Hypoxie ausgesetzt, was wahrscheinlich zu einer Freisetzung von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF führte. Ein vergleichbares Ergebnis wurde in einer Studie von Schumann et al. (2009) gefunden. Hierbei wurden Scaffolds mit Osteoblasten-ähnlichen Zellen, mesenchymalen Knochenmarkstammzellen oder einer Kombination aus beiden Zelltypen besiedelt. Dies führte zu einer vergleichbaren Vaskularisierung der unterschiedlich besiedelten Scaffolds, was durch die Freisetzung von VEGF aus den verschiedenen Zelltypen verursacht wurde.

### **7.2.3. Mikrovaskuläre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten beim Knochen-Tissue Engineering**

Die Rekonstruktion von Knochendefekten stellt eine große klinische Herausforderung dar. Das Tissue Engineering von Knochen bietet hierbei einen neuen therapeutischen Ansatz, um große Segmentdefekte zu behandeln. Dabei spielt die Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte eine essentielle Rolle. Da *in vitro* erzeugte Knochenkonstrukte nicht wie Organtransplantate über ein versorgendes Gefäßnetzwerk verfügen, ist die Entwicklung einer Prävaskularisierungsstrategie für solche Implantate von großer Bedeutung. Wie bereits in den ersten beiden Studienabschnitten der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, besitzen mikrovaskuläre Fragmente aus Fettgewebe ein hohes angiogenes Potential und führen zu einer verbesserten Vaskularisierung von Scaffolds nach Implantation.

Aus diesem Grund war es das Ziel des dritten Studienabschnittes zu analysieren, ob sich die mikrovaskulären Fragmente auch als Vaskularisierungseinheiten von Knochenkonstrukten eignen und die Knochenheilung entsprechend positiv beeinflussen. Die Ergebnisse dieses Studienabschnitts zeigen jedoch, dass die Besiedlung von nHA/PU-Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten nicht zu einer besseren Heilung der induzierten Knochendefekte führte. So kam es in der Gruppe der Gefäßfragment-besiedelten Implantate nach 25 Wochen zu keiner knöchernen

Überbrückung des Defekts. Stattdessen war in den Röntgenaufnahmen am Ende der Versuche eine typische atrophe Pseudarthrose zu erkennen. Auch die biomechanische Auswertung der Knochen der Gefäßfragment-besiedelten Gruppe mittels  $\mu$ CT bestätigte die Ausbildung einer atrophischen Pseudarthrose. So entsprach der PMOI dieser Gruppe dem PMOI von atrophischen Pseudarthrosen, wie er in einer Studie von Holstein et al. (2011) gemessen wurde.

In der Kontrollgruppe war im Gegensatz zur Gruppe mit den Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds der Segmentspalt nach 25 Wochen knöchern überbrückt. Dies zeigt, dass die mikrovaskulären Fragmente für die ausbleibende Knochenheilung und die damit zusammenhängende Ausbildung einer atrophischen Pseudarthrose offensichtlich ursächlich waren.

Die Expression des Endothelzellmarkers CD31 innerhalb den Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds nahm von Tag 0 zu Tag 14 ab und war schließlich mit der CD31-Expression in der Kontrollgruppe vergleichbar. Dies deutet darauf hin, dass die mikrovaskulären Fragmente innerhalb der Scaffolds in den ersten 14 Tagen nach Implantation zum Großteil regredierten und die CD31-Expression schließlich nur noch durch das Einwachsen von Gefäßen des Empfängergewebes in die Scaffolds bedingt war. Die Regression der Gefäßfragmente könnte durch die Ergebnisse von Schechner et al. (2000) erklärt werden. Sie zeigen, dass ein primitives mikrovaskuläres Netzwerk, welches aus Endothelzellen generiert wurde, nach Implantation nicht ausreift und durch den Prozess der Apoptose abstirbt. Ein weiterer Grund für die Regression der Gefäßfragmente könnte sein, dass für die Implantation in den Segmentdefekt ein in seiner geometrischen Form modifiziertes Scaffold verwendet wurde. Die Scaffolds, welche in den Rückenhautkammerversuchen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, hatten eine Größe von 3 x 3 x 1 mm. Hier überlebten die mikrovaskulären Fragmente innerhalb der Scaffolds und bildeten ein mikrovaskuläres Netzwerk aus (Laschke et al., 2012). Die Scaffolds, welche in den Segmentdefekt implantiert wurden, wiesen im Gegensatz dazu einen Durchmesser und eine Länge von 1,8 mm auf. Durch den größeren Durchmesser von 1,8 mm könnten die mikrovaskulären Fragmente innerhalb der Scaffolds in den ersten Tagen nach der Implantation aufgrund der verlängerten Diffusionsstrecken nicht

ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt worden und somit abgestorben sein.

Die deutliche Abnahme der GFP-Expression innerhalb der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds von Tag 0 zu Tag 14 ist ein weiterer Hinweis darauf, dass ein großer Teil der Endothelzellen innerhalb der Gefäßfragmente abstarb. Dennoch war an Tag 14 eine GFP-Expression detektierbar. Dies zeigt, dass ein Teil der eingebrachten Zellen innerhalb der Scaffolds überleben konnte. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Zellen um die Stammzellen, welche in den Gefäßfragmenten nachgewiesen werden konnten. Es ist denkbar, dass diese überleben und für die ausbleibende Frakturheilung verantwortlich sind. So haben verschiedene Studien bereits gezeigt, dass Stammzellen aus dem Fettgewebe nach Implantation sehr gut *in vivo* überleben können (Levi et al., 2010; Nomura et al., 2014). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich die Stammzellen im vorliegenden Experiment zu Bindegewebszellen differenziert und damit das Einwachsen von neuem Knochen verhindert haben.

### **7.3. Schlussfolgerungen**

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals poröse nHA/PU-Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt. Diese mikrovaskulären Fragmente können in kurzer Zeit leicht aus dem Fettgewebe isoliert werden. Sie besitzen ein hohes Vaskularisierungspotential, wodurch die Inoskulation nach Implantation von Gewebekonstrukten gefördert wird. Aus diesem Grund könnte dieser neue Ansatz wesentlich zu einer schnellen und ausreichenden Vaskularisierung von Gewebekonstrukten beitragen und zukünftig zur Anwendung in der klinischen Praxis kommen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Präkultivierung mikrovaskulärer Fragmente innerhalb von Scaffolds nicht ihr Vaskularisierungspotential verbessert. Stattdessen führt die Präkultivierung zu einer veränderten Morphologie und verschlechterten Funktion der mikrovaskulären Fragmente. Es sollten daher frisch

isolierte Gefäßfragmente für Anwendungen im Tissue-Engineering bevorzugt werden.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass durch Implantation von leeren nHA/PU-Scaffolds große Segmentdefekte im Mausmodell ausgeheilt werden können. Die Besiedlung der Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten führt jedoch zur Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose im Segmentspalt. Somit sind die mikrovaskulären Fragmente im vorliegenden Versuchsaufbau zunächst nicht als Vaskularisierungseinheiten geeignet. In zukünftigen Studien muss nun untersucht werden, was in diesem Fall die genaue Ursache der ausbleibenden Knochenheilung ist.

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Agrawal CM, Ray RB** (2001) Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Biomed Mater Res.* 55:141-150.
2. **Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP** (2012) Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 40:363-408.
3. **Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L** (2005) Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int.* 16:36-43.
4. **Auger FA, Gibot L, Lacroix D** (2013) The pivotal role of vascularization in tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng.* 15:177-200.
5. **Becker ST, Warnke PH, Behrens E, Wiltfang J** (2011) Morbidity after iliac crest bone graft harvesting over an anterior versus posterior approach. *J Oral Maxillofac Surg.* 69:48-53.
6. **Boissard CI, Bourban PE, Tami AE, Alini M, Eglin D** (2009) Nanohydroxyapatite/poly(ester urethane) scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 5:3316-3327.
7. **Borenstein JT, Weinberg EJ, Orrick BK, Sundback C, Kaazempur-Mofrad MR, Vacanti JP** (2007) Microfabrication of three-dimensional engineered scaffolds. *Tissue Eng.* 13:1837-1844.
8. **Bosemark P, Isaksson H, McDonald MM, Little DG, Tägil M** (2013) Augmentation of autologous bone graft by a combination of bone morphogenic protein and bisphosphonate increased both callus volume and strength. *Acta Orthop.* 84:106-111.
9. **Bramfeldt H, Sabra G, Centis V, Vermette P** (2010) Scaffold vascularization: a challenge for three-dimensional tissue engineering. *Curr Med Chem.* 17:3944-3967.
10. **Budynas R, Nisbett K** (2008) Shigley's Mechanical Engineering Design. 8th edition. McGraw-Hill.
11. **Butler MJ, Sefton MV** (2007) Poly(butyl methacrylate-co-methacrylic acid) tissue engineering scaffold with pro-angiogenic potential in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 82:265-273.
12. **Cano J, Campo J, Vaquero JJ, Martínez González JM, Bascones A** (2008) High resolution image in bone biology II. Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 13:31-35.
13. **Chen W, Tabata Y, Tong YW** (2010) Fabricating tissue engineering scaffolds for simultaneous cell growth and drug delivery. *Curr Pharm Des.* 16:2388-2394.

14. **Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS, Wang Z, Rockson SG, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO** (2003) Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10623-10628.
15. **Colton CK** (1995) Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant* 4:415-436.
16. **Connolly DT** (1991) Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem.* 47:219-223.
17. **Dai W, Dong J, Chen G, Uemura T** (2009) Application of low-pressure cell seeding system in tissue engineering. *Biosci Trends.* 3:216-219.
18. **Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F** (1991) Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol.* 6:269-286.
19. **Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV** (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 36:1392-1404.
20. **Druecke D, Langer S, Lamme E, Pieper J, Ugarkovic M, Steinau HU, Homann HH** (2004) 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.
21. **Ducheyne P, Qiu Q** (1999) Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials.* 20:2287-2303.
22. **Dumont C, Kauer F, Bohr S, Schmidtman U, Knopp W, Engelhardt T, Stürmer EK, Stürmer KM** (2008) Long-term effects of saw osteotomy versus random fracturing on bone healing and remodeling in a sheep tibia model. *J Orthop Res.* 27:680-686.
23. **Einhorn TA** (1995) Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 77:940-956.
24. **Einhorn TA** (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 355:7-21.
25. **Ennett AB, Kaigler D, Mooney DJ** (2006) Temporally regulated delivery of VEGF in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 79:176-184.
26. **Ewers R, Turhani D, Item CB, Kapral D, Thurnher D, Cviki B, Weissenböck M, Erovic BM, Lauer G** (2003) „Bioengineered Knochen-Produktion“ - Aktuelle Anwendungen des Tissue Engineering in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. *Zahnärztl Impl* 19:153-158.
27. **Folkman J, Hocherg M** (1973) Self-regulation of growth in three dimensions. *Exp Med.* 138:745-753.
28. **Freyman TM, Yannas IV, Yokoo R, Gibson LJ** (2001) Fibroblast contraction of a collagen GAG-matrix. *Biomaterials.* 22:2883-2891.

29. **Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD** (2008) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res.* 147:84-91.
30. **Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, Pohlemann T** (2011) The LockingMouseNail-a new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *J Surg Res.* 169:220-226.
31. **Garlanda C, Dejana E** (1997) Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:1193-1202.
32. **Gerstenfeld LC, Sacks DJ, Pelis M, Mason ZD, Graves DT, Barrero M, Ominsky MS, Kostenuik PJ, Morgan EF, Einhorn TA** (2009) Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 24:196-208.
33. **Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA** (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 100:1249-1260.
34. **Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG** (1985) Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res.* 3:389-404.
35. **Goldhahn S, Moser R, Bigler R, Matter P** (2000) Treatment methods and outcomes of tibial shaft fractures in Switzerland. A prospective multicenter study of the Swiss AO. *Swiss Surg.* 6:315-322.
36. **Gorna K, Gogolewski S** (2006) Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 79:128-138.
37. **Heckman JD, Sarasohn-Kahn J** (1997) The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull Hosp Jt Dis.* 56:63-72.
38. **Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E** (1993) Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res.* 297:23-27.
39. **Holland TA, Bodde EW, Baggett LS, Tabata Y, Mikos AG, Jansen JA** (2005) Osteochondral repair in the rabbit model utilizing bilayered degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 75:156-167.
40. **Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T** (2007) Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci.* 80:893-900.
41. **Holstein JH, Orth M, Scheuer C, Tami A, Becker SC, Garcia P, Histing T, Mörsdorf P, Klein M, Pohlemann T, Menger MD** (2011) Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice. *Bone.* 49:1037-1045.

42. **Hoying JB, Boswell CA, Williams SK** (1996) Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 32:409-419.
43. **Ingber DE** (2002) Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res.* 91:877-887.
44. **Intaglietta M, Tompkins WR** (1972) On-line measurement of microvascular dimensions by television microscopy. *J Appl Physiol.* 32:546-551.
45. **Isaksson H, Gröngröft I, Wilson W, van Donkelaar CC, van Rietbergen B, Tami A, Huiskes R, Ito K** (2009) Remodeling of fracture callus in mice is consistent with mechanical loading and bone remodeling theory. *J Orthop Res.* 27:664-672.
46. **Jin Kim Y, Hyun Kim C, Hwan Cheong J, Min Kim J** (2011) Relationship between expression of vascular endothelial growth factor and intratumoral hemorrhage in human pituitary adenomas. *Tumori.* 97:639-646.
47. **Kadohama T, Nishimura K, Hoshino Y, Sasajima T, Sumpio BE** (2007) Effects of different types of fluid shear stress on endothelial cell proliferation and survival. *J Cell Physiol.* 212:244-251.
48. **Karageorgiou V, Kaplan D.** (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 26:5474-5491.
49. **Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H** (1997) Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl).* 42:168-175.
50. **Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE** (2006) Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med.* 10:7-19.
51. **Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK** (2004) Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature.* 428:138-139.
52. **Kokemueller H, Spalthoff S, Nolf M, Tavassol F, Essig H, Stuehmer C, Bormann KH, Rucker M, Gellrich NC** (2010) Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study insheep and first clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 39:379-387.
53. **Kugimiya F, Kawaguchi H, Kamekura S, Chikuda H, Ohba S, Yano F, Ogata N, Katagiri T, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Chung UI** (2005) Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem.* 280:35704-35712.
54. **Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

55. **Laschke MW, Häufel JM, Thorlacijs H, Menger MD** (2005) New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *Biomed Mater Res* 74:696-704.
56. **Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rucker M, Junker D, Haufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD** (2006) Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng.* 12:2093-2104.
57. **Laschke MW, Rucker M, Jensen G, Carvalho C, Mulhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2008a) Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Ann Surg.* 248:939-948.
58. **Laschke MW, Rucker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2008b) Incorporation of growth factor containing Matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 85:397-407.
59. **Laschke MW, Strohe A, Scheuer C, Eglin D, Verrier S, Alini M, Pohlemann T, Menger MD** (2009a) In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater.* 5:1991-2001.
60. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD** (2009b) Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Eng Part B Rev.* 15:455-465.
61. **Laschke MW, Mussawy H, Schuler S, Eglin D, Alini M, Menger MD** (2010a) Promoting external inosculation of prevascularised tissue constructs by pre-cultivation in an angiogenic extracellular matrix. *Eur Cell Mater.* 20:356-366.
62. **Laschke MW, Strohe A, Menger MD, Alini M, Eglin D** (2010b) In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 6:2020-2027.
63. **Laschke MW, Mussawy H, Schuler S, Kazakov A, Rucker M, Eglin D, Alini M, Menger MD** (2011a) Short-term cultivation of in situ prevascularized tissue constructs accelerates inosculation of their preformed microvascular networks after implantation into the host tissue. *Tissue Eng Part A.* 5:841-853.
64. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD** (2011b) The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater.* 22:147-164.
65. **Laschke MW, Menger MD** (2012) Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res.* 48:85-92.
66. **Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Schuler S, Garcia P, Eglin D, Alini M, Menger MD** (2012) Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater.* 24:266-277.

67. **Lees JG, Lim SA, Croll T, Williams G, Lui S, Cooper-White J, McQuade LR, Mathiyalagan B, Tuch BE** (2007) Transplantation of 3D scaffolds seeded with human embryonic stem cells: biological features of surrogate tissue and teratoma-forming potential. *Regen Med.* 2:289-300.
68. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K** (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol.* 143:1055-1062.
69. **Levi B, James AW, Nelson ER, Vistnes D, Wu B, Lee M, Gupta A, Longaker MT** (2010) Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One.* 5:e11177.
70. **Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C** (1997) Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 277:242-245.
71. **Lokmic Z, Stillaert F, Morrison WA, Thompson EW, Mitchell GM** (2007) An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *FASEB J.* 21:511-522.
72. **Lokmic Z, Mitchell GM** (2008) Engineering the microcirculation. *Tissue Eng Part B Rev.* 14:87-103.
73. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *193:265-275.*
74. **Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS** (2007) Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res.* 25:51-61.
75. **Marijnissen WJ, Van Osch GJ, Aigner J, Van Der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA** (2002) Alginate as a chondrocyte delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 23:1511-1517.
76. **Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, Cancedda R** (2005) Tissue engineering of bone: Search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res.* 8:277-284.
77. **McKibbin B** (1978) The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60:150-162.
78. **Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K** (1990) Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg.* 38:139-145.
79. **Menger MD, Lehr HA** (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today.* 14:519-522.

80. **Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, Langer R** (1994) Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials* 15:55-58.
81. **Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC** (2009) Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone*. 44:335-344.
82. **Müller AM, Mehrkens A, Schäfer DJ, Jaquiere C, Güven S, Lehmicke M, Martinetti R, Farhadi I, Jakob M, Scherberich A, Martin I** (2010) Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur Cell Mater*. 19:127-135.
83. **Mundlos S, Olsen BR** (1997) Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J*. 11:227-233.
84. **Nam YS, Yoon JJ, Park TG** (2000) A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive. *J Biomed Mat Res*. 53:1-7.
85. **Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH** (2007) Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials*. 28:1123-1131.
86. **Nomi M, Atala A, Coppi PD, Soker S** (2002) Principles of neovascularization for tissue engineering. *Mol Aspects Med*. 23:463-483.
87. **Nomura I, Watanabe K, Matsubara H, Hayashi K, Sugimoto N, Tsuchiya H** (2014) Uncultured Autogenous Adipose-derived Regenerative Cells Promote Bone Formation During Distraction Osteogenesis in Rats. *Clin Orthop Relat Res*. 8:[Epub ahead of print].
88. **Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ** (2011) Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 63:300-311.
89. **Nunes SS, Krishnan L, Gerard CS, Dale JR, Maddie MA, Benton RL, Hoying JB** (2010a) Angiogenic potential of microvessel fragments is independent of the tissue of origin and can be influenced by the cellular composition of the implants. *Microcirculation*. 17:557-567.
90. **Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y** (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 407:313-319.
91. **O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM** (2008) Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am*. 90:79-84.

92. **Orr AW, Elzie CA, Kucik DF, Murphy-Ullrich JE** (2003) Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci.* 116:2917-2927.
93. **Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J** (2005) VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *Bone Miner Res.* 20:2017-2027.
94. **Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S** (2003) 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.
95. **Pries AR** (1988) A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp.* 7:327-345.
96. **Reed AA, Joyner CJ, Isefuku S, Brownlow HC, Simpson AH** (2003) Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *J Bone Joint Surg Br.* 85:604-610.
97. **Ren LL, Ma DY, Feng X, Mao TQ, Liu YP, Ding Y** (2008) A novel strategy for prefabrication of large and axially vascularized tissue engineered bone by using an arteriovenous loop. *Med Hypotheses.* 71:737-740.
98. **Rivron NC, Liu J J, Rouwkema J, de Boer J, van Blitterswijk CA** (2008) Engineering vascularised tissues in vitro. *Eur Cell Mater.* 15:27-40.
99. **Rodriguez-Merchan EC, Forriol F** (2004) Nonunion: general principles and experimental data. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 419:4-12.
100. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2006) Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials.* 27:5027-5038.
101. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Tavassol F, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2008) Vascularization and biocompatibility of scaffolds consisting of different calcium phosphate compounds. *J Biomed Mater Res A.* 86:1002-1011.
102. **Rüter A, Trentz O, Wagner M** (2003) *Unfallchirurgie.* 2. Auflage. Elsevier. München.
103. **Sándor GK, Numminen J, Wolff J, Thesleff T, Miettinen A, Tuovinen VJ, Mannerström B, Patrikoski M, Seppänen R, Miettinen S, Rautiainen M, Öhman J** (2014) Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects. *Stem Cells Transl Med.* 3:530-540.
104. **Santos MI, Reis RL** (2010) Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci.* 10:12-27.

105. **Schechner JS, Nath AK, Zheng L, Kluger MS, Hughes CC, Sierra-Honigmann MR, Lorber MI, Tellides G, Kashgarian M, Bothwell AL, Pober JS** (2000) In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9191-9196.
106. **Schumann P, Tavassol F, Lindhorst D, Stuehmer C, Bormann KH, Kampmann A, Mülhaupt R, Laschke MW, Menger MD, Gellrich NC, Rücker M** (2009) Consequences of seeded cell type on vascularization of tissue engineering constructs in vivo. *Microvasc Res.* 78:180-190.
107. **Shepherd BR, Chen HY, Smith CM, Gruionu G, Williams SK, Hoying JB** (2004) Rapid perfusion and network remodeling in a microvascular construct after implantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:898-904.
108. **Shepherd BR, Enis DR, Wang F, Suarez Y, Pober JS, Schechner JS** (2006) Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell-derived endothelial cells. *FASEB J.* 20:1739-1741.
109. **Shepherd BR, Hoying JB, Williams SK** (2007) Microvascular transplantation after acute myocardial infarction. *Tissue Eng.* 13:2871-2879.
110. **Smiler D, Soltan M, Lee JW** (2007) A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dent.* 16:42-53.
111. **Soltysiak P, Saxena AK** (2009) Micro-computed tomography for implantation site imaging during in situ oesophagus tissue engineering in a live small animal model. *J Tissue Eng Regen Med.* 3:573-576.
112. **Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I** (2010) Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 63:1886-1892.
113. **Sumpio BE, Riley JT, Dardik A** (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:1508-1512.
114. **Temenoff JS, Mikos AG** (2000) Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials.* 21:2405-2412.
115. **Tsang VL, Bhatia SN** (2007) Fabrication of three-dimensional tissues. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 103:189-205.
116. **Wiese A, Pape HC** (2010) Bone defects caused by high-energy injuries, bone loss, infected nonunions, and nonunions. *Orthop. Clin. North Am.* 41:1-4.
117. **Winet H, Bao JY, Moffat R** (1990) A control model for tibial cortex neovascularization in the bone chamber. *J Bone Miner Res.* 5:19-30.
118. **Witkowska-Zimny M, Walenko K** (2011) Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett.* 16:236-257.

119. **Wu X, Rabkin-Aikawa E, Guleserian KJ, Perry TE, Masuda Y, Sutherland FW, Schoen FJ, Mayer JE Jr, Bischoff J** (2004) Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287:480-487.
120. **Yang B, Cao DJ, Sainz I, Colman RW, Guo YL** (2004) Different roles of ERK and p38 MAP kinases during tube formation from endothelial cells cultured in 3-dimensional collagen matrices. *J Cell Physiol.* 200:360-369.
121. **Yoshimura Y, Nomura S, Kawasaki S, Tsutsumimoto T, Shimizu T, Takaoka K** (2001) Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4 during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 16:876-884.
122. **Zarem HA** (1969) The microcirculatory events within full-thickness skin allografts (homografts) in mice. *Surgery.* 66:392-397.

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, meinen Dank aussprechen. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Menger, Herrn PD Dr. Matthias Laschke und Herrn PD Dr. Patric Garcia für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes tätig sein zu dürfen. Durch ihre persönliche Anleitung, ihre stete Unterstützung und ihre konstruktive Kritik haben diese Personen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Elisabeth Gluding, Frau Janine Becker, Frau Dr. Claudia Scheuer, Frau Sandra Schuler und Frau Julia Parakenings bedanken, die mir in technischen Fragen in Rat und Tat zur Seite standen. Ihre Unterstützung bei den Laborarbeiten und der Erstellung von histologischen Präparaten haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

## 10. Lebenslauf

Geboren am:	14.05.1985
Geboren in:	Ottweiler
Familienstand:	ledig
Eltern:	Friedbert Kleer, Annelie Kleer, geb. Müller
Schulische Ausbildung:	1991 - 1995 Grundschule Urexweiler  1995 - 2005 Gymnasium Wendalinum St. Wendel, Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
Universitäre Ausbildung:	2005 - 2010 Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim, Stuttgart 2010 Diplomarbeit im Institut für Umwelt und Tierhygiene mit Tierklinik der Universität Hohenheim Abschluss: Diplom
Berufliche Ausbildung:	2011 – 2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

## 11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die von mir vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde zulässige Hilfe angefertigt worden ist. Alle Ausführungen, die anderen Schriften sowohl wörtlich als auch sinngemäß entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere des Weiteren, dass die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse und Daten bislang nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung waren.

Datum

Unterschrift

## 12. Publikationen

### Originalarbeiten

1. Laschke MW, **Kleer S**, Scheuer C, Schuler S, Garcia P, Eglin D, Alini M, Menger MD (2012) Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater.* 24:266-277.
2. Laschke MW, Schank TE, Scheuer C, **Kleer S**, Schuler S, Metzger W, Eglin D, Alini M, Menger MD (2013) Three-dimensional spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells are potent initiators of blood vessel formation in porous polyurethane scaffolds. *Acta Biomater.* 9:6876-6884.
3. Laschke MW, Schank TE, Scheuer C, **Kleer S**, Shadmanov T, Eglin D, Alini M, Menger MD (2014) In vitro osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids impairs their in vivo vascularization capacity inside implanted porous polyurethane scaffolds. *Acta Biomater.* 10:4226-4235.
4. Laschke MW, Augustin V, **Kleer S**, Tschernig T, Menger MD (2014) Locally applied macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) promotes early vascularization of implanted porous polyethylene (Medpor®). *Acta Biomater.* 10:4661-4669.
5. Laschke MW, Grässer C, **Kleer S**, Scheuer C, Eglin D, Alini M, Menger MD (2014) Adipose tissue-derived microvascular fragments from aged donors exhibit an impaired vascularisation capacity. *Eur Cell Mater.* 28:287-298.
6. Laschke MW, **Kleer S**, Scheuer S, Eglin D, Alini M, Menger MD (2014) Pre-cultivation of adipose tissue-derived microvascular fragments inside porous scaffolds impairs their in vivo vascularization potential. *Eur Cell Mater*, in revision.

## Publizierte Abstracts

**Kleer S**, Laschke MW, Scheuer C, Schuler S, Eglin D, Alini M, Menger MD (2012) Generation of tissue constructs with high vascularization potential by seeding porous polyurethane scaffolds with microvascular fragments. *Langenbecks Arch Surg.* 397:654.