

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

---

**METABOLISCHE AKTIVIERUNG  
ISOLIERTER MIKROVASKULÄRER FRAGMENTE AUS FETTGEWEBE  
FÜR DAS TISSUE ENGINEERING**

EINE EXPERIMENTELLE *IN VIVO* STUDIE AM RÜCKENHAUTKAMMERMODELL DER MAUS

---

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

**2020**

vorgelegt von Michael S. Seifert  
geboren am 31.12.1994 in Nürnberg

MEINER LIEBEN FRANZISKA

Datum: 14.01.2021

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias W. Laschke

Prof. Dr. Frank Lammert

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung .....	1
2	Summary .....	3
3	Einleitung.....	5
3.1	Tissue Engineering .....	5
3.2	Mikrovaskuläre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten .....	9
3.3	Metabolische Aktivierung mikrovaskulärer Fragmente .....	10
4	Ziel der Studie .....	14
5	Material und Methoden .....	15
5.1	Versuchstiere.....	15
5.2	Experimentelles Modell .....	15
5.2.1	Isolierung mikrovaskulärer Fragmente .....	15
5.2.2	Kultivierung mikrovaskulärer Fragmente.....	18
5.2.3	Proteinexpression mikrovaskulärer Fragmente.....	19
5.2.4	Herstellung prävaskularisierter Integra®-Scaffolds.....	19
5.2.5	Morphologie mikrovaskulärer Fragmente.....	20
5.2.6	Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer.....	21
5.2.7	Präparation der Rückenhautkammer .....	22
5.2.8	Implantation prävaskularisierter Integra®-Scaffolds .....	25
5.3	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	27
5.3.1	Mikrozirkulatorische Analysen.....	29
5.3.1.1	Perfundierte ROIs.....	29
5.3.1.2	Funktionelle Kapillardichte.....	30
5.3.1.3	Gefäßdurchmesser.....	30
5.3.1.4	Blutzellgeschwindigkeit.....	30
5.3.1.5	Scherrate .....	31
5.3.1.6	Volumetrischer Blutfluss .....	31

---

5.4	Histologie und Immunhistochemie.....	32
5.4.1	Herstellung histologischer Präparate .....	32
5.4.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung .....	32
5.4.3	Sirius Red-Färbung.....	32
5.4.4	CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung .....	33
5.4.5	CD31-Caspase (Casp)-3- und CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbung .	34
5.5	Experimentelles Protokoll .....	35
5.5.1	<i>In vivo</i> Untersuchungen .....	35
5.5.1.1	Versuchsgruppen im ersten Studienabschnitt .....	35
5.5.1.2	Versuchsgruppen im zweiten Studienabschnitt .....	36
5.5.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen .....	36
5.5.3	Versuchsablauf .....	36
5.6	Statistik.....	37
6	Ergebnisse .....	38
6.1	Mikrozirkulation der Rückenhautkammer .....	38
6.2	Insulin-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente .....	39
6.2.1	<i>In vivo</i> Untersuchungen .....	39
6.2.1.1	Vaskularisierung implantierter Integra®-Scaffolds .....	39
6.2.1.2	Mikrohämodynamik .....	40
6.2.2	Histologie und Immunhistochemie .....	43
6.3	Glukose-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente.....	46
6.3.1	<i>In vivo</i> Untersuchungen .....	46
6.3.1.1	Vaskularisierung implantierter Integra®-Scaffolds .....	46
6.3.1.2	Mikrohämodynamik .....	47
6.3.2	Histologie und Immunhistochemie .....	48
6.3.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen .....	51
6.3.3.1	Proteinexpression mikrovaskulärer Fragmente .....	51
6.3.3.2	Morphologie mikrovaskulärer Fragmente .....	51

---

6.3.3.3	Viabilität und Proliferation mikrovaskulärer Fragmente .....	53
6.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	54
7	Diskussion .....	57
7.1	Diskussion von Material und Methoden .....	57
7.1.1	Rückenhautkammermodell .....	57
7.1.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	59
7.2	Diskussion der Ergebnisse .....	60
7.2.1	Insulin-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente .....	60
7.2.2	Glukose-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente .....	63
7.2.3	Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven .....	67
8	Literatur .....	69
9	Danksagung .....	90
10	Lebenslauf .....	91
11	Publikation .....	92

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel des Tissue Engineerings ist die Herstellung autologer Ersatzgewebe. Zu diesem Zweck werden patienteneigene Zellen auf Trägermatrices, sogenannte Scaffolds, gesiedelt und in entsprechende Gewebedefekte implantiert. Um die transferierten Zellen im Anschluss mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, ist eine schnelle und adäquate Vaskularisierung von wesentlicher Bedeutung. Eine reine Vaskularisierung über das Einwachsen neuer Blutgefäße aus dem umliegenden Empfängergewebe ist jedoch ein langwieriger Vorgang. Daher wurde in den letzten Jahren das Konzept der Prävascularisierung von Scaffolds mittels adipösen mikrovaskulären Fragmenten etabliert. Diese verbinden sich kurz nach Implantation über den Prozess der Inoskulation mit dem vaskulären System des Empfängergewebes, was die Vaskularisierung von Scaffolds erheblich beschleunigt.

Trotz ihres hervorragenden Vaskularisierungspotentials dauert der Zusammenschluss mikrovaskulärer Fragmente zu einem neuen Gefäßnetzwerk *in vivo* immer noch einige Tage. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Strategien untersucht, die zur Beschleunigung dieses Prozesses beitragen können. Vergangene Studien zeigten, dass metabolische Signale, wie Insulin, pro-angiogene Signalkaskaden im Fettgewebe initiieren. Insbesondere die Ausschüttung von Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 aus Adipozyten spielt hierbei eine wichtige Rolle. Daher wurde **im ersten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Insulin zu einer gesteigerten Vaskularisierungskapazität mikrovaskulärer Fragmente führt und inwiefern dieser potentielle Effekt über IGF-1 vermittelt wird. Hierfür wurden aus dem Nebenhodenfettgewebe von Spendermäusen mikrovaskuläre Fragmente isoliert und für 24 h bei 4 °C in University of Wisconsin- (UW) Lösung kultiviert. Die UW-Lösung war entweder mit Vehikel, Insulin oder einer Kombination aus Insulin und Insulin-like Growth Factor-Binding Protein (IGFbp) 4 supplementiert. Im Anschluss wurden die mikrovaskulären Fragmente auf Integra®-Scaffolds gesiedelt und in die Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen implantiert. Die Vaskularisierung der implantierten Scaffolds wurde über einen 14-tägigen Untersuchungszeitraum mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie sowie histologischer und immunhistochemischer Färbungen analysiert. Die Stimulation mikrovaskulärer Fragmente mit Insulin führte zu erhöhten Blutzellgeschwindigkeiten und Scherraten in den sich entwickelnden

Gefäßnetzwerken sowie zu einer höheren Gefäßdichte im Randbereich der Integra®-Scaffolds. Die Implantate mit den Insulin-behandelten mikrovaskulären Fragmenten wurden demzufolge auch besser in das Empfängergewebe inkorporiert. Im Zentrum der Scaffolds ließ sich jedoch lediglich eine marginal gesteigerte Gefäßdichte gegenüber den anderen beiden Gruppen nachweisen. Sämtliche Insulin-vermittelten Effekte konnten durch Zugabe von IGFbp4 blockiert werden. Zusammenfassend konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die Kultivierung mit Insulin zu einer IGF-1-vermittelten Steigerung des Angiogenesepotentials mikrovaskulärer Fragmente führt.

Insbesondere aus der Diabetesforschung sind für hohe Glukosekonzentrationen pro-angiogene Effekte bekannt. Aus diesem Grund wurde **im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Stimulation mit hochkonzentrierter Glukose die Vaskularisierungskapazität mikrovaskulärer Fragmente steigert. Hierzu wurden die mikrovaskulären Fragmente für 24 h in UW-Lösung, die mit Vehikel oder 30 mM Glukose supplementiert war, kultiviert. Nach deren Transfer auf Integra®-Scaffolds erfolgte die Implantation in die Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen. Analog zum ersten Teil der Arbeit wurde mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Histologie und Immunhistochemie die Vaskularisierung der Implantate analysiert. Darüber hinaus wurde *in vitro* die Morphologie der mikrovaskulären Fragmente mittels Rasterelektronenmikroskopie sowie die Expression angiogener Faktoren mittels eines Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese-Arrays untersucht.

Die Stimulation mit hochkonzentrierter Glukose führte zu einer gesteigerten Proliferation der Endothelzellen und perivaskulären Zellen der mikrovaskulären Fragmente. Außerdem konnte eine verbesserte Zellviabilität sowie eine erhöhte Expression pro-angiogener Proteine in Glukose-exponierten, mikrovaskulären Fragmenten nachgewiesen werden. Dies führte *in vivo* zu einer verbesserten Vaskularisierung und Gefäßnetzwerk-Ausreifung im Vergleich zu Kontrollen. Somit kann geschlussfolgert werden, dass hochkonzentrierte Glukose das Angiogenesepotential mikrovaskulärer Fragmente erheblich steigert, was in Zukunft wesentlich zur Verbesserung der Vaskularisierung von Scaffolds im Bereich des Tissue Engineerings eingesetzt werden könnte.



## 2 SUMMARY

The aim of tissue engineering is the generation of autologous tissue substitutes. For this purpose, the patient's own cells are seeded onto carrier matrices, also referred to as scaffolds, which are implanted into corresponding tissue defects. In order to subsequently supply the transferred cells with oxygen and nutrients, a rapid and adequate vascularization is of major importance. However, the angiogenesis-driven vascularization via the ingrowth of new blood vessels from the surrounding host tissue is a time-consuming process. Thus, the concept of prevascularization of scaffolds with adipose tissue-derived microvascular fragments has been established in recent years. Shortly after implantation, they interconnect through the process of inosculation with the vascular system of the recipient tissue, which markedly accelerates the overall process of vascularization of scaffolds.

Despite their excellent vascularization potential, the *in vivo* reassembly of microvascular fragments into a blood-perfused microvascular network still requires several days. Hence, new strategies that may accelerate this process have been investigated in the present thesis. Recent studies indicate that metabolic signals, such as insulin, initiate pro-angiogenic signaling cascades in adipose tissue. In particular, the release of insulin-like growth factor (IGF)-1 from adipocytes is thought to play a major role in this context. Therefore, **the first part** of the present thesis examined whether insulin leads to an increased vascularization capacity of microvascular fragments and whether this effect is mediated by IGF-1. For this purpose, microvascular fragments were isolated from the epididymal fat pads of donor mice and cultivated for 24 h in 4 °C University of Wisconsin (UW) solution. The UW solution was either supplemented with vehicle, insulin or a combination of insulin and insulin-like growth factor-binding protein (IGFbp) 4. Subsequently, the microvascular fragments were seeded onto Integra<sup>®</sup> scaffolds and implanted into dorsal skinfold chambers of C57BL/6 mice. The vascularization of the implanted scaffolds was analyzed over a 14-day observation period by means of intravital fluorescence microscopy as well as histological and immunohistochemical stainings. The stimulation of microvascular fragments with insulin increased centerline red blood cell velocities and wall shear rates in the developing microvascular networks as well as the microvessel density in the border zones of the Integra<sup>®</sup> scaffolds. In line with this, the insulin treatment of the

microvascular fragments resulted in an improved incorporation of the implants into the host tissue. However, only a slightly increased microvessel density could be detected in the center of the scaffolds when compared to the other two groups. All insulin-mediated effects were blocked by the addition of IGFbp4. Taken together, these findings demonstrate that cultivation with insulin results in an IGF-1-mediated increase of the angiogenic potential of microvascular fragments.

It is well known that high glucose concentrations exert pro-angiogenic effects. Therefore, **the second part** of the present thesis investigated whether the stimulation with high glucose increases the vascularization capacity of microvascular fragments. For this purpose, microvascular fragments were cultivated for 24 h in UW solution supplemented with vehicle or 30 mM glucose. Thereafter, they were transferred onto Integra® scaffolds, which were implanted into dorsal skinfold chambers of C57BL/6 mice. As in the first part of this thesis, the implants' vascularization was analyzed by means of intravital fluorescence microscopy, histology and immunohistochemistry. Moreover, the morphology of microvascular fragments was investigated *in vitro* by means of scanning electron microscopy and their expression of angiogenic factors was examined by means of a proteome profiler mouse angiogenesis array.

Stimulation with high glucose increased the proliferation of endothelial and perivascular cells within microvascular fragments. Furthermore, glucose-exposed microvascular fragments exhibited an improved cell viability as well as a higher expression of pro-angiogenic proteins. *In vivo*, this resulted in an enhanced vascularization and microvascular network maturation when compared to controls. Hence, it can be concluded that stimulation with high glucose significantly increases the angiogenic potential of microvascular fragments. Therefore, glucose treatment may represent a new approach to essentially improve the vascularization of scaffolds in future tissue engineering applications.

### 3 EINLEITUNG

Trotz großer Fortschritte in der modernen Medizin ist das Leben vieler Patienten heutzutage immer noch abhängig von der Verfügbarkeit geeigneter Spenderorgane bzw. Ersatzgewebe. Die limitierte Auswahl kompatibler Organ- und Gewebespender sowie die Notwendigkeit einer lebenslangen Immunsuppression stellen dabei die beiden größten Herausforderungen dar. Ein Lösungsansatz dieser Problematik ist der Einsatz von patienteneigenem Gewebe zur Rekonstruktion von Gewebedefekten. Von wesentlichem Vorteil ist hierbei das Ausbleiben von postoperativen Abstoßungsreaktionen durch den Organismus des Empfängers. Mit der optimalen Isolierung und Aufbereitung dieses autologen Spendergewebes beschäftigt sich das Forschungsgebiet des Tissue Engineerings.

#### 3.1 Tissue Engineering

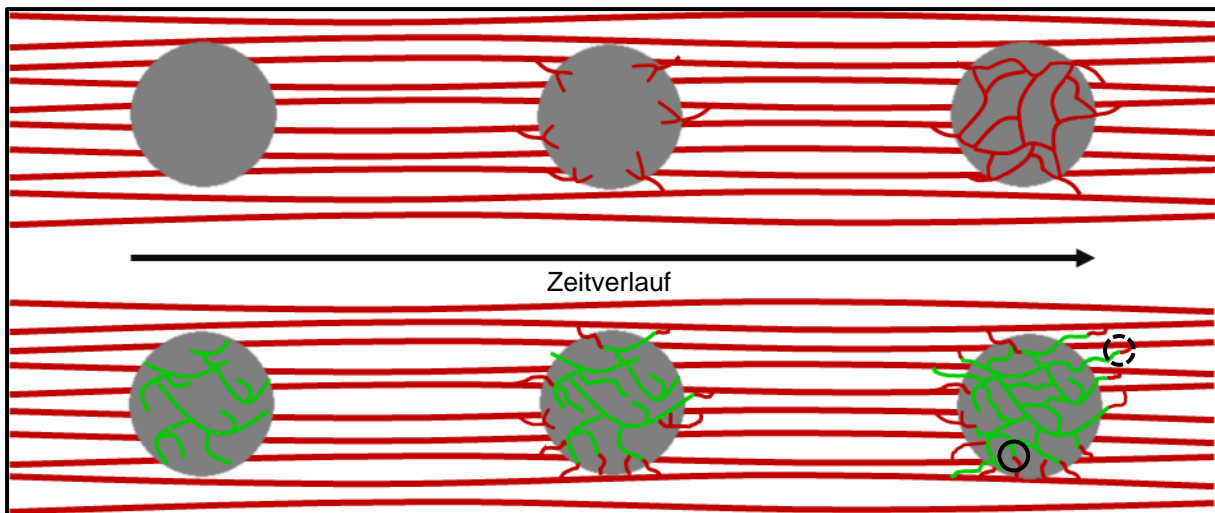
Das Tissue Engineering vereint die Kompetenzen aus Lebens-, Ingenieur- sowie Werkstoffwissenschaften mit dem Ziel der Generierung adäquater Surrogate für geschädigtes Gewebe [LANGER & VACANTI, 1993]. Die klassische Vorgehensweise des Tissue Engineerings umfasst die Isolierung patienteneigener Zellen mit anschließender Vermehrung in Kultur. Vor der darauffolgenden Implantation in geschädigtes Gewebe werden die Zellen auf dreidimensionale Trägermatrices gesiedelt. Diese Matrices werden auch als Scaffolds bezeichnet, sind häufig biologisch abbaubar und bieten idealerweise ein an die Anforderungen des jeweiligen Gewebes angepasstes extrazelluläres Milieu [CHEN & LIU, 2016].

Bei der Herstellung und Verwendung von Scaffolds können im Wesentlichen vier Strategien unterschieden werden [CHAUDHARI et al., 2016]. Diese umfassen zum einen die Herstellung von Hydrogelen, in welche Zellen eingebettet werden und so vor dem Immunsystem des Empfängergewebes geschützt sind. Demzufolge stehen solche Hydrogel-Scaffolds auch für allo- und xenogene Transplantationen zur Verfügung [ULUDAG et al., 2000; ORIVE et al., 2003]. Zum anderen werden Zellkulturplatten mit Zellen besiedelt, um auf diese Weise extrazelluläre Matrix als Scaffold-Material zu produzieren [TAKEZAWA et al., 1990] oder es werden Gewebe

dezellularisiert, um natürliche Extrazellulärmatrix als Scaffolds nutzen zu können. Dieser Ansatz wurde beispielsweise bereits zur Herstellung azellulärer Muskeltransplantate als Leitschiene für die axonale Regeneration peripherer Nervenverletzungen [HALL, 1997], für den Ersatz rupturierter vorderer Kreuzbänder [INGRAM et al., 2007] und für die Rekonstruktion von Herzklappen [KNIGHT et al., 2008] genutzt. Die vierte Strategie ist die Herstellung poröser Scaffolds aus unterschiedlichen Materialien [CHEVALIER et al., 2008]. Zu nennen sind hierbei Materialien natürlichen Ursprungs, wie Kollagen und Alginat, sowie synthetische Polymere, wie Polylactide oder Polyglykolsäure [KIM et al., 2000]. Ferner werden als synthetische Materialien bioaktive Keramiken, wie Tricalciumphosphat oder Hydroxylapatit sowie bioaktive Gläser, wie zum Beispiel 45S5 Bioglass<sup>®</sup>, eingesetzt [BOCCACCINI & BLAKER, 2005]. Um die positiven Eigenschaften mehrerer Materialien optimal auszunutzen, werden darüber hinaus verschiedene Werkstoffe miteinander kombiniert. Ein Beispiel dafür ist die dermale Ersatzmatrix Integra<sup>®</sup>, welche sich bereits in der klinischen Anwendung befindet und auch in der vorliegenden Arbeit als Scaffold-Material benutzt wurde. Integra<sup>®</sup> besteht aus Kollagen und Glykosaminoglykanen und wird für die Rekonstruktion größerer Hautdefekte verwendet. Auch in der experimentellen Forschung wird Integra<sup>®</sup> häufig als Scaffold für Fragestellungen im Bereich des Tissue Engineerings eingesetzt [FRUEH et al., 2017; SPÄTER et al., 2017].

Mit Zellen beladene Scaffolds werden nach der Implantation zunächst *per diffusionem* vom umgebenden Gewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Dabei darf der Abstand zum Kapillarbett des Empfängergewebes 150-200 µm nicht überschreiten, um den Zellmetabolismus aufrechtzuerhalten [AUGER et al., 2013]. Insbesondere dünne Gewebe, wie Haut, oder Gewebe mit geringem Nährstoffumsatz, wie Knorpel, konnten daher bereits in der Vergangenheit erfolgreich für die klinische Anwendung gezüchtet werden [KIM et al., 1994; LIU et al., 2007]. Für Implantate, deren Dimensionen über den notwendigen Diffusionsradius hinausgehen, ergibt sich allerdings das Problem der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Darüber hinaus ist in dickeren Implantaten der Abtransport von Zellabfällen sowie die Versorgung mit für die Regeneration essenziellen mesenchymalen Stammzellen gestört [LASCHKE & MENGER, 2015; WANG et al., 2013]. Daher ist eine rasche Vaskularisierung solcher Gewebekonstrukte eine wichtige Voraussetzung für ihr Überleben und ihre Funktion.

Im Bereich des Tissue Engineerings wurden deshalb in den vergangenen Jahren verschiedene Strategien zur Beschleunigung und Verbesserung der Vaskularisierung von Scaffolds entwickelt. Diese verfolgen im Wesentlichen zwei Hauptziele: Die Stimulation der Angiogenese im Empfängergewebe oder die Verbindung präformierter Gefäße in den Implantaten mit den Gefäßen des Empfängergewebes, was man auch als Inoskulation bezeichnet (*Abbildung 1*) [LASCHKE et al., 2009; LASCHKE & MENGER, 2015].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung von Angiogenese (oben) und Inoskulation (unten) zur Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte. Bei der Angiogenese erfolgt die Vaskularisierung des implantierten Gewebekonstrukts über einsprossende Gefäße aus dem Empfängergewebe (rote Gefäße). Um Inoskulation zu ermöglichen, muss zunächst ein präformiertes Gefäßnetzwerk (grün) im Implantat gebildet werden. Nach Implantation des prävaskularisierten Gewebekonstruktes in das Empfängergewebe bilden sich sowohl innerhalb (interne Inoskulation; schwarzer Kreis mit durchgängiger Linie) als auch außerhalb (externe Inoskulation; schwarzer Kreis mit gestrichelter Linie) des Implantats Querverbindungen zwischen den beiden Gefäßsystemen aus. Die Inoskulation bietet dabei den Vorteil, dass die Blutperfusion des Implantats wesentlich schneller erfolgt und somit die kritische Ischämiezeit im Vergleich zur Angiogenese deutlich reduziert wird.

Angiogenese ist definiert als die Entwicklung neuer Gefäße aus bereits existierenden Gefäßen [LIU et al., 2009]. Hierbei wird das Gewebe zur Neubildung von Gefäßsprossen stimuliert, die schrittweise in ein Implantat einwachsen [LASCHKE & MENGER, 2012]. Dabei kann die Vaskularisierung von Scaffolds bereits durch deren chemische Zusammensetzung grundlegend beeinflusst werden. So konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Hydrogel-Scaffolds im Vergleich zu Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA)-Scaffolds eine schwere Entzündungsreaktion verursachen. Dies führte zu einer verstärkten Apoptoserate mit verminderter Gefäßneubildung in den Hydrogel-Scaffolds [RÜCKER et al., 2006]. Daneben wird die Vaskularisierung von Scaffolds auch durch deren Matrixarchitektur beeinflusst. DRUECKE et al. [2004]

konnten beispielsweise zeigen, dass in Scaffolds mit großen Poren (250-300  $\mu\text{m}$ ) ein signifikant dichteres Gefäßnetzwerk ausgebildet wird als in Scaffolds mit einer Porengröße von lediglich 20-210  $\mu\text{m}$ .

Ein weiterer Ansatz zur Stimulation der Gefäßneubildung im Empfängergewebe ist der Einsatz von angiogenen Wachstumsfaktoren. So werden zum Beispiel Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [HE et al., 2011], basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) [GUAN et al., 2007; Zhao et al., 2009], Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) [LI et al., 2009] oder Hepatocyte Growth Factor (HGF) [NOMI et al., 2006] verwendet, um die Angiogenese und damit die Inkorporation von Implantaten in Gewebedefekten zu beschleunigen. Wachstumsfaktoren haben jedoch eine kurze Halbwertszeit und wirken bei Verwendung höherer Dosen oft toxisch. Eine Strategie, um dieser Problematik entgegenzuwirken, ist der Einsatz von Mikrosphären, welche kontinuierlich Wachstumsfaktoren an das Gewebe abgeben und somit die Wirkspiegel konstant halten [ELÇIN et al., 2001; PERETS et al., 2003; BORSELLI et al., 2010]. Darüber hinaus ist es mittlerweile möglich, die Vaskularisierung von Scaffolds durch Besiedlung mit mesenchymalen Knochenmark-Stammzellen zu verbessern [SCHUMANN et al., 2011]. Trotz der beschleunigten Angiogenese durch die genannten Methoden ist die Entstehung eines vollständig perfundierten Gefäßnetzwerks in den Implantaten noch immer ein zeitaufwändiger Prozess [LASCHKE & MENGER, 2012]. Insbesondere die natürliche Wachstumsrate der Gefäße von lediglich 5  $\mu\text{m}/\text{h}$  ist hierbei ein wesentlicher, limitierender Faktor [UTZINGER et al., 2015]. Entsprechend kommt es in den ersten Tagen nach Implantation zu hypoxischem Stress mit sequentiellm Zelltod innerhalb implantierter Gewebekonstrukte [LASCHKE & MENGER, 2016a].

Aus diesen Gründen wurde in den letzten Jahren vermehrt das Konzept der Prävaskularisierung verfolgt. Dabei werden in Scaffolds bereits vor Implantation präformierte Gefäße gezüchtet. Dies bietet den Vorteil, dass sich nach Implantation lediglich Verbindungen zwischen den einsprossenden Gefäßen aus dem Empfängergewebe und den präformierten Gefäßen innerhalb der Scaffolds ausbilden müssen, um zu einer rasch einsetzenden Perfusion zu führen.

Eine Prävaskularisierung kann über verschiedene Wege erreicht werden. Als *in vitro* Methoden stehen die Co-Kultivierung von Endothelzellen mit Myoblasten oder embryonalen Fibroblasten [LEVENBERG et al., 2005] sowie der Einsatz endothelialer Progenitorzellen [SHEPHERD et al., 2006] zur Verfügung. Diese Zellen lagern sich in

Scaffolds zu neuen Gefäßen zusammen. Dabei können Progenitorzellen entweder kontinuierliche Kapillaren wie im Skelettmuskel, diskontinuierliche Kapillaren wie in der Leber oder fenestrierte Kapillaren wie in den Glomeruli der Niere bzw. in endokrinen Drüsen ausbilden [NOLAN et al., 2013; PETERS, 2018]. Ein alternativer Ansatz ist die temporäre Implantation von Scaffolds in das Gewebe gut durchbluteter Körperregionen. Bei diesem *in situ* Verfahren erfolgt die Prävaskularisierung über das Einwachsen von Gefäßen aus dem Empfängergewebe. Erst nachdem sich ein dichtes mikrovaskuläres Netzwerk ausgebildet hat, wird das Implantat in den eigentlichen Gewebedefekt transferiert, wo es raschen Anschluss an das vaskuläre System findet [LASCHKE et al., 2008; KOKEMUELLER et al., 2010].

Die hier genannten Strategien zur Prävaskularisierung gehen jedoch mit komplexen, zeitintensiven Zellkulturtechniken bzw. mehrzeitigen chirurgischen Interventionen einher. Aus diesem Grund gestaltet sich der Transfer dieser Strategien in die klinische Praxis als bislang schwierig. Es wird daher zurzeit nach weiteren Möglichkeiten zur Prävaskularisierung von Gewebekonstrukten gesucht. Ein vielversprechendes Konzept ist hierbei der Einsatz von mikrovaskulären Fragmenten, welche aus Fettgewebe isoliert werden können.

### **3.2 Mikrovaskuläre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten**

Mikrovaskuläre Fragmente sind kurze Segmente von Arteriolen, Kapillaren und Venolen mit umgebenden glatten Muskelzellen und Perizyten [HOYING et al., 1996]. Nach ihrer Isolierung aus Fettgewebe können sie auf Scaffolds gesiedelt werden. Als Vaskularisierungseinheiten vereinen sie zahlreiche positive Aspekte der bereits erwähnten *in vitro* und *in situ* Methoden zur Prävaskularisierung von Scaffolds. So produzieren mikrovaskuläre Fragmente in Kultur pro-angiogene Faktoren und stimulieren somit ihr Wachstum gegenseitig [LASCHKE & MENGER, 2015; PILIA et al., 2014]. Daneben konnten MCDANIEL et al. [2014] zeigen, dass mikrovaskuläre Fragmente sowohl endotheliale Progenitorzellen als auch mesenchymale Stammzellen enthalten. Verglichen mit herkömmlich aus Fettgewebe isolierten Einzelstammzellen weisen diese Gefäß-assoziierten Zellen eine erhöhte proliferative Aktivität mit gesteigertem Potential zur Bildung von Gefäßnetzwerken auf [MCDANIEL et al., 2014]. Infolgedessen bilden mikrovaskuläre Fragmente nach *in vivo* Implantation rasch perfundierte Gefäßnetzwerke aus, indem sie sich untereinander und über

Inoskulation mit dem vaskulären System des Empfängergewebes verbinden [NAKANO et al., 1997].

Aus diesen Gründen wurde der Einsatz von mikrovaskulären Fragmenten bereits in unterschiedlichen Ansätzen erprobt. So konnten NAKANO et al. [1998] nachweisen, dass die Injektion von mikrovaskulären Fragmenten in Hautlappen ischämiebedingten Zelltod reduzieren und somit das Überleben des Gewebes verbessern kann. Auch im Zusammenhang mit kardialen Ischämien wurden mikrovaskuläre Fragmente in der Vergangenheit erfolgreich eingesetzt. Beispielsweise induzierten SHEPHERD et al. [2007] durch Ligatur der linken Koronararterie künstlich Myokardinfarkte im Mausmodell. Im Anschluss wurden mit mikrovaskulären Fragmenten beladene dreidimensionale Matrices auf das Epikard der Defektregion implantiert. Diese führten innerhalb des Versuchszeitraums zu einer geringeren Ausdehnung der Infarktzone mit verbesserter linksventrikulärer Pumpfunktion. Neben einer verbesserten Vaskularisierung von Ersatzgewebe für größere Muskeldefekte [PILIA et al., 2014] kann schließlich auch die Perfusion von transplantierten Langerhans'schen Inseln durch mikrovaskuläre Fragmente optimiert werden. So wurden von HISCOX et al. [2008] Kollagen-Gele mit mikrovaskulären Fragmenten prävaskularisiert und anschließend um ein zentrales Kollagen-Gel mit isolierten Inseln gelegt. Dies führte zu einem verbesserten Überleben der Inseln mit gesteigerter endokriner Funktion [HISCOX et al., 2008].

LASCHKE et al. [2012] besiedelten erstmalig poröse Polyurethan-Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten. Dabei konnten sie zeigen, dass die Vaskularisierung der Implantate signifikant verbessert wurde. Sowohl im Zentrum als auch im Randbereich der Implantate konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass die entstehenden mikrovaskulären Netzwerke überwiegend aus den eingesetzten Gefäßfragmenten stammten. Somit wurde nachgewiesen, dass diese in das umliegende Gewebe aussprossen, um dort mit dem vaskulären System des Empfängergewebes Anastomosen auszubilden [LASCHKE et al., 2012].

### **3.3 Metabolische Aktivierung mikrovaskulärer Fragmente**

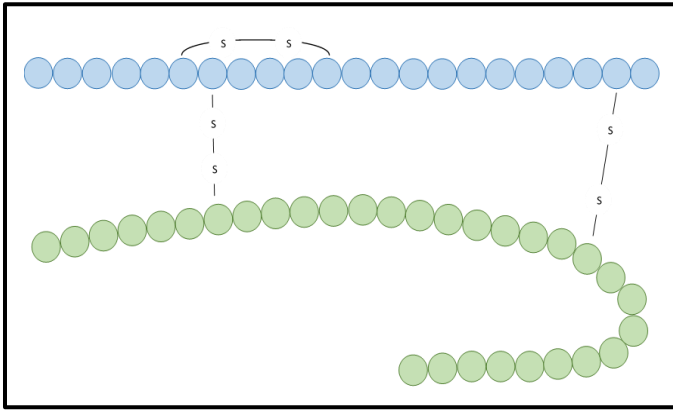
Trotz ihres vielversprechenden Vaskularisierungspotentials benötigen mikrovaskuläre Fragmente mehrere Tage, um sich zu einem neuen Gefäßnetzwerk zusammenzulagern [LASCHKE et al., 2012]. Dieser Prozess kann durch eine 24-



stündige *in vitro* Präkultivierungsperiode vor der Implantation beschleunigt werden. So konnten LASCHKE et al. [2019a] zeigen, dass hierbei die physiologische Gefäßmorphologie der mikrovaskulären Fragmente nicht beeinträchtigt wird. Weiterhin kann die angiogene Aktivität der mikrovaskulären Fragmente durch Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin (EPO) [KARSCHNIA et al., 2018] oder Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 [LASCHKE et al., 2019b] während dieser Präkultivierungsperiode signifikant gesteigert werden.

Interessanterweise weicht das Gefäßsystem im Fettgewebe bezüglich seiner angiogenen Stimulierbarkeit von anderen Gewebearten ab. So konnten HALBERG et al. [2009] nachweisen, dass hypoxischer Stress im Fettgewebe über Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF)-1 $\alpha$  nicht wie angenommen zu einer verbesserten Durchblutung, sondern vielmehr zu einer Fibrose führt. Demgegenüber regen insbesondere metabolische Signale infolge hochkalorischer Nahrungsaufnahme das Wachstum des Gefäßsystems im Fettgewebe an [CAO, 2013]. Der wahrscheinlichste Grund dafür ist, dass bei der Adipogenese das Gefäßsystem als Leitschiene dient. Dieses entsteht noch, bevor sich Fettzellen ausbreiten können [CHO et al., 2007]. Zum Zwecke einer ausreichenden Angiogenese enthält das Fettgewebe unter anderem multipotente weiße Fettzellen, welche nach entsprechender Stimulation zu Endothelzellen differenzieren können [JUMABAY et al., 2012]. Umgekehrt enthalten auch die Wände der Gefäße Progenitorzellen, welche bei Bedarf in weiße Fettzellen differenzieren können. Dieser Zelltypen-Switch ist bisher nur für das Gefäßsystem im Fettgewebe beschrieben [TANG et al., 2008].

Einer der wichtigsten metabolischen Signalvermittler im menschlichen Körper ist das Peptidhormon Insulin (*Abbildung 2*). Der aus 51 Aminosäuren aufgebaute Botenstoff besteht aus den zwei Peptidketten A und B, welche über zwei intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind [REDWAN et al., 2016]. Wesentlicher Auslöser für die Freisetzung von Insulin aus den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas ist eine erhöhte Blutglukosekonzentration. Dabei erfolgt bei Änderungen der Blutglukosekonzentration im Bereich von 3 – 20 mmol/l eine adaptierte Produktion und Sekretion des Hormons, wodurch eine rasche Anpassung auf Schwankungen des Blutzuckerspiegels gewährleistet wird [SCHUIT et al., 1999]. Neben den klassischen anabolen Effekten auf Kohlenhydrat- und Proteinmetabolismus wirkt sich Insulin auch entscheidend auf den Stoffwechsel des Fettgewebes aus. So steigert es die Synthese von Fettsäuren und Triacylglyceriden



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Primärstruktur von Insulin mit der A-Kette (blau) aus 21 Aminosäuren und der B-Kette (grün) aus 30 Aminosäuren. Jeder Kreis verkörpert eine Aminosäure, wobei die Aminosäuren Cystein jeweils über zwei inter- und eine intramolekuläre Disulfidbrücke miteinander kovalent verbunden sind.

bei gleichzeitiger Reduzierung der Lipolyse-Rate. Darüber hinaus bewirkt Insulin eine erhöhte Aufnahme von Triglyceriden aus dem Blut in das Fettgewebe sowie eine Verminderung der  $\beta$ -Oxidation in Muskel und Leber [DIMITRIADIS et al., 2011]. Das Peptidhormon ist zudem wichtig für das Wachstum des Gefäßsystems im Fettgewebe. So konnten WALTON et al. [2015] nachweisen, dass aerobes

Training bei Insulin-resistenten Probanden zwar im Muskelgewebe zu einer gesteigerten Angiogenese mit konsekutiv dichterem Gefäßnetzwerk führt, nicht aber im Fettgewebe. Als Kontrollgruppe dienten hierbei Insulin-sensitive Patienten, bei denen nach aerobem Training in beiden Gewebearten eine gesteigerte Angiogenese nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren zeigten GEALEKMAN et al. [2014], dass sowohl der Insulin-Sensitizer Rosiglitazon sowie eine direkte Behandlung mit Insulin eine pro-angiogene Wirkung auf das Fettgewebe haben, welche über IGF-1 vermittelt wird. Der Effekt von Insulin und IGF-1 kann dabei durch Insulin-like Growth Factor-Binding Protein (IGFbp) 4 antagonisiert werden. **Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft, ob durch Stimulation mit Insulin eine Verbesserung des Vaskularisierungspotentials mikrovaskulärer Fragmente aus Fettgewebe erzielt werden kann. Außerdem wurde untersucht, ob die potentielle Wirkung von Insulin durch IGFbp4 blockiert werden kann.**

Darüber hinaus ist das Monosaccharid Glukose ein wichtiger metabolischer Stimulus im menschlichen Körper. Wie bereits ausgeführt, stehen Insulin- und Blutglukosekonzentration in direktem, physiologischem Zusammenhang. Das Monosaccharid ist dabei die grundlegendste Energiequelle des Menschen, wobei einige Zellen, wie die des Gehirns [BREKKE et al., 2015], Erythrozyten [JÄGERS et al., 2018] sowie die Zellen des inneren Nierenmarks [CHEN et al., 2017] auf Glukose als

einzig verwertbaren Energieträger angewiesen sind. Zudem sind hohe Glukosekonzentrationen ein wesentlicher Stimulus für die Initiierung zellulärer Proliferation sowie die Produktion von Extrazellulärmatrix [HAN et al., 2015; SONG et al., 2016; ZHANG et al., 2017]. Im Kontext der vorliegenden Arbeit besonders hervorzuheben sind außerdem angiogene Prozesse in verschiedenen Körpergeweben, welche durch Glukose induziert werden. So erhöht sich bei Diabetes-Patienten während der Glukose-Oxidation im Verlauf der Zellatmung die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dies ist insbesondere für die retinalen Endothelzellen des Auges [SANTIAGO et al., 2018] und die Glomeruli der Niere [LU et al., 2019] beschrieben. ROS induzieren wiederum eine pathologische Angiogenese in den genannten Organen [WILKINSON-BERKA et al., 2013]. Die Auswirkungen einer diabetischen Stoffwechsellage wurden in früheren Studien vorwiegend an retinalen Endothelzellen erforscht. Diese Zellen zeigten nach Behandlung mit hohen Glukosekonzentrationen eine gesteigerte Proliferation und Migration [BETTS-OBREGON et al., 2016; QIU et al., 2018; SHI et al., 2019]. **Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft, ob eine Behandlung mit hochkonzentrierter Glukose das Vaskularisierungspotential mikrovaskulärer Fragmente verbessert.**

Für die Untersuchungen wurden mikrovaskuläre Fragmente aus dem Nebenhodenfettgewebe von Spendermäusen isoliert und anschließend für 24 h bei 4 °C in UW-Lösung kultiviert. **Im ersten Studienabschnitt** war die UW-Lösung entweder mit Vehikel (Kontrolle), Insulin oder Insulin + IGFbp4 supplementiert. Nachfolgend wurden die Gefäßfragmente auf Integra<sup>®</sup>-Scaffolds gesiedelt und in die Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen implantiert. In diesen wurde mittels repetitiver intravitale Fluoreszenzmikroskopie die Vaskularisierung der Implantate analysiert. Nach 14 Tagen wurden zudem histologische und immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um eine detaillierte Analyse der mikrovaskulären Netzwerke innerhalb der Implantate durchführen zu können. **Im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit wurde die UW-Lösung entweder mit Vehikel (Kontrolle) oder Glukose supplementiert. Die *in vivo* Untersuchungen wurden analog zum ersten Studienabschnitt durchgeführt. Daneben gaben *in vitro* Analysen Aufschluss über eine potentiell veränderte Morphologie, Proteinexpression, Viabilität und Proliferation Glukose-behandelter mikrovaskulärer Fragmente im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen.

## 4 ZIEL DER STUDIE

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, das Vaskularisierungspotential mikrovaskulärer Fragmente zu verbessern. **Im ersten Studienabschnitt** wurde untersucht, ob eine Behandlung mikrovaskulärer Fragmente mit Insulin die Vaskularisierung und Inkorporation von prävaskularisierten Integra®-Scaffolds über den IGF-1 Signalweg beschleunigen kann. Dabei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Verbessert eine Behandlung mit Insulin das *in vivo* Vaskularisierungspotential mikrovaskulärer Fragmente?
2. Kann der potentielle Effekt einer Insulin-Behandlung auf mikrovaskuläre Fragmente durch Zugabe von IGFbp4 blockiert werden?

**Im zweiten Studienabschnitt** wurde analysiert, inwieweit die Behandlung mikrovaskulärer Fragmente mit hochkonzentrierter Glukose-Lösung die Vaskularisierung und Inkorporation prävaskularisierter Integra®-Scaffolds verbessern. Dabei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Beeinträchtigt eine Glukose-Exposition die physiologische Morphologie mikrovaskulärer Fragmente?
2. Verbessert eine Behandlung mit Glukose die Proteinexpression sowie die Zellviabilität und Zellproliferation in mikrovaskulären Fragmenten?
3. Verbessert eine Behandlung mit Glukose das *in vivo* Vaskularisierungspotential mikrovaskulärer Fragmente?

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Versuchstiere

Alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an Mäusen aus eigener Zucht (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) durchgeführt. Die epididymalen Fettpolster für die Isolierung der mikrovaskulären Fragmente wurden aus männlichen, transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J Mäusen bzw. C57BL/6 Wildtyp-Mäusen gewonnen. Das Alter der Tiere betrug 6-12 Monate. Darüber hinaus wurden ausschließlich Tiere mit einem Körpergewicht > 30 g verwendet, um eine ausreichende Menge an Fett gewinnen zu können. Zur Implantation der Rückenhautkammern dienten ebenfalls C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, welche 3-4 Monate alt waren und 22-28 g wogen. Den gesamten Versuchszeitraum über wurden die Tiere in einem klimatisierten Raum mit zwölfstündigem Tag-/Nacht-Zyklus bei freiem Zugang zu Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) sowie Leitungswasser *ad libitum* gehalten. Die Unterbringung der Kammertiere erfolgte in Einzelkäfigen.

Sämtliche Tierversuche wurden gemäß dem nationalen Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt (Genehmigungsnummer: 29/2014) und entsprechend der europäischen Richtlinie zum Tierschutz (Direktive 2010/63/EU) und den NIH Leitlinien zum Schutz und zur Verwendung von Labortieren durchgeführt (NIH Publication #85-23 Rev. 1985).

### 5.2 Experimentelles Modell

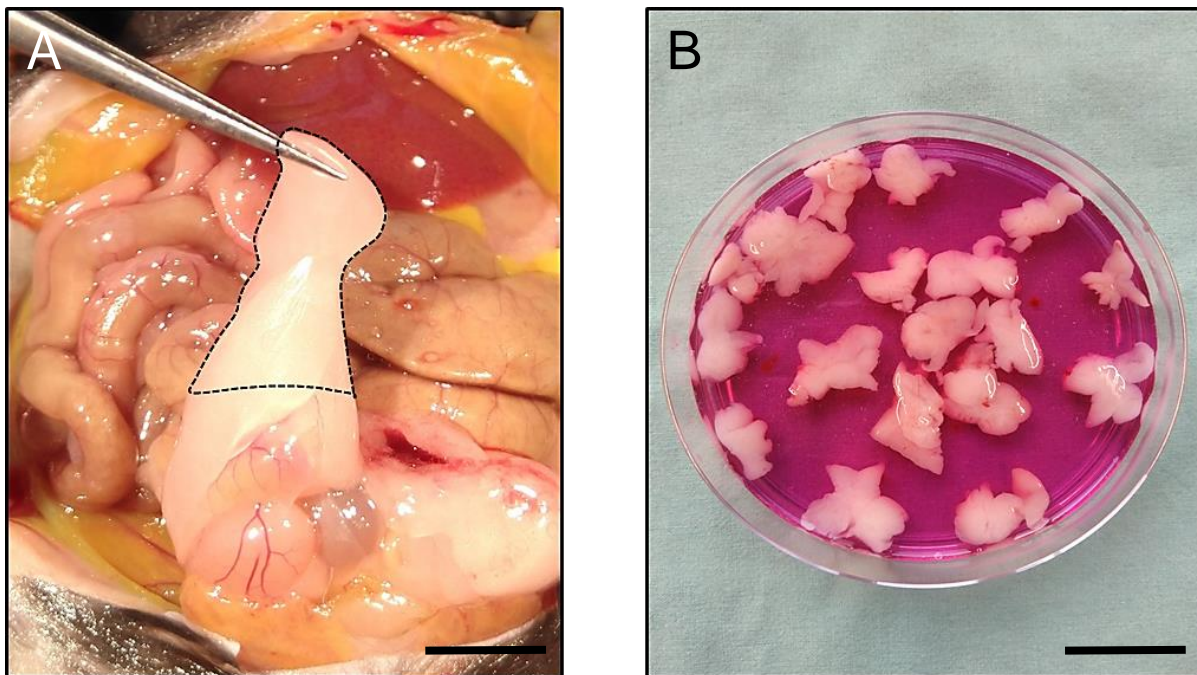
#### 5.2.1 Isolierung mikrovaskulärer Fragmente

In der vorliegenden Arbeit wurden die mikrovaskulären Fragmente zur Besiedlung von Integra<sup>®</sup>-Scaffolds aus dem epididymalen Fettgewebe von transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J Spendertieren gewonnen. Diese transgene Mauslinie wurde unter der Kontrolle eines Huhn- $\beta$ -Aktin-Promotors und Zytomegalievirus-Enhancers mit einer cDNA transfiziert, welche das Green Fluorescent Protein (GFP) der Quallenart *Aequorea victoria* kodiert [OKABE et al., 1997]. Somit war es möglich,

die untersuchten mikrovaskulären Fragmente durch immunhistochemische Färbung und unter Anregung mit blauem Licht der Wellenlänge 488 nm zu identifizieren. Entsprechend konnte zwischen den GFP<sup>+</sup> mikrovaskulären Fragmenten der Spendertiere und den GFP<sup>-</sup> Blutgefäßen des Empfängergewebes unterschieden werden.

Zur Isolierung der mikrovaskulären Fragmente wurden die Spendermäuse zunächst durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht; Ursotamin<sup>®</sup>, Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) sowie Xylazin (12 mg/kg Körpergewicht; Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert und in Rückenlage unter einem Stereo-Operationsmikroskop (Leica M651, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) fixiert. Anschließend wurde der Bauch mit 70 % Ethanol desinfiziert und durch eine mediane Laparotomie eröffnet.

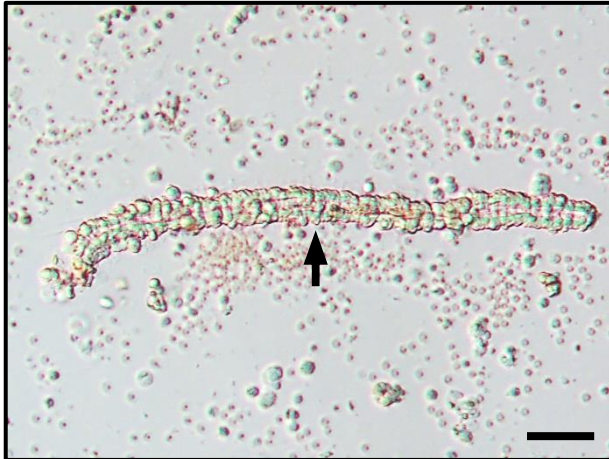
Das Nebenhodenfettgewebe konnte nun beidseits dargestellt (*Abbildung 3A*) und entnommen werden, wobei insbesondere darauf geachtet werden musste, den Darm nicht zu verletzen, um eine bakterielle Kontamination des Fettgewebes zu vermeiden. Schließlich wurden die Resektate in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gründlich gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung in 10 % Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin;



**Abbildung 3:** **A:** Operationssitus einer GFP<sup>+</sup> Spendermaus. Das im Anschluss exzidierte Nebenhodenfettgewebe ist mit gestrichelter Linie umrandet. **B:** Nebenhodenfettgewebe aus mehreren Spendertieren nach Transfer in DMEM. Maßstab: A: 9 mm; B: 2 cm.

Biochrom, Berlin, Deutschland) transferiert (*Abbildung 3B*). Das Spendertier wurde im Anschluss an die Prozedur mittels Inzision der Bauchaorta getötet.

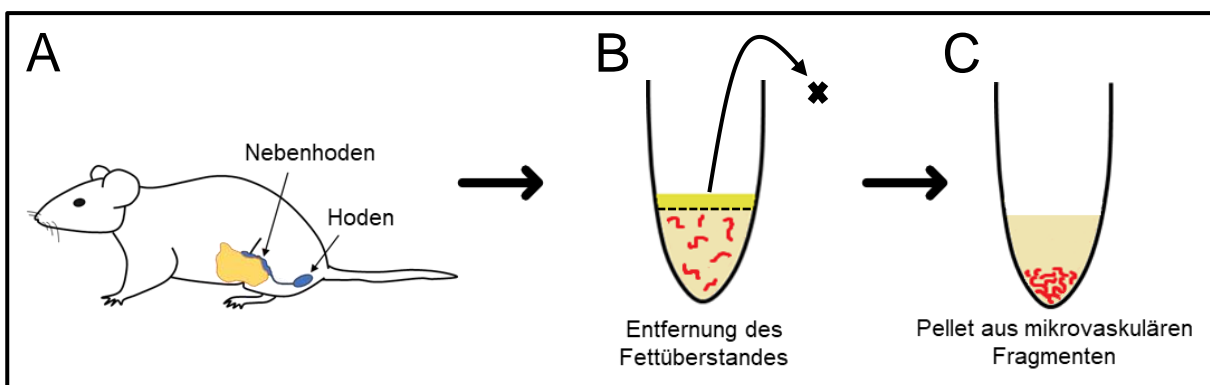
Nach erneutem dreimaligem Waschen des Nebenhodenfettgewebes in PBS wurde dieses mithilfe einer Mikroschere zerkleinert. Im Anschluss wurde es mit zwei



**Abbildung 4:** Durchlichtmikroskopie eines mikrovaskulären Fragments (Pfeil) direkt nach enzymatischer Freisetzung aus dem Nebenhodenfettgewebe einer Spendermaus. Maßstab: 14  $\mu\text{m}$ .

zum Fettvolumen äquivalenten Volumina an Kollagenase NB4G (0,5 U/ml; Serva, Heidelberg, Deutschland) 9 Minuten lang verrührt, sodass die entstandene Suspension das dreifache Volumen des ursprünglichen Fettgewebes hatte. Dieser Prozess wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator durchgeführt und resultierte in der Digestion der Fettzellen, wodurch sich die mikrovaskulären Fragmente nun frei in der Suspension

befanden (*Abbildung 4*). Im Anschluss daran wurde das Enzym mit zwei Volumina an PBS + 20 % fetalem Kälberserum (FKS) neutralisiert. Um unverdaute Fettklumpchen zu entfernen, wurde die Suspension durch einen Filter der Porengröße 500  $\mu\text{m}$  (pluriSelect Life Science, Leipzig, Deutschland) filtriert. Die entstandene Suspension wurde für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die mikrovaskulären Fragmente per Schwerkraft von dem freien Fett zu trennen. Nach dem vorsichtigen Abpipettieren des Fettüberstandes (*Abbildungen 5A und B*) wurde dieser Zyklus so lange wiederholt, bis



**Abbildung 5:** Schematischer Überblick über den Isolierungsprozess der mikrovaskulären Fragmente: **A:** Skizzierung der Lage des Nebenhodenfettgewebes innerhalb der Spendermaus. **B:** Die mikrovaskulären Fragmente werden durch enzymatische Verdauung aus dem Fettgewebe freigelegt und der Fettüberstand im Anschluss sorgfältig abpipettiert. **C:** Durch Zentrifugation können viele Fragmente in einem Pellet angereichert werden.

das Fett vollständig aus der Suspension entfernt war. Die finale Zellsuspension wurde nachfolgend über 5 min bei 120 x *g* zentrifugiert, sodass die mikrovaskulären Fragmente in einem Pellet angereichert werden konnten (*Abbildung 5C*). Schließlich erfolgte eine Resuspension in PBS + 20 % FKS, um einer Verklebung der Fragmente vorzubeugen.

### 5.2.2 Kultivierung mikrovaskulärer Fragmente

In den beiden Studienabschnitten der vorliegenden Arbeit wurden die isolierten mikrovaskulären Fragmente wie folgt behandelt:

**Im ersten Studienabschnitt** wurden die Effekte von Insulin auf die mikrovaskulären Fragmente untersucht. Hierzu wurden unmittelbar nach der Isolierung die mikrovaskulären Fragmente zu gleichen Teilen drei Gruppen zugeordnet. Diese wurden im Anschluss für 24 h unter konstanten atmosphärischen Bedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) in einer 24-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) in 4 °C UW-Lösung (Belzer UW Cold Storage Solution, Bridge to Life Ltd., Columbia, SC, USA) kultiviert. Die UW-Lösung wurde entweder mit Vehikel (Kontrolle; PBS), 1 µM Insulin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) oder 1 µM Insulin + 0,5 µg/ml IGFbp4 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) supplementiert. Am Ende der 24-stündigen Kultivierungsperiode wurden die vorbehandelten mikrovaskulären Fragmente in PBS gewaschen, bevor sie in weiteren *in vivo* Experimenten verwendet wurden.

**Im zweiten Studienabschnitt** wurde der Effekt einer hohen Glukose-Konzentration auf mikrovaskuläre Fragmente analysiert. Die isolierten mikrovaskulären Fragmente wurden hierzu analog zum ersten Studienabschnitt kultiviert. Die Aufteilung erfolgte in eine Kontrollgruppe mit PBS-behandelten mikrovaskulären Fragmenten sowie in eine Gruppe, in der die Fragmente in UW-Lösung mit 30 mM Glukose (high glucose; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert wurden. Zuletzt wurden auch im zweiten Studienabschnitt die mikrovaskulären Fragmente in PBS gewaschen, bevor sie in zusätzlichen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen verwendet wurden.



### 5.2.3 Proteinexpression mikrovaskulärer Fragmente

Um sowohl die Hoch- als auch Herunterregulation von Angiogenese-assoziierten Proteinen innerhalb der mikrovaskulären Fragmente beurteilen zu können, wurde **im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit ein Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese-Array (R&D Systems) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurde das Nebenhodenfettgewebe von 20 GFP<sup>-</sup> C57BL/6 Wildtyp-Mäusen extrahiert, in zwei gleich große Teile aufgeteilt und gemäß der oben genannten Systematik entweder in 30 mM Glukose- oder Vehikel-supplementierter UW-Lösung für 24 h kultiviert. Zum Zwecke der Proteinextrahierung wurden die mikrovaskulären Fragmente mithilfe eines Lysepuffers (10 mmol/l Tris pH 7,5, 10 mmol/l NaCl, 0,1 mmol/l EDTA, 0,5 % Triton-X 100, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 0,2 mmol/l PMSF, Protease-Inhibitor Mischung 1:1,75 vol. %, Phosphatase-Inhibitor Mischung 1:100 vol. %; Sigma-Aldrich) homogenisiert. Nachdem die entstandene Suspension für 30 min auf Eis inkubiert wurde, folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 16.000 x g für weitere 30 min. Aus dem resultierenden Überstand wurden pro Versuchsgruppe 250 µg Protein für weitere Analysen verwendet.

Zur Detektion von löslichen Wachstumsfaktoren, membrangebundenen Rezeptoren, Differenzierungsfaktoren, intrazellulären Signalmolekülen und Matrixkomponenten diente eine Lösung von insgesamt 53 biotinylierten Antikörpern, welche für 1 h bei Raumtemperatur mit den Proteinproben inkubiert wurde. Die entstandene Protein-Antikörper-Mischung wurde nachfolgend über Nacht bei 4 °C an einer Fänger-Antikörper-Array-Membran inkubiert und konnte anschließend durch eine mittels Streptavidin-Meerrettichperoxidase-katalysierte Reaktion anhand von Chemolumineszenz-fähigen Substraten visualisiert werden. Die gebundene Menge an Proteinen konnte schließlich durch einen Intas ECL Chemocam Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) quantifiziert werden. Die prozentuale Änderung der Proteinexpression der Glukose-behandelten Gruppe wurde in Relation zur Kontrollgruppe angegeben.

### 5.2.4 Herstellung prävaskularisierter Integra<sup>®</sup>-Scaffolds

Aus Kollagen und Glykosaminoglykanen bestehende Integra<sup>®</sup>-Scaffolds dienten als Matrix für die Beladung mit mikrovaskulären Fragmenten. Diese Scaffolds wurden aus

einem Integra® Dermal Regeneration Template Single Layer ohne Silikonschicht (Integra Life Sciences, Ratingen, Deutschland) mittels Biopsiestanze (Kai Europe GmbH, Solingen, Deutschland) ausgestanzt und hatten somit bei einer Höhe von 1,3 mm einen einheitlichen Durchmesser von 3,0 mm. Dieselben Kollagen-Glykosaminoglykan-Matrices werden seit geraumer Zeit in der chirurgischen Behandlung von Schwerbrandverletzten sowie in der plastischen Chirurgie eingesetzt und dienen hierbei der Deckung großflächiger Hautdefekte. Die Kollagenfasern fungieren dabei als Leitschiene für die Migration von Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und Kapillaren aus dem Wundbett. Hieraus resultiert der Aufbau von neuem, körpereigenem Gewebe, während die implantierte Matrix innerhalb von ca. 30 Tagen abgebaut wird [SHAHROKHI et al., 2014].

Nach der 24-stündigen Kultivierung wurden die mikrovaskulären Fragmente auf die Integra®-Scaffolds gesiedelt. Die Scaffolds wurden hierfür auf einem 500 µm-Sieb (pluriSelect Life Science) positioniert. Anschließend wurden die Gefäßfragmente in 10 µl PBS resuspendiert und mittels einer 100 µl-Pipette (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) auf die Scaffold-Oberfläche transferiert. Damit die mikrovaskulären Fragmente sich über das gesamte Scaffold-Volumen verteilen, wurde mithilfe einer 1 ml-Spritze (BD Plastipak; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) ein Unterdruck auf der Scaffold-Unterseite erzeugt.

### 5.2.5 Morphologie mikrovaskulärer Fragmente

Eine Kooperation mit dem unfallchirurgischen Forschungslabor des Universitätsklinikums des Saarlandes unter Leitung von Herrn Dr. Wolfgang Metzger ermöglichte **im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit die morphologische Analyse prävaskularisierter Integra®-Scaffolds mittels Raster-elektronenmikroskopie (REM).

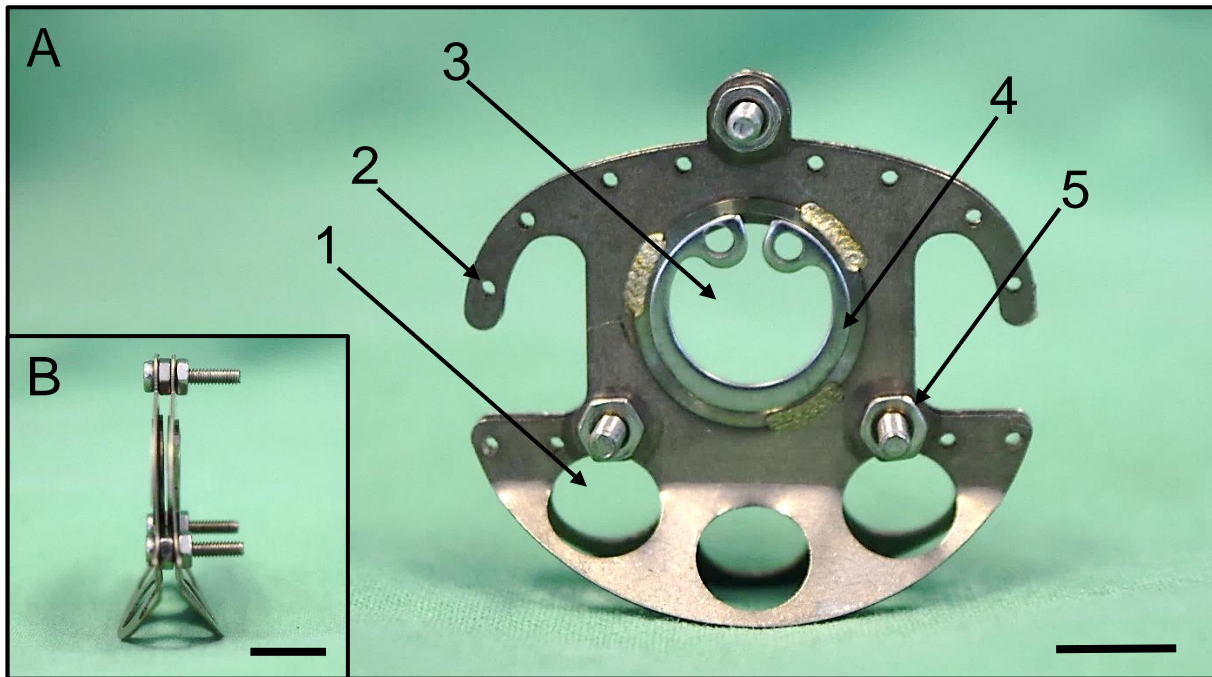
Zur Vorbereitung für die REM wurden die Proben bei Raumtemperatur und unter leichter Bewegung mit 2 % Glutardialdehyd (Science Services GmbH, München, Deutschland) in 0,1 M Natriumkacodylat-Puffer (pH 7,4; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Im Anschluss wurde das Fixiermittel unter dreimaliger Waschung für jeweils 10 min mit 0,1 M Natriumkacodylat-Puffer entfernt und nachfolgend einer einstündigen Dunkelkammer-Inkubation in Osmiumtetroxid (1 vol. % in 0,2 M Natriumkacodylat-Puffer; Science Services GmbH) unterzogen. Danach

wurden die Proben viermal zu je 10 min in deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) gereinigt. Im folgenden Schritt konnten die besiedelten Scaffolds durch Inkubation in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70, 80, 90, 96, 100 vol. %) von dH<sub>2</sub>O gereinigt werden. Mittels einer 1:2 Mischung aus 100 vol. % Ethanol und Hexamethyldisilazan (HDMS; Carl Roth GmbH & Co. KG) sowie anschließend reinem HDMS wurde der Dehydratationsprozess abgeschlossen. Schließlich wurden die Proben mit HDMS benetzt, welches über Nacht in eine Abzugshaube abdampfen konnte. Am darauffolgenden Tag wurden die vollständig dehydrierten Proben auf eine leitende Kohlenstoffoberfläche (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) transferiert und dort dreimal für je 1 min mit Gold (Sputter Coater SC 7640; Quorum Technologies (Polaron), Ontario, Kanada) bestäubt, um eine für die Elektronenmikroskopie benötigte elektrische Leitfähigkeit zu erzeugen. Schlussendlich erfolgte die Analyse der Morphologie prävascularisierter Integra<sup>®</sup>-Scaffolds mittels eines FEI XL 30 ESEM FEG Geräts (FEI, Hillsboro, OR, USA) im Secondary Electron-Modus.

### 5.2.6 Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer

Zur Analyse des Vaskularisierungspotentials mikrovaskulärer Fragmente kam das Modell der Rückenhautkammer (*Abbildungen 6A und B*) zur Anwendung.

Bereits 1924 wurde von SANDISON [1924] eine transparente Kammer entwickelt, welche die Untersuchung von Zellen am Kaninchenohr ermöglichte. Fast zwei Dekaden später wurde dieses Kammerkonzept von ALGIRE [1943] auf die Rückenhaut von Kleinsäugetieren übertragen. Nachdem die Mikrozirkulation zunächst mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie in der Rückenhautkammer von Hamstern analysiert wurde [ENDRICH et al., 1980], ist es aufgrund fortschreitender Verbesserung der Operationstechniken und Kammermaterialien mittlerweile möglich, entsprechende Untersuchungen auch an der Maus durchzuführen [LEHR et al., 1993]. Die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen in den retrobulbären Venenplexus erlaubt hierbei die Darstellung des Gefäßnetzwerks innerhalb des quergestreiften Hautmuskels sowie in der Kammer befindlicher Transplantate und Implantate. Hervorzuheben ist insbesondere die Möglichkeit, Untersuchungen über einen Zeitraum von bis zu zwei Wochen repetitiv *in vivo* durchzuführen, was zur Analyse angiogener Prozesse von großem Vorteil ist.



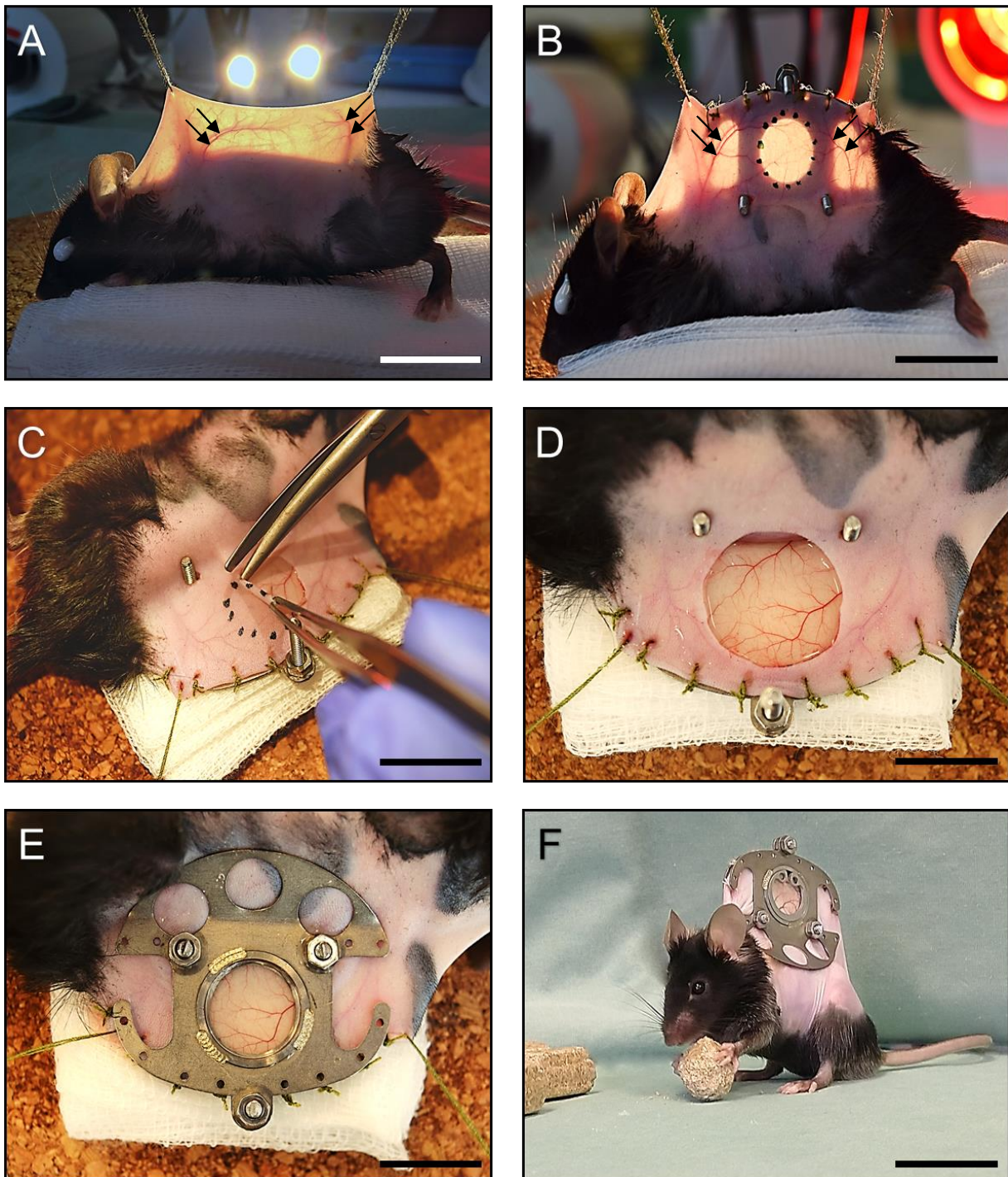
**Abbildung 6:** Aus zwei symmetrischen Titanrahmen zusammengesetzte Rückenhautkammer (Gewicht: 2,2 g) für die Maus. **A:** Vorderansicht; 1: Materialausparung zur Gewichtsreduktion; 2: Bohrung für Haltefäden; 3: Beobachtungsfenster mit Deckglas; 4: Sprengring zur Fixierung des darunterliegenden Deckglases; 5: Verbindungsschraube mit Mutter; **B:** Seitansicht. Maßstab: A: 7,5 mm; B: 8 mm.

### 5.2.7 Präparation der Rückenhautkammer

Um mit der Präparation der Rückenhautkammer zu beginnen, wurden die Mäuse zunächst mittels i.p. Injektion von Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht; Ursotamin®) sowie Xylazin (12 mg/kg Körpergewicht; Rompun®) in Narkose versetzt. Anschließend erfolgte die Entfernung des Rückenfalls der Tiere unter Zuhilfenahme eines Elektrorasierers (Isis GT420; Aesculap®, Tuttlingen, Deutschland) und chemischer Depilation der Haaransätze mit medizinischer Enthaarungscreme (Asid®-med Enthaarungscreme; Asid Bonz, Böblingen, Deutschland). Als Nächstes wurde die Rückenhaut mit einem Spatel von der Creme befreit und unter 37 °C warmem Wasser gründlich gesäubert, um entzündlichen Irritationen durch Rückstände der Enthaarungscreme vorzubeugen. Die Tiere wurden schließlich in Bauchlage gelagert und die enthaarte Haut mit 70 % Alkohol desinfiziert, bevor mit der eigentlichen Präparation begonnen werden konnte.

Zunächst wurde eine Hautfalte am Rücken hochgezogen, welche cranial und caudal mit jeweils einem Haltefaden so fixiert wurde, dass zu- und abführende Hauptgefäßstämme unter Gegenlichtkontrolle kongruent zur Darstellung kamen (Abbildung 7A). Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die aus zwei

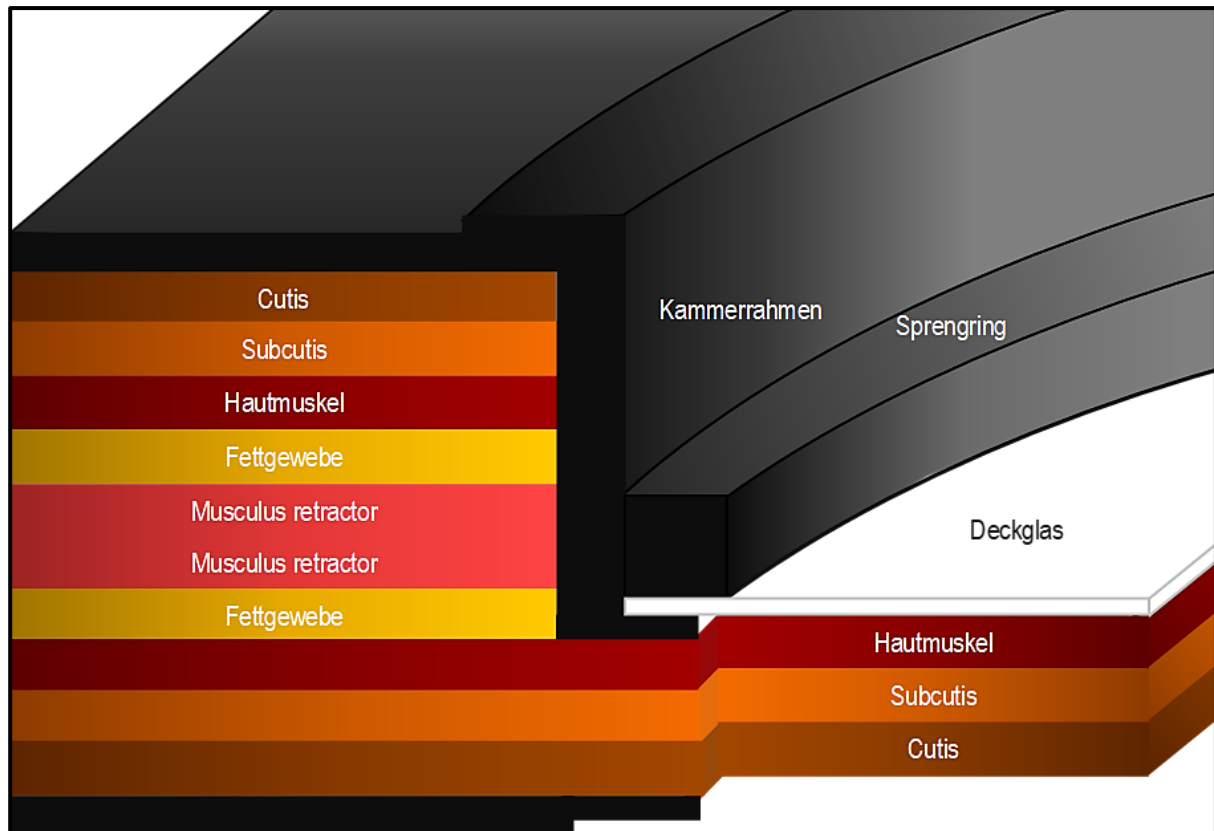
symmetrischen Titanrahmen (Irola Industriekomponenten GmbH & Co. KG, Schonach, Deutschland) zusammengesetzte Rückenhautkammer entlang der Rückenmittellinie



**Abbildung 7:** **A:** Cranial und caudal an Haltefäden fixierte Rückenhautfalte einer anästhesierten C57BL/6 Maus. Die Hauptgefäßstämme kommen unter Gegenlichtkontrolle kongruent zur Darstellung (Pfeile in A und B). **B:** Nach Implantation des hinteren Rückenhautkammerrahmens kann das zu exzidierende Hautgewebe markiert werden. **C:** Resektion der Cutis, Subcutis mit dazugehörigem Unterhautmuskel und den beiden Schichten des Musculus retractor im Bereich des späteren Beobachtungsfensters. **D:** Der im Anschluss an die Präparation zum Vorschein kommende quergestreifte Hautmuskel der gegenüberliegenden Seite wird kontinuierlich mit physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten, um eine Austrocknung des Gewebes zu verhindern. **E:** Komplettierung der Rückenhautkammer durch Montage des vorderen Kammerrahmens. **F:** Nach der Implantation zeigen die Tiere ein normales Fress- und Orientierungsverhalten. Maßstab: A: 2,8 cm; B: 2,3 cm; C: 1,8 cm; D: 1,3 cm; E: 1,4 cm; F: 3,2 cm.

befestigt wurde. Die dem Operateur abgewandte Seite der Rückenhautkammer wurde nachfolgend mit 5-0 Seidenfäden am oberen Rand der Hautfalte fixiert. Zudem wurden zwei Inzisionen mittels Skalpell präpariert, welche als Durchtrittsstellen für die beiden unteren Schrauben des Kammerrahmens dienten. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die beiden Hauptgefäßstämme unverletzt blieben. Bevor die Haltefäden durchtrennt und das Tier in Seitenlage positioniert werden konnte, wurde unter Gegenlichtkontrolle die Stelle des späteren Beobachtungsfensters markiert (Skin-Marker, Ratiomed®, Lilienthal, Deutschland) (*Abbildung 7B*).

Mithilfe eines Stereo-Operationsmikroskops (Leica M651, Leica Microsystems) konnte nun unter Verwendung mikrochirurgischer Instrumente das vorher markierte Gewebe exzidiert werden (*Abbildung 7C*). Hierfür wurden die vorderseitige Hautschicht mit dazugehöriger Subcutis und quergestreiftem Hautmuskel sowie die beiden Retraktormuskelschichten entfernt (*Abbildung 8*). Von essenzieller Bedeutung war in diesem Operationsschritt, dass der Durchmesser des abpräparierten Gewebes (~ 15 mm) größer war als der des späteren Beobachtungsfensters (~ 11 mm), damit nach Aufbringen des zweiten Kammerrahmens eine Kompression des umliegenden



**Abbildung 8:** Schematischer Überblick über die Gewebeschichten der Rückenhautfalte (links) und der Rückenhautkammerpräparation (rechts). Das Deckglas schützt das darunterliegende Gewebe und wird über einen Sprengling im Kammerrahmen fixiert.

Gewebes und somit eine mangelhafte Blutversorgung des Gewebes innerhalb des Beobachtungsfensters vermieden werden konnte. Während der Exzision der zweiten Schicht des Retraktormuskels war es außerdem wichtig, den darunterliegenden Hautmuskel nicht zu verletzen, da auf diesen später die Scaffolds implantiert wurden.

Nach Abschluss der Präparation wurde das Beobachtungsfenster mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Spüllösung; B. Braun, Melsungen, Deutschland) mehrfach gespült und der zweite Kammerrahmen mit rostfreien Stahlmuttern auf den drei Verbindungsschrauben montiert (*Abbildung 7E*). Um hierbei eine Komprimierung des Gewebes zu verhindern, dienten ebenfalls Stahlmuttern als Abstandshalter, welche zwischen beiden Rahmenteilern auf den Verbindungsschrauben festgedreht wurden. So konnte zwischen den Kammerrahmen ein Abstand von etwa 500 µm eingehalten werden. Abschließend wurde ein Deckglas auf das Beobachtungsfenster im vorderen Rahmen aufgelegt, welches am Wasserfilm des kontinuierlich mit steriler Kochsalzlösung feucht gehaltenen Gewebes (*Abbildung 7D*) adhärierte und zusätzlich mit einem Sprengring fixiert wurde. Sowohl Sprengring als auch Deckglas konnten im späteren Verlauf problemlos entfernt werden, um bei Bedarf Zugang zum Beobachtungsfeld zu erhalten.

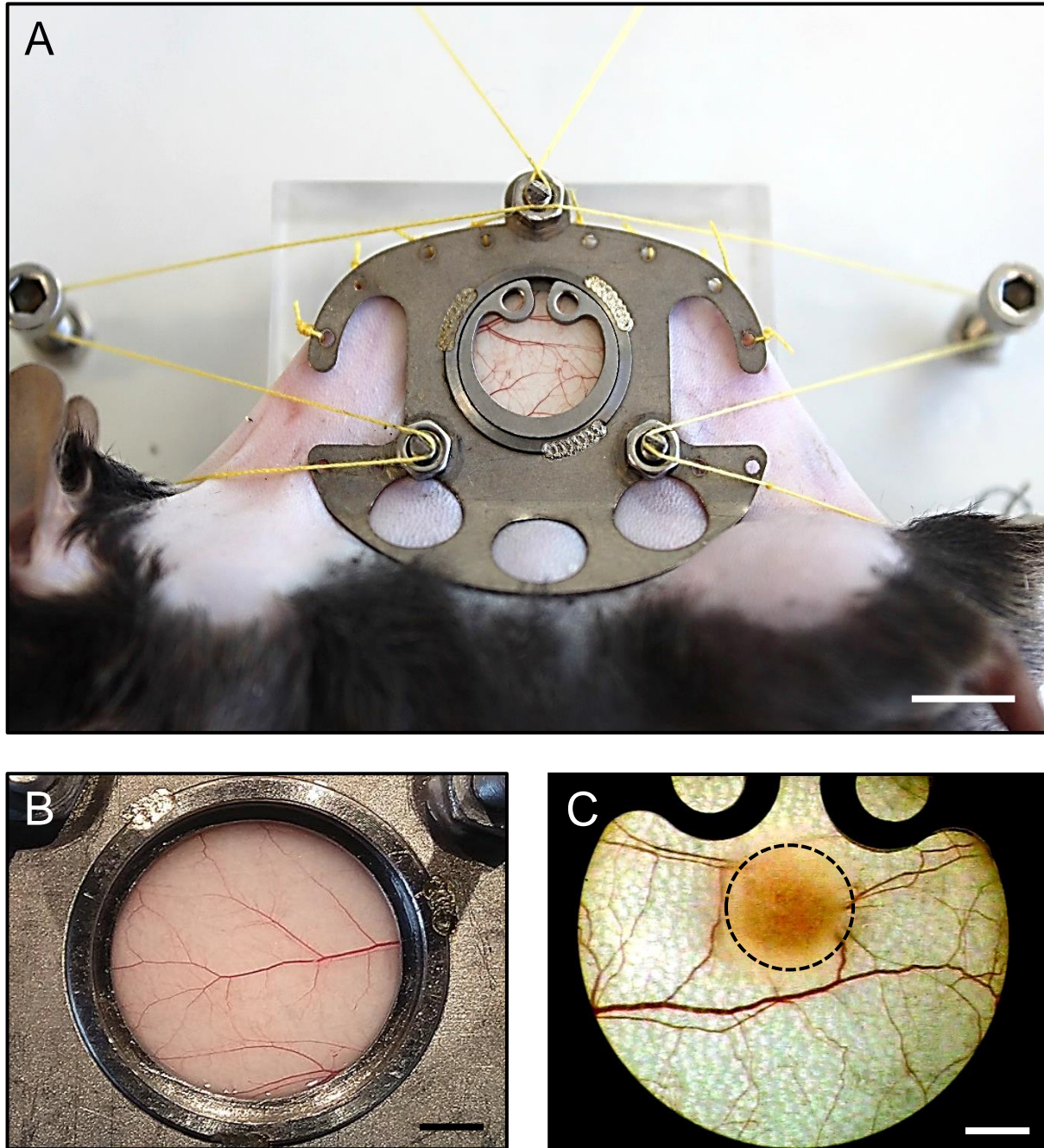
Bevor die Versuche fortgeführt wurden, hatten die Mäuse 48 h Zeit, um sich von dem chirurgischen Trauma und der Narkose zu erholen. Ihr normales Schlaf-, Putz-, und Fressverhalten zeigte, dass die Mäuse die Rückenhautkammer gut tolerierten (*Abbildung 7F*).

### **5.2.8 Implantation prävaskularisierter Integra®-Scaffolds**

Zur Fixierung der betäubten Versuchstiere wurden speziell angefertigte Plexiglasbühnen verwendet (*Abbildung 9A*), auf denen die Rückenhautkammer horizontal positioniert werden konnte. Zur Implantation eines prävaskularisierten Integra®-Scaffolds wurde zunächst der Sprengring und das Deckglas der Rückenhautkammer entfernt (*Abbildung 9B*) und das nun freiliegende Gewebe unter mehrfacher Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten, ehe das Scaffold unter operationsmikroskopischer Sicht im Zentrum des Beobachtungsfensters platziert wurde.

Beim anschließenden Verschluss der Kammer wurde darauf geachtet, dass weder Luftblasen noch Verunreinigungen unter dem Deckglas verblieben. Falls nötig,

wurde das Gewebe bei diesem Schritt erneut mit 0,9 % NaCl-Lösung benetzt. Nach Fixation des Deckglases mithilfe des Sprenglings wurde das Implantat schließlich mittels Stereo-Operationsmikroskop visualisiert (*Abbildung 9C*).

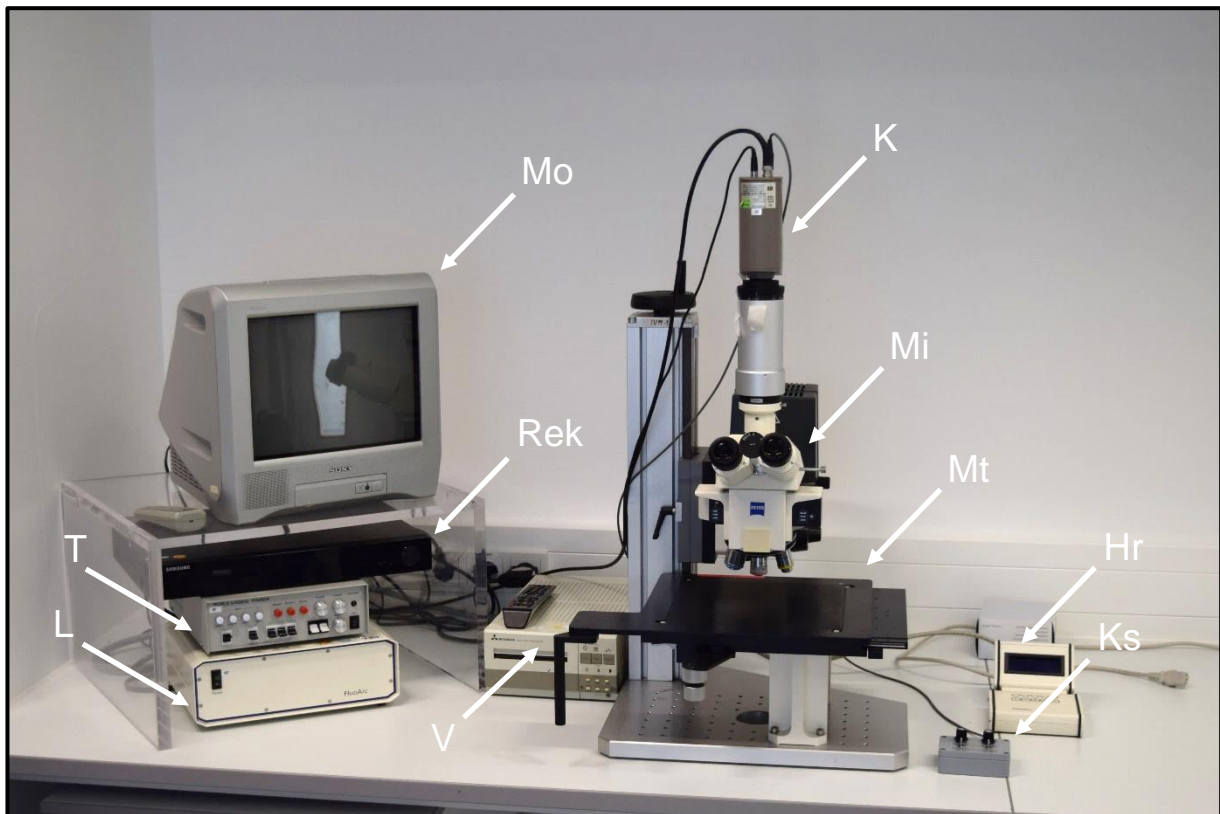


**Abbildung 9:** **A:** Eine Rückenhautkammer wird auf einer Plexiglasbühne fixiert. **B:** Deckglas und Sprengring werden vor der Implantation eines Scaffolds entfernt. **C:** Stereomikroskopische Übersichtsaufnahme unter Gegenlicht nach Implantation eines prävasikularisierten Integra®-Scaffolds (Rand mit gestrichelter Linie markiert). Maßstab: A: 7,9 mm; B: 2,3 mm; C: 1,4 mm.



### 5.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

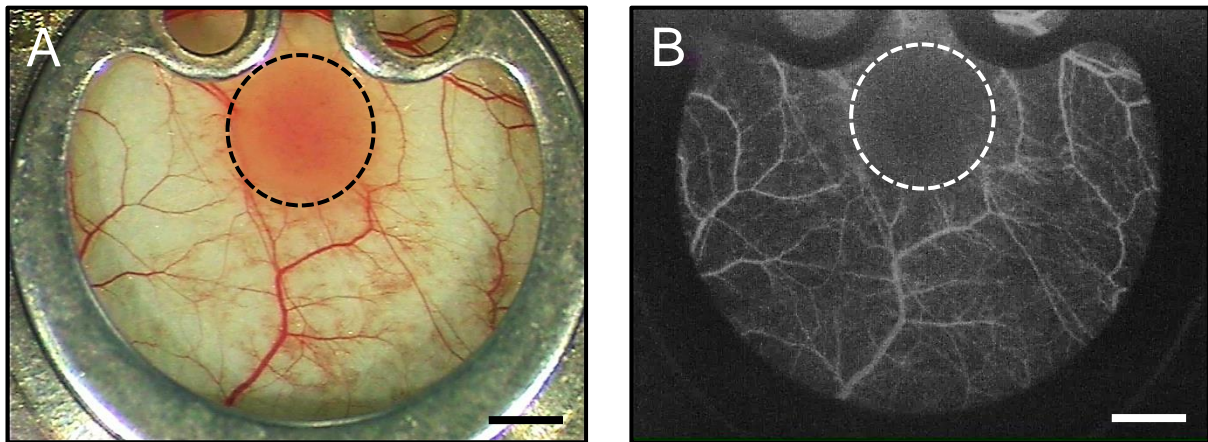
Mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie (*Abbildung 10*) konnte in der vorliegenden Arbeit die Vaskularisierung der mit mikrovaskulären Fragmenten beladenen Integra<sup>®</sup>-Scaffolds über den gesamten Versuchszeitraum repetitiv analysiert werden.



**Abbildung 10:** Intravitalkroskopischer Arbeitsplatz. Videotimer (T), Lampengenerator (L), Monitor (Mo), DVD-Rekorder (Rek), Videoprinter (V), Kamera (K), Mikroskop (Mi), verstellbarer Mikroskopisch (Mt), Helligkeitsregler (Hr), Kamerasteuerung (Ks).

Die i.p. Gabe von Ketamin und Xylazin in der bereits beschriebenen Dosis ermöglichte die Durchführung der Intravitalkroskopie am narkotisierten Tier. Hierfür wurde die Maus mit Rückenhautkammer auf einer Plexiglasbühne in horizontaler Lage fixiert und zunächst ohne Kontrastmittel mikroskopiert, um den erfolgreichen Transfer der GFP<sup>+</sup> Gefäßfragmente auf die Scaffolds zu verifizieren. Anschließend wurde den Tieren 0,1 ml 5 % Fluoreszein-Isothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran; 150.000 Da, Sigma-Aldrich) in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Das hohe Molekulargewicht von 150 kDa führte dazu, dass das FITC-Dextran, ähnlich physiologisch vorkommender Makroproteine, über den gesamten Versuchszeitraum kaum über Extravasation ins perivaskuläre Gewebe übertrat [FAYE et al., 2012]. Somit

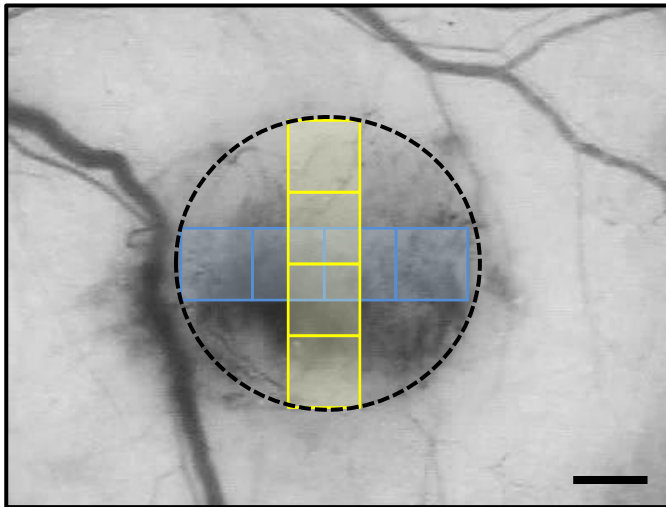
konnte das gesamte Gefäßsystem innerhalb der Rückenhautkammer kontrastverstärkt visualisiert werden (*Abbildungen 11A und B*).



**Abbildung 11:** **A:** Stereomikroskopische Aufnahme des Beobachtungsfensters einer Rückenhautkammer mit implantiertem Integra®-Scaffold (gestrichelte Linie in A und B). **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Beobachtungsfensters in Blaulicht-Epi-Illumination nach Injektion von FITC-Dextran. Maßstab: A, B: 1,5 mm.

Die Intravitalmikroskopie wurde mittels eines Zeiss Axiotech-Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt, welches über eine 100 Watt Quecksilberdampflampe sowie zwischengeschaltete Filterblöcke Licht dreier verschiedener Wellenlängen (grün:  $\lambda = 530-560$  nm, blau:  $\lambda = 450-490$  nm, ultraviolett:  $\lambda = 330-390$  nm) generieren konnte. Für weitere off-line Analysen wurden die intravitalmikroskopischen Aufnahmen mit einer Charge-Coupled Device (CCD) Videokamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und über einen Rekorder (DVD-HR775; Samsung Electronics, Seoul, Südkorea) auf DVD gebrannt. Auf einem 14-Zoll Videomonitor (Trinitron; Sony, Tokio, Japan) konnten über 5x, 10x und 20x Objektive mit langem Arbeitsabstand Vergrößerungen von x115, x230 und x460 erzielt werden. Um die einzelnen Aufnahmen bei der Auswertung den entsprechenden Versuchstagen und -tieren zuordnen zu können, wurden die Videosequenzen mithilfe eines Videotimers (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan) beschriftet.

### 5.3.1 Mikrozirkulatorische Analysen



**Abbildung 12:** Lage der 8 ROIs, die sowohl in vertikaler (gelb) als auch horizontaler (blau) Richtung mit dem 20x Objektiv aufgenommen wurden. Rand des Integra®-Scaffolds mit gestrichelter Linie markiert. Maßstab: 700  $\mu\text{m}$ .

Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurden repetitiv an Tag 0, 3, 6, 10 und 14 nach Implantation Aufnahmen der Integra®-Scaffolds erstellt. Über das eigens für die Mikrozirkulationsforschung entwickelte Auswertesystem CapImage (Version 6.02; Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) erfolgte dabei die Analyse von acht standardisiert festgelegten Feldern (Abbildung 12, Regions of Interest (ROIs);

Größe: 0,4 mm<sup>2</sup>). Dies ermöglichte eine direkte Vergleichbarkeit der verschiedenen Versuchsgruppen und -tage.

Folgende Parameter wurden mit Hilfe von CapImage analysiert: Perfundierte ROIs (5.3.1.1), funktionelle Kapillardichte (5.3.1.2), Gefäßdurchmesser (5.3.1.3), Blutzellgeschwindigkeit (5.3.1.4), Scherrate (5.3.1.5) und mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss (5.3.1.6).

#### 5.3.1.1 Perfundierte ROIs

Eine ROI wurde als perfundiert gewertet, sobald sich darin wenigstens ein durchblutetes Gefäß befand. Der prozentuale Anteil von perfundierten ROIs an den acht ausgewerteten ROIs erlaubte erste Schlussfolgerungen bezüglich des Vaskularisierungsstatus der implantierten Scaffolds. Hierbei waren sowohl einwachsende GFP<sup>-</sup> Gefäße der Empfängermaus als auch GFP<sup>+</sup> mikrovaskuläre Fragmente der Spendermaus, sobald diese Anschluss an das Gefäßsystem des Empfängertieres gefunden hatten, beteiligt.

### **5.3.1.2 Funktionelle Kapillardichte**

Die funktionelle Kapillardichte errechnete sich aus der Gesamtlänge aller durchbluteten Gefäße geteilt durch die Beobachtungsfläche. Angegeben wurde die funktionelle Kapillardichte in  $\text{cm}/\text{cm}^2$ . Die Analyse dieses Parameters erfolgte im Standbild mithilfe von CaplImage (Dr. Zeintl). Dabei wurden auf dem Auswertebildschirm alle Gefäße, die FITC-Dextran gefärbtes Blutplasma enthielten, mit dem Mauszeiger nachgezeichnet und durch die vordefinierte Fläche des ROI geteilt.

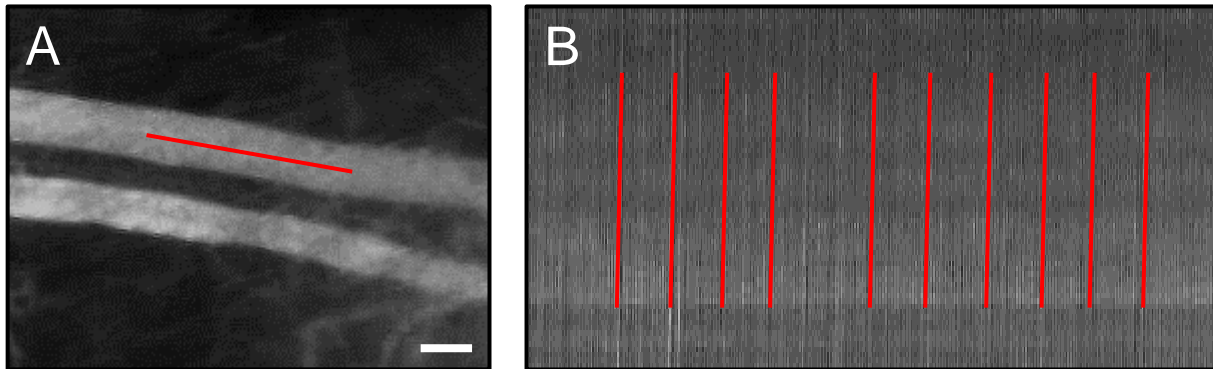
### **5.3.1.3 Gefäßdurchmesser**

Zum Zwecke der Randomisierung wurden ausschließlich die Durchmesser (d) von Gefäßen bestimmt, welche eine gedachte Diagonale vom unteren linken zum oberen rechten Bildrand des Auswertebildschirms kreuzten. Die Messung erfolgte über eine senkrecht zum Gefäßverlauf gezogene Verbindungslinie, welche durch das Setzen zweier gegenüberliegender Punkte der Gefäßwand automatisch gezogen wurde. Die Gefäßdurchmesser von zehn zufällig auf der Diagonalen ausgewählten Gefäße wurden dabei von CaplImage in  $\mu\text{m}$  angegeben.

### **5.3.1.4 Blutzellgeschwindigkeit**

Die computerassistierte Line-Shift-Diagramm-Methode [KLYSCZ et al., 1997] ermöglichte die Bestimmung der Blutzellgeschwindigkeit (v) an denselben Gefäßen, an denen vorher bereits der Gefäßdurchmesser gemessen wurde. Hierfür wurden zur Gefäßwand parallele Messlinien ins Zentrum des Gefäßes gelegt (*Abbildung 13A*) und anschließend die DVD für zehn Sekunden in Echtzeit abgespielt. Während dieser Messperiode wurde ein sogenanntes Line-Shift-Diagramm (*Abbildung 13B*) erzeugt, indem verschiedene Grauwerte aneinandergereiht wurden. Innerhalb dieses Diagramms bildete die x-Achse den Messzeitraum von zehn Sekunden ab, während die y-Achse die Länge der Messlinie repräsentierte. Jeder Erythrozyt erzeugte während seines Verlaufes entlang der Messlinie einen dunklen, schrägen Strich im Line-Shift-Diagramm, anhand dessen Steigung die Fließgeschwindigkeit des roten Blutkörperchens in  $\mu\text{m}/\text{s}$  berechnet werden konnte. Zur Ermittlung der

Blutzellgeschwindigkeit innerhalb des Gefäßes wurden die Fließgeschwindigkeiten von zehn Erythrozyten gemittelt.



**Abbildung 13:** **A:** Messlinie im Zentralstrom einer mit FITC-Dextran markierten Venole. Maßstab: 28 µm. **B:** Aus der Messlinie in A hervorgehendes Line-Shift-Diagramm. Der Mittelwert der Steigungen von zehn Messlinien bildete die Grundlage zur Berechnung der Blutzellgeschwindigkeit mittels CapImage.

### 5.3.1.5 Scherrate

Auf die Gefäßwand einwirkende Scherkräfte können über Freisetzung von pro-angiogenen Faktoren die Proliferation von Endothelzellen erhöhen und somit das Gefäßwachstum fördern [JANKOWSKI et al., 2013]. Diese Scherkräfte können über die Berechnung der Scherrate ( $\gamma$ ) ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Berechnung auf Grundlage der Newtonschen Definition:

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

Somit konnte die Scherrate ( $\gamma$ ) aus den bereits vorhandenen Werten der Blutzellgeschwindigkeit ( $v$ ) und des Gefäßdurchmessers ( $d$ ) errechnet werden.

### 5.3.1.6 Volumetrischer Blutfluss

Auch der volumetrische Blutfluss ( $Q$ ) konnte über die Blutzellgeschwindigkeit ( $v$ ) und den Gefäßdurchmesser ( $d$ ) errechnet werden. Hierzu wurde folgende Formel verwendet:

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

Aus dem parabolischen Geschwindigkeitsprofil in Gefäßen größer als 20 µm resultiert, dass die Fließgeschwindigkeit im Zentrum höher ist als im Randbereich. Um

demzufolge den Blutvolumenfluss nicht zu hoch einzuschätzen, wurde zur Korrektur der Baker-Wayland Proportionalitätsfaktor [BAKER und WAYLAND, 1974] in obenstehende Formel eingefügt. Dieser Faktor betrug im Falle der hier analysierten Gefäße 1,6.

## **5.4 Histologie und Immunhistochemie**

### **5.4.1 Herstellung histologischer Präparate**

Nachdem die letzten intravitalfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am 14. Tag nach Implantation der Integra®-Scaffolds aufgenommen wurden, erfolgte die Tötung der narkotisierten Tiere durch zervikale Dislokation. Anschließend wurden sowohl die Implantate als auch das angrenzende Rückenhautkammerngewebe mittels eines Skalpell (B. Braun) exzidiert und in 4 % Formaldehydlösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 24 h bei Raumtemperatur fixiert. Nach Einbettung in einen Paraffinblock wurden Serienschnitte mit einer Schichtdicke von 3 µm hergestellt und wie in den folgenden Abschnitten beschrieben angefärbt. Zur Visualisierung und quantitativen Auswertung der gefärbten Präparate wurde ein BX60 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet.

### **5.4.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung**

Die nach Standardprotokoll durchgeführte HE-Färbung ermöglichte einen ersten Überblick über die Inkorporation der prävasikularisierten Integra®-Scaffolds in das umliegende Empfängergewebe. Durch diese Färbung konnten sowohl die Implantate als auch deren Integration in das neugebildete Granulationsgewebe unter histomorphologischen Aspekten beurteilt werden.

### **5.4.3 Sirius Red-Färbung**

Mittels Sirius Red-Färbung konnten Kollagen Typ-I Fasern angefärbt werden, welche in polarisiertem Licht rötlich erscheinen. Über das Computerprogramm cellSens Dimension 1.11 (Olympus) konnte der Kollagengehalt von vier ROIs innerhalb der implantierten Integra®-Scaffolds in Relation zur normalen Haut der Maus gesetzt werden [FRUEH et al., 2017].

#### 5.4.4 CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung

Um die Entwicklung mikrovaskulärer Netzwerke in den Implantaten zu analysieren, wurde eine CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung durchgeführt. Mit dem Endothelzellmarker CD31 konnten dabei sämtliche Blutgefäße dargestellt werden, wohingegen über die zusätzliche Färbung von GFP die genaue Zuordnung der Gefäße möglich war. So waren von der Empfängermaus stammende Blutgefäße CD31<sup>+</sup> und GFP<sup>-</sup>, während die mikrovaskulären Fragmente der Spendermaus CD31<sup>+</sup> und GFP<sup>+</sup> waren. In der vorliegenden Arbeit wurde das CD31-Signal rot und das GFP-Signal grün visualisiert.

Die Endothelzellen wurden mit einem monoklonalen Ratte-Anti-Maus CD31-Primärantikörper (1:100; dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) detektiert, welcher über einen Ziege-Anti-Ratte Alexa555-Sekundärantikörper (1:200; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) markiert wurde. Nachfolgend wurden die Schnitte in einer Plastikkuvette in 0,05 % Citraconsäureanhydrid-Puffer (pH 7,4; Sigma-Aldrich) auf 98 °C erhitzt und für 60 min gekocht. Nachdem die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie über Nacht mit einem polyklonalen Ziege-Anti-GFP-Antikörper (1:200; Biomol, Hamburg, Deutschland) bei 4 °C inkubiert. Der Ziege-Anti-GFP-Antikörper fungierte hierbei als zweiter Primärantikörper und wurde über einen Biotin-markierten Esel-Anti-Ziege Sekundärantikörper (1:50; Thermo Fisher Scientific GmbH) detektiert. Während dieses Prozesses wurden die Schnitte für zwei Stunden bei 37 °C ins Wasserbad (GFL 1083; GFL, Burgwedel, Deutschland) gelegt. Das grüne Signal wurde schließlich durch Markierung des Sekundärantikörpers mit Alexa488-markiertem Streptavidin (1:50; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) erzeugt. Um bei der Auswertung die Identifizierung der verschiedenen Strukturen zu erleichtern, wurden zusätzlich die Zellkerne mittels Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) blau angefärbt.

Über digitale Überlagerung wurden sowohl die Gesamtzahl der CD31<sup>+</sup> Gefäße als auch der Anteil der GFP<sup>+</sup> Gefäße ermittelt. Die Auszählung erfolgte im Zentrum und im angrenzenden Randbereich der Implantate, wobei der Wert auf die jeweilige Fläche (mm<sup>2</sup>) bezogen wurde.

#### 5.4.5 CD31-Caspase (Casp)-3- und CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbung

Zusätzlich zur CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung erfolgten **im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit zwei weitere Doppelfluoreszenzfärbungen mit CD31-Casp-3 und CD31-Ki67. Hierfür wurden die mit Glukose oder Vehikel vorbehandelten mikrovaskulären Fragmente auf Integra<sup>®</sup>-Scaffolds transferiert und anschließend eingebettet.

Um apoptotische Zellen innerhalb der mikrovaskulären Fragmente visualisieren zu können, wurde eine CD31-Casp-3-Doppelfluoreszenzfärbung durchgeführt. Caspasen werden durch Spaltung aktiviert und bieten den Vorteil, dass über ihre Detektion sowohl frühe als auch späte Phasen der Apoptose analysiert werden können [CHOUDHARY et al., 2015]. Die Effektorcaspase Casp-3 kann hierbei gleichermaßen über den intrinsischen und den extrinsischen Weg gespalten werden und ist daher für die Aktivierung der meisten Caspase-assoziierten Substrate innerhalb der Caspase-Kaskade verantwortlich [FISCHER et al., 2003].

Um proliferierende Zellen sichtbar zu machen, wurde eine CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbung durchgeführt. Ki67 wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> und Mitose) exprimiert, fehlt aber in der Ruhephase (G<sub>0</sub>) der Zelle. Dabei steigt die Menge dieses Proteins von der G<sub>1</sub>- bis zur Mitose-Phase deutlich an [BRUNO & DARZYNKIEWICZ, 1992]. In der vorliegenden Arbeit wurden CD31<sup>+</sup> Gefäße grün und Casp-3<sup>+</sup> bzw. Ki67<sup>+</sup> Zellen rot angefärbt.

Die vorbehandelten mikrovaskulären Fragmente beider Gruppen wurden zunächst mit einem monoklonalen Ratte-Anti-Maus-Antikörper gegen CD31 (1:100; dianova GmbH) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Neben diesem ersten Primärantikörper wurden die Schnitte am darauffolgenden Tag mit einem zweiten Primärantikörper gegen Casp-3 bzw. Ki67 inkubiert. Bei diesen handelte es sich um einen polyklonalen Kaninchen-Anti-Casp-3-Antikörper (1:100; New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) und einen polyklonalen Kaninchen-anti-Ki67-Antikörper (1:500; Abcam, Cambridge, UK). Im nächsten Schritt wurde zum Nachweis des CD31-Signals ein Ziege-Anti-Ratte Alexa488-Antikörper (1:200; Thermo Fisher Scientific GmbH) als Sekundärantikörper zugegeben. Der Sekundärantikörper zur Detektion des Casp-3- bzw. Ki67-Primärantikörpers war ein Biotin-markierter Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper (nutzfertig, Abcam), welcher seinerseits mittels Alexa555-markiertem Streptavidin (1:50; Thermo Fisher Scientific GmbH) sichtbar gemacht wurde. Analog zur CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung wurden auch hier die Zellkerne mithilfe von



Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) angefärbt.

Die Markierung mit CD31 erlaubte die Differenzierung zwischen CD31<sup>+</sup> Endothelzellen und CD31<sup>-</sup> perivaskulären Zellen. Pro analysiertem Scaffold wurden jeweils mindestens 100 endotheliale und perivaskuläre Zellen auf Casp-3- bzw. Ki67-Positivität untersucht, welche schließlich in Prozent aller untersuchten endothelialen bzw. perivaskulären Zellen angegeben wurden.

## 5.5 Experimentelles Protokoll

### 5.5.1 *In vivo* Untersuchungen

**Im ersten Studienabschnitt** wurden mikrovaskuläre Fragmente aus dem Fettgewebe von 35 C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J Spendermäusen isoliert und in drei gleichgroße Teile aufgeteilt. Diese wurden wie bereits beschrieben entweder in Vehikel-, 1 µM Insulin- oder 1 µM Insulin + 0,5 µg/ml IGFbp4-supplementierter UW-Lösung inkubiert und nachfolgend auf Integra<sup>®</sup>-Scaffolds gesiedelt. Die prävascularisierten Integra<sup>®</sup>-Scaffolds wurden daraufhin in die Rückenhautkammern von 27 GFP<sup>-</sup> C57BL/6 Wildtyp-Mäusen implantiert (n = 9 pro Gruppe).

**Im zweiten Studienabschnitt** wurden mikrovaskuläre Fragmente aus 20 C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J Mäusen in zwei gleichgroße Teile aufgeteilt, welche in 30 mM Glukose- oder Vehikel-supplementierter UW-Lösung inkubiert wurden. Nach dem Transfer der mikrovaskulären Fragmente auf Integra<sup>®</sup>-Scaffolds wurden diese in die Rückenhautkammern von insgesamt 18 GFP<sup>-</sup> C57BL/6 Wildtyp-Mäusen implantiert (n = 9 pro Gruppe).

#### 5.5.1.1 *Versuchsgruppen im ersten Studienabschnitt*

- Vehikel-behandelte mikrovaskuläre Fragmente (Kontrolle; n = 9)
- Insulin-behandelte mikrovaskuläre Fragmente (n = 9)
- Insulin + IGFbp4-behandelte mikrovaskuläre Fragmente (n = 9)

### **5.5.1.2 Versuchsgruppen im zweiten Studienabschnitt**

- Vehikel-behandelte mikrovaskuläre Fragmente (Kontrolle; n = 9)
  
- Glukose-behandelte mikrovaskuläre Fragmente (n = 9)

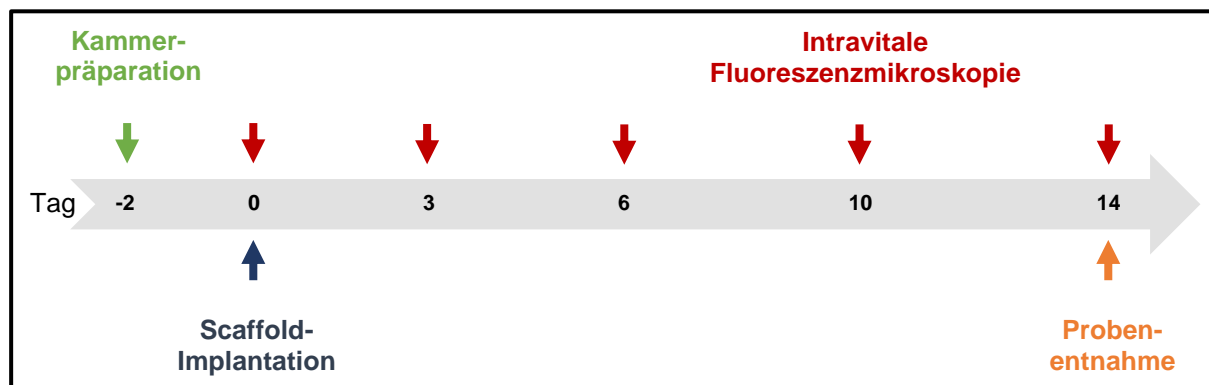
### **5.5.2 In vitro Untersuchungen**

**Im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich mikrovaskuläre Fragmente aus dem Nebenhodenfettgewebe von insgesamt 32 GFP-C57BL/6 Mäusen isoliert. Direkt nach der Isolierung wurden die mikrovaskulären Fragmente in zwei Teile aufgeteilt und entweder einer Behandlung mit 30 mM Glukose oder Vehikel zugeführt. Beide Anteile wurden dabei bei 4 °C für 24 h in UW-Lösung inkubiert, welche entsprechend der Zuteilung zur Behandlungsgruppe mit Glukose bzw. Kontrollgruppe mit Vehikel supplementiert war. Anschließend wurde die Proteinexpression der Gefäßfragmente mittels Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese-Array (n = 2 pro Gruppe) analysiert. Integra<sup>®</sup>-Scaffolds wurden mit weiteren mikrovaskulären Fragmenten besiedelt. Auf diese Weise konnte die Morphologie der mikrovaskulären Fragmente mittels REM (n = 2 pro Gruppe) und ihre zelluläre Viabilität und Proliferation unter Zuhilfenahme von immunhistochemischen Färbungen (n = 4 pro Gruppe) untersucht werden.

### **5.5.3 Versuchsablauf**

Auf die Präparation der Rückenhautkammer folgte eine 48-stündige Ruhephase, in der sich die Tiere vom chirurgischen Trauma und der Narkose erholen konnten. Die darauffolgende Implantation der prävaskularisierten Scaffolds wurde als Tag 0 definiert. Sowohl an diesem als auch am 3., 6., 10. und 14. Tag wurden intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (*Abbildung 14*). Der Intravitalmikroskopie ging dabei zur Übersicht eine Stereo-operationsmikroskopische Darstellung des Beobachtungsfensters in 8-, 25- und 40-facher Vergrößerung voraus. Im Anschluss an die letzte intravitalmikroskopische Untersuchung an Tag 14 erfolgte die Tötung der narkotisierten Versuchstiere durch zervikale Dislokation. Unmittelbar

danach wurde das Rückenhautkammerngewebe inklusive der Implantate für weitere histologische und immunhistochemische Analysen asserviert.



**Abbildung 14:** Schematisch dargestellter Zeitablauf der durchgeführten Untersuchungen.

## 5.6 Statistik

Alle erhobenen Daten wurden zunächst auf Normalverteilung und Varianzgleichheit getestet. Bei normalverteilten Daten wurden die Unterschiede zwischen den drei Gruppen **im ersten Studienabschnitt** mittels one-way ANOVA gefolgt von einem Student-Newman-Keuls-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Falls die Daten nicht normalverteilt waren, erfolgte die Testung mit ANOVA on ranks gefolgt von einem Dunn's Test.

**Im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit wurden die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei Normalverteilung der Daten mithilfe eines ungepaarten Student's t-Tests und bei nicht normalverteilten Daten mittels eines Mann-Whitney-U-Tests auf das Vorliegen einer statistischen Signifikanz geprüft.

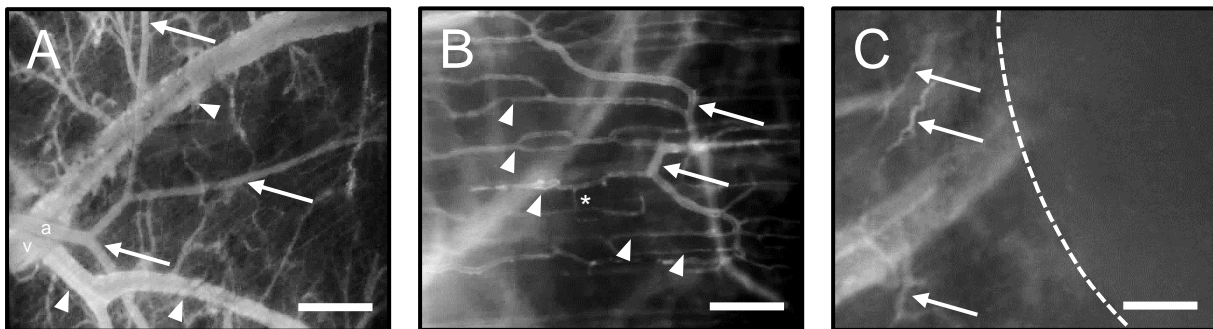
Sämtliche Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) angegeben. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert.

Für die Durchführung aller in der vorliegenden Arbeit angewandten statistischen Tests wurde das Software Paket SigmaPlot (Version 11.0; Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet.

## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 Mikrozirkulation der Rückenhautkammer

Zur *in vivo* Analyse des Einflusses einer Insulin- bzw. Glukose-Behandlung auf das Vaskularisierungspotential mikrovaskulärer Fragmente wurde **in beiden Studienabschnitten** der vorliegenden Arbeit auf das Rückenhautkammermodell der Maus zurückgegriffen. An fünf Untersuchungstagen wurde in einem Zeitraum von 14 Tagen repetitiv der Plasma-Marker FITC-Dextran (5 %) in den retrobulbären Venenplexus der Mäuse injiziert. Dieser bot den Vorteil, dass er aufgrund seines hohen Molekulargewichts von 150 kDa hauptsächlich intravasal verblieb. Die innerhalb der Rückenhautkammer verlaufenden Gefäße konnten somit in der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie kontrastmittelverstärkt dargestellt werden (*Abbildung 15*).



**Abbildung 15:** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (in Blaulicht-Epi-Illumination; kontrastverstärkt durch 0,1 ml 5 % FITC-Dextran intravenös (i.v.)) unterschiedlicher Gefäßabschnitte innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am Tag der Scaffold-Implantation. **A:** Arteriolen (a; im Verlauf mit Pfeilen markiert) und Venolen (v; im Verlauf mit Pfeilspitzen markiert) lassen sich anhand unterschiedlicher Fließrichtungen und -geschwindigkeiten sowie Gefäßdurchmesser voneinander unterscheiden. **B:** Aus Arteriolen (Pfeile) gespeiste Kapillaren (Pfeilspitzen) mit typisch parallelem Verlauf. Der Stern markiert eine Querverbindung zwischen zwei Kapillaren. **C:** Im Empfängergewebe neu entstandene, perfundierte Gefäße (Pfeile) im Randbereich eines implantierten Integra®-Scaffolds (Rand mit gestrichelter Linie markiert). Maßstab: A: 240  $\mu\text{m}$ ; B: 90  $\mu\text{m}$ ; C: 260  $\mu\text{m}$ .

Die Mikrozirkulation innerhalb der Rückenhautkammer besteht aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen (*Abbildungen 15A und B*). Die unterschiedlichen Blutgefäßarten können anhand mehrerer Merkmale voneinander unterschieden werden. Charakteristisch für Arteriolen ( $d = 40\text{-}60 \mu\text{m}$ ) ist die glatte Wandstruktur, die hohe Fließgeschwindigkeit sowie der geradlinige Verlauf im Gewebe. Sie verzweigen sich mehrfach bis zu kleineren Arteriolen ( $d = 20\text{-}40 \mu\text{m}$ ), welche das oxygenierte Blut ins Kapillarbett transportieren. Die Kapillaren ( $d = 5\text{-}7 \mu\text{m}$ ) sind an ihrer typischen

parallelen Anordnung erkennbar und verlaufen im Abstand von 40-60  $\mu\text{m}$  zueinander. Einige Kapillaren sind dabei über Gefäßbrücken untereinander quervernetzt (*Abbildung 15B*). Nach dem Sauerstoffaustausch wird das desoxygenierte Blut von postkapillaren Venolen ( $d = 20\text{-}40 \mu\text{m}$ ) aufgenommen, welche das Blut in größere Sammelvenolen ( $d = 40\text{-}120 \mu\text{m}$ ) weiterleiten. Die Differenzierung der Venolen im Vergleich zu den Arteriolen gelingt über die typischerweise langsamere Fließgeschwindigkeit, unregelmäßige Wandstruktur sowie die gegensätzliche Fließrichtung des Blutes.

Nachdem die prävascularisierten Integra<sup>®</sup>-Scaffolds in das Gewebe der Rückenhautkammer implantiert wurden, veränderte sich die Mikroarchitektur des Gefäßsystems grundlegend. Im Randbereich der Implantate bildeten sich Gefäßsprossen aus, welche zentripetal in die Matrices einwuchsen und zusammen mit den beladenen mikrovaskulären Fragmenten ein neues Gefäßnetzwerk in den Implantaten ausbildeten (*Abbildung 15C*).

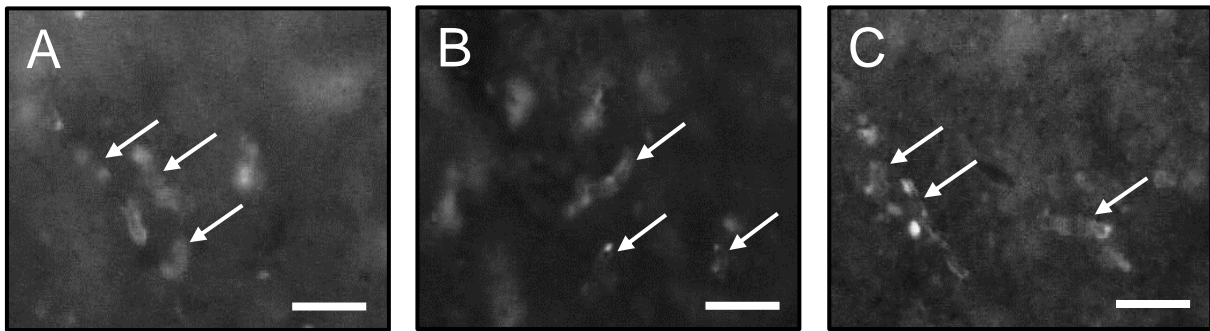
## 6.2 Insulin-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente

### 6.2.1 *In vivo* Untersuchungen

#### 6.2.1.1 *Vaskularisierung implantierter Integra<sup>®</sup>-Scaffolds*

Die Entwicklung neuer Gefäßnetzwerke innerhalb der mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelten Scaffolds wurde unter Blaulicht-Epi-Illumination mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Das Fettgewebe, aus dem die Gefäßfragmente gewonnen wurden, stammte von transgenen GFP<sup>+</sup> Spendertieren. Daher konnten die GFP<sup>+</sup> mikrovaskulären Fragmente nach Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammer der GFP<sup>-</sup> Empfängermäuse eindeutig identifiziert werden. Die mit Vehikel-, Insulin- oder Insulin + IGFbp4-behandelten Fragmente wiesen bezüglich Morphologie, Länge und Gesamtzahl keine erkennbaren Unterschiede auf (*Abbildung 16*).

Während des zweiwöchigen Untersuchungszeitraums entstand aus den mikrovaskulären Fragmenten aller drei Gruppen ein vergleichbar dichtes mikrovaskuläres Netzwerk (*Abbildung 17*). Bereits am 3. Tag nach Implantation konnten in jeder Gruppe bei jeweils einem Drittel der Versuchstiere erste perfundierte

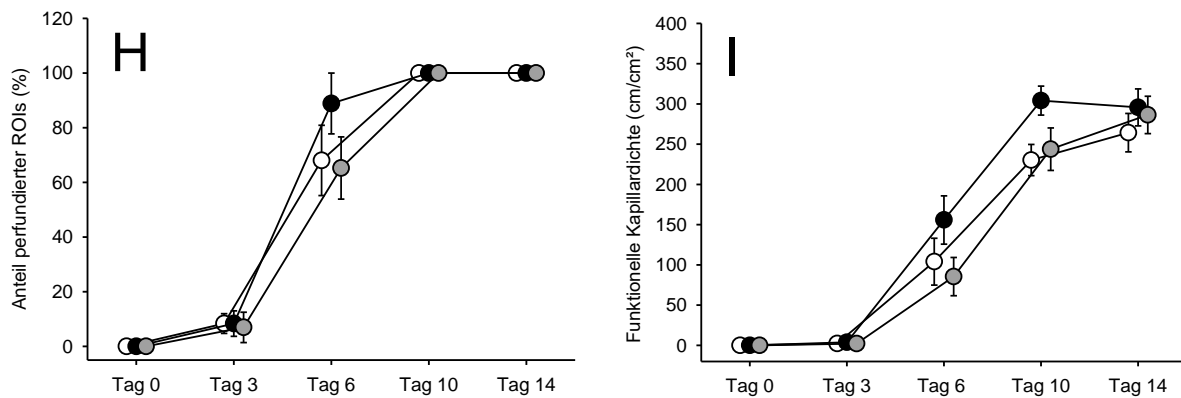
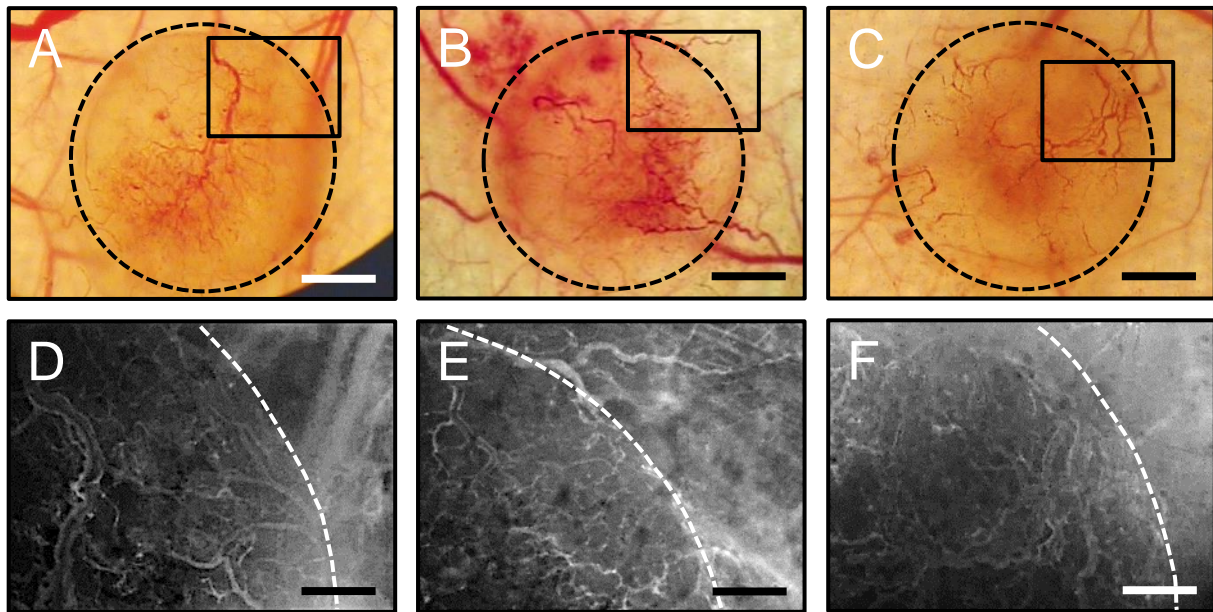


**Abbildung 16:** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (in Blaulicht-Epi-Illumination) von GFP<sup>+</sup> mikrovaskulären Fragmenten (Pfeile) auf Integra<sup>®</sup>-Scaffolds innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am Tag der Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (A), Insulin- (B) oder Insulin + IGFbp4- (C) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Maßstab: A - C: 45 µm.

Gefäße in den Implantaten visualisiert werden. Im weiteren Verlauf bildeten sich zahlreiche Quervernetzungen der mikrovaskulären Fragmente sowohl untereinander als auch mit den Gefäßen des Empfängergewebes aus. Dieser Prozess lief typischerweise zwischen dem 3. und 6. Tag nach Implantation ab, was den starken Anstieg der perfundierten ROIs und der funktionellen Kapillardichte während dieses Zeitraums erklärt. Schließlich entstand ein engmaschig durchblutetes Gefäßnetzwerk im Bereich der Poren der Scaffolds. Dementsprechend zeigte sich bis zum 10. Tag ein steiler Anstieg der Dichte dieses Netzwerks sowie eine vollständige Perfusion aller analysierten ROIs (Abbildungen 17H und I). Die Scaffolds mit Insulin-behandelten Fragmenten wiesen am 6. und 10. Untersuchungstag eine leicht erhöhte funktionelle Kapillardichte auf (Abbildung 17I).

### 6.2.1.2 Mikrohämodynamik

Randomisiert ausgewählte Gefäße in den Implantaten wurden an jedem Untersuchungstag bezüglich Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Scherrate und volumetrischem Blutfluss analysiert (Tabelle 1). Hierbei zeigten sich in der Insulin-behandelten Gruppe leicht reduzierte Gefäßdurchmesser bei gleichzeitig signifikant erhöhten Blutzellgeschwindigkeiten. So sank der durchschnittlich ermittelte Gefäßdurchmesser zwischen Tag 3 und Tag 14 nach Implantation von ~ 27 µm auf ~ 16 µm in der Insulin-behandelten Gruppe ab, wohingegen die Werte in der Kontrollgruppe während des Beobachtungszeitraums von ~ 47 µm auf ~ 19 µm und in der Insulin + IGFbp4-behandelten Gruppe von ~ 34 µm auf ~ 17 µm abfielen.



**Abbildung 17: A - C:** Stereomikroskopische Übersichtsaufnahmen von prävascularisierten Integra<sup>®</sup>-Scaffolds (Rand mit gestrichelter Linie markiert), die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 10. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (A), Insulin- (B) oder Insulin + IGFbp4- (C) supplementierter UW-Lösung kultiviert. **D - F:** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen (in Blaulicht-Epi-Illumination; kontrastverstärkt durch 0,1 ml 5 % FITC-Dextran i.v.) von prävascularisierten Integra<sup>®</sup>-Scaffolds (Rand mit gestrichelter Linie markiert), die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 10. Tag nach Implantation. Gezeigt sind die in A - C durch einen schwarzen Rahmen markierten Bereiche. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (D), Insulin- (E) oder Insulin + IGFbp4- (F) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Maßstab: A - C: 900 µm; D - F: 220 µm. **H, I:** Anteil der perfundierten ROIs (H; %) und funktionelle Kapillardichte (I; cm/cm<sup>2</sup>) der prävascularisierten Integra<sup>®</sup>-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (weiße Kreise; n = 9), Insulin- (schwarze Kreise; n = 9) oder Insulin + IGFbp4- (graue Kreise; n = 9) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Mittelwert ± SEM.

Bei der Analyse der Blutzellgeschwindigkeit zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen ein Anstieg von ~ 200 µm/s auf ~ 490 µm/s in den Gefäßen der Scaffolds, die mit Insulin-kultivierten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt waren.

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
<i>Gefäßdurchmesser [<math>\mu\text{m}</math>]</i>				
Kontrolle	47,4 $\pm$ 10,3	31,1 $\pm$ 2,6	21,1 $\pm$ 1,5	18,6 $\pm$ 1,0
Insulin	27,1 $\pm$ 6,6	28,0 $\pm$ 1,3	17,7 $\pm$ 0,8	15,9 $\pm$ 0,6
Insulin + IGFbp4	33,9 $\pm$ 1,8	29,9 $\pm$ 2,4	21,2 $\pm$ 1,2	16,8 $\pm$ 0,7
<i>Blutzellgeschwindigkeit [<math>\mu\text{m/s}</math>]</i>				
Kontrolle	27,6 $\pm$ 11,6	232,3 $\pm$ 38,2	331,6 $\pm$ 26,3	315,1 $\pm$ 15,2
Insulin	196,0 $\pm$ 37,9	278,3 $\pm$ 44,4	498,1 $\pm$ 45,3*	492,4 $\pm$ 27,1*
Insulin + IGFbp4	106,1 $\pm$ 50,1	175,1 $\pm$ 35,7	296,0 $\pm$ 32,3#	327,5 $\pm$ 23,2#
<i>Scherrate [<math>\text{s}^{-1}</math>]</i>				
Kontrolle	9,8 $\pm$ 5,0	70,9 $\pm$ 12,9	153,7 $\pm$ 24,1	170,9 $\pm$ 20,3
Insulin	74,4 $\pm$ 11,3*	103,2 $\pm$ 18,8	254,5 $\pm$ 25,3*	279,0 $\pm$ 15,9*
Insulin + IGFbp4	23,4 $\pm$ 7,8#	54,2 $\pm$ 11,6	140,9 $\pm$ 16,9#	192,6 $\pm$ 21,2#
<i>Volumetrischer Blutfluss [<math>\text{pl/s}</math>]</i>				
Kontrolle	25,6 $\pm$ 16,0	136,0 $\pm$ 24,4	113,7 $\pm$ 16,0	77,8 $\pm$ 17,4
Insulin	80,2 $\pm$ 49,9	126,4 $\pm$ 23,4	100,1 $\pm$ 8,6	74,6 $\pm$ 4,8
Insulin + IGFbp4	110,3 $\pm$ 57,9	101,3 $\pm$ 24,7	97,2 $\pm$ 25,4	75,7 $\pm$ 9,8

**Tabelle 1:** Gefäßdurchmesser ( $\mu\text{m}$ ), Blutzellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ), Scherrate ( $\text{s}^{-1}$ ) und volumetrischer Blutfluss ( $\text{pl/s}$ ) randomisiert ausgewählter Gefäße prävascularisierter Integra®-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (Kontrolle; n = 9), Insulin- (Insulin; n = 9) oder Insulin + IGFbp4- (Insulin + IGFbp4; n = 9) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Mittelwert  $\pm$  SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Insulin.

Im Vergleich dazu betrug die durchschnittliche Blutzellgeschwindigkeit am letzten Untersuchungstag in der Kontrollgruppe lediglich 320  $\mu\text{m/s}$  bzw. in der Insulin + IGFbp4-behandelten Gruppe 330  $\mu\text{m/s}$ . Der beschriebene Anstieg der Blutzellgeschwindigkeit bei zeitgleich abfallenden Gefäßdurchmessern ist dabei ein typischer Indikator für die Ausreifung von Blutgefäßen innerhalb eines neu entstehenden mikrovaskulären Netzwerks [LASCHKE et al., 2014a]. Schließlich führten die erhobenen

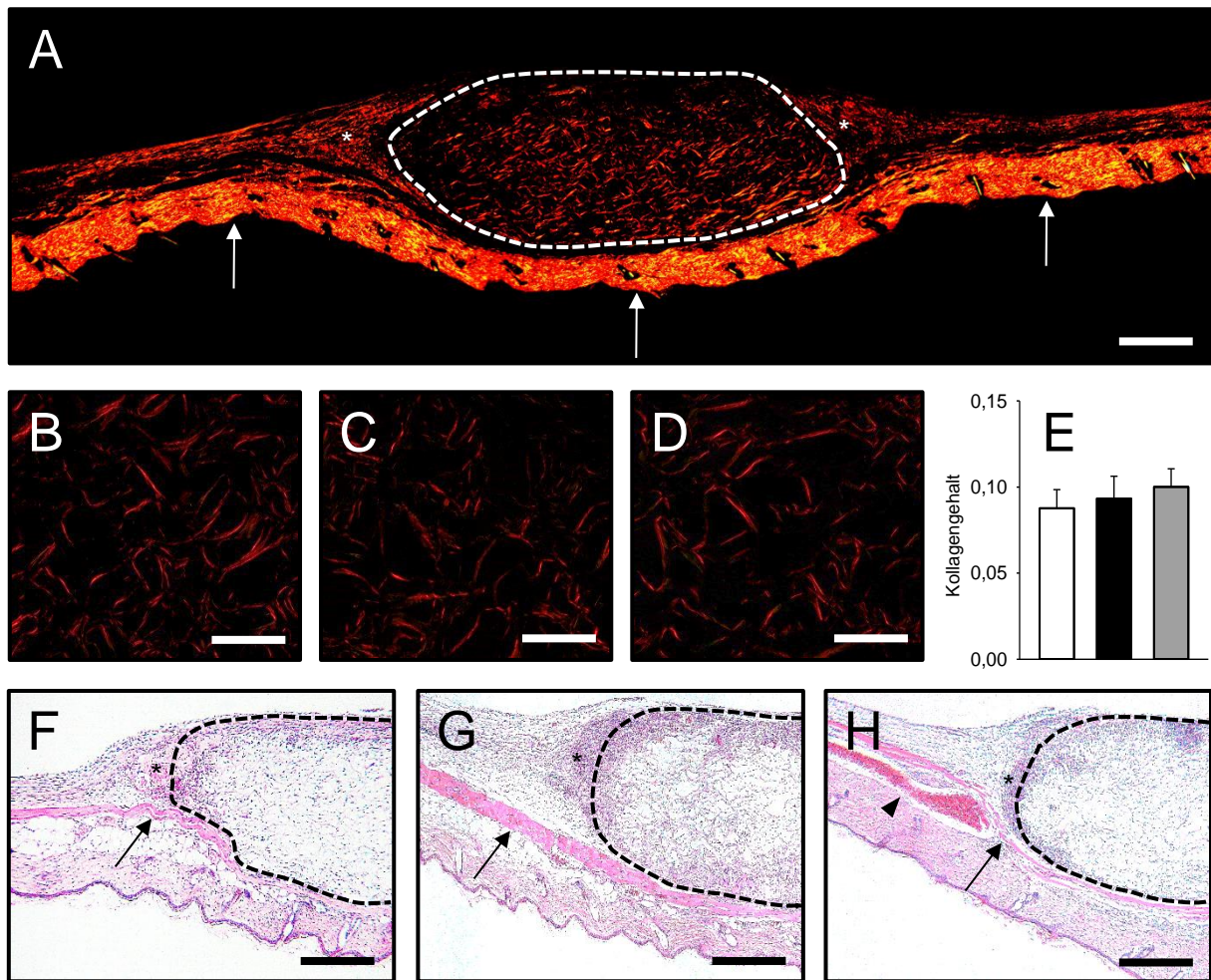


Messparameter zu einer erhöhten Scherrate in der Behandlungsgruppe mit Insulin, während der volumetrische Blutfluss keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufwies.

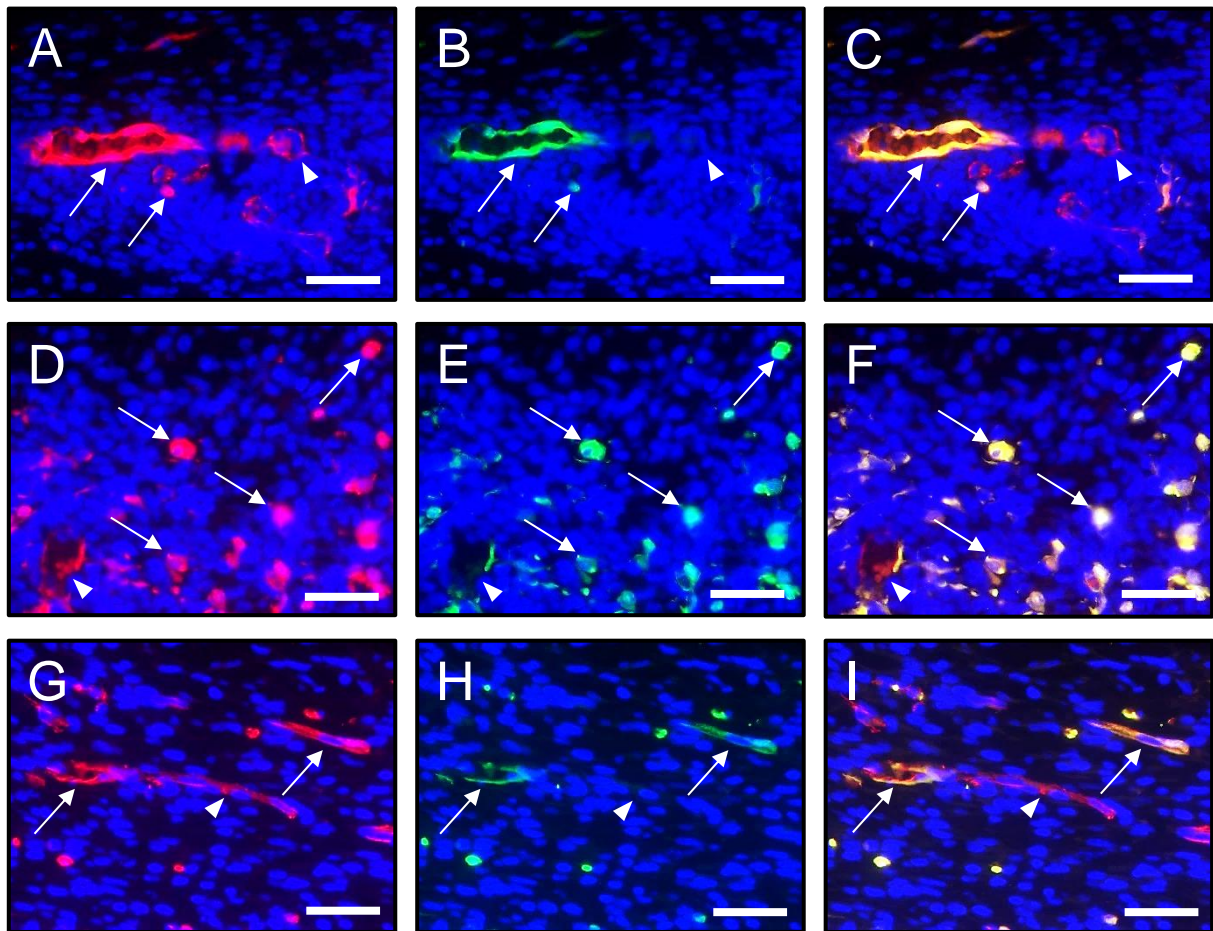
### 6.2.2 Histologie und Immunhistochemie

Nach Abschluss der zweiwöchigen *in vivo* Untersuchungen wurden die Implantate mit angrenzendem Rückenhautkammerngewebe exzidiert, um deren Inkorporation und Gewebearchitektur mittels histologischer und immunhistochemischer Färbungen zu untersuchen. Die Färbung mit Sirius Red (*Abbildungen 18A - D*) zeigte hierbei keinen wesentlichen Unterschied des Kollagengehalts der Integra<sup>®</sup>-Scaffolds aller drei Gruppen (*Abbildung 18E*).

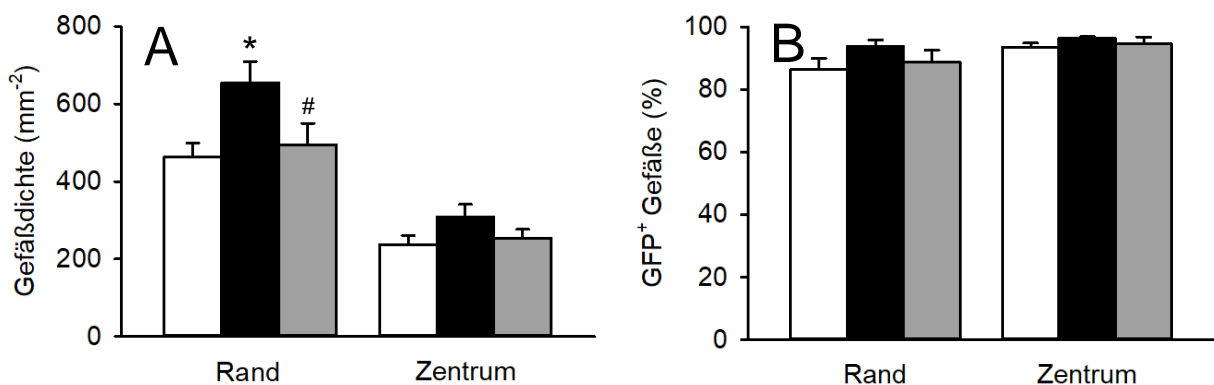
In der HE-Färbung ließ sich ein dicht vaskularisiertes Granulationsgewebe im Randbereich der Integra<sup>®</sup>-Scaffolds sämtlicher Versuchsgruppen nachweisen (*Abbildungen 18F - H*). Es kann daher geschlossen werden, dass die prävascularisierten Implantate innerhalb des 14-tägigen Beobachtungszeitraums gut in das Empfängergewebe inkorporiert wurden. Bereits in der HE-Färbung konnte ein dichteres Granulationsgewebe in der Insulin-behandelten Gruppe im Grenzbereich zwischen Scaffolds und Rückenhautkammerngewebe beobachtet werden (*Abbildung 18G*). In Übereinstimmung hierzu wurde in der immunhistochemischen Analyse des Granulationsgewebes im Randbereich der Implantate der Insulin-behandelten Gruppe eine deutlich höhere Dichte CD31<sup>+</sup> Gefäße nachgewiesen (*Abbildungen 19A - I*). Im Zentrum der Integra<sup>®</sup>-Scaffolds gab es keine signifikanten Unterschiede in der Dichte CD31<sup>+</sup> Gefäße zwischen den Gruppen (*Abbildung 20A*). Des Weiteren waren sowohl im Zentrums- als auch im Randbereich der Implantate aller Gruppen über 80 % der ausgewerteten Gefäße GFP<sup>+</sup>, was zeigt, dass zahlreiche GFP<sup>+</sup> mikrovaskuläre Fragmente in die sich neu entwickelnden mikrovaskulären Netzwerke integriert wurden (*Abbildungen 19 und 20B*).



**Abbildung 18:** **A - D:** Sirius Red-gefärbte Schnitte prävascularisierter Integra®-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 14. Tag nach Implantation. **A:** Übersichtsaufnahme eines mit Vehikel-behandelten mikrovaskulären Fragmenten besiedelten Integra®-Scaffolds (Rand mit gestrichelter Linie markiert) und des angrenzenden Rückenhautkammerngewebes. Zum Kollagengehalt der mit Pfeilen markierten Haut wurde der Kollagengehalt des Implantats in Relation gesetzt. Sterne: Granulationsgewebe. **B - D:** Aufnahmen zentraler Bereiche von mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelten Integra®-Scaffolds. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (B), Insulin- (C) oder Insulin + IGFbp4- (D) supplementierter UW-Lösung kultiviert. **E:** Mithilfe der Software cellSens Dimension 1.11 errechneter Kollagengehalt prävascularisierter Integra®-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (weißer Balken; n = 9), Insulin- (schwarzer Balken; n = 9) oder Insulin + IGFbp4- (grauer Balken; n = 9) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Mittelwert ± SEM. **F - H:** HE-gefärbte Schnitte prävascularisierter Integra®-Scaffolds (Rand mit gestrichelter Linie markiert), die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (F), Insulin- (G) oder Insulin + IGFbp4- (H) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Pfeile in F - H: quergestreifter Muskel, auf den die Integra®-Scaffolds platziert wurden; Pfeilspitze in H: mit Erythrozyten gefülltes Gefäß im Längsschnitt. Maßstab: A: 500 µm; B - D: 180 µm; F - H: 300 µm.



**Abbildung 19: A - I:** Immunhistochemisch gefärbte Schnitte des Granulationsgewebes im Randbereich prävaskularisierter Integra®-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (A - C), Insulin- (D - F) oder Insulin + IGFbp4- (G - I) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Die Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen CD31 (A, D, G; rot) zur Detektion der Endothelzellen, einem Antikörper gegen GFP (B, E, H; grün) sowie Hoechst 33342 (A - I; blau) zur Visualisierung der Zellkerne gefärbt. G, F und I wurden durch Überlagerung von A und B, D und E bzw. G und H erzeugt. Pfeile: CD31<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Gefäße; Pfeilspitzen: CD31<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup> Gefäße. Maßstab: 15 µm.



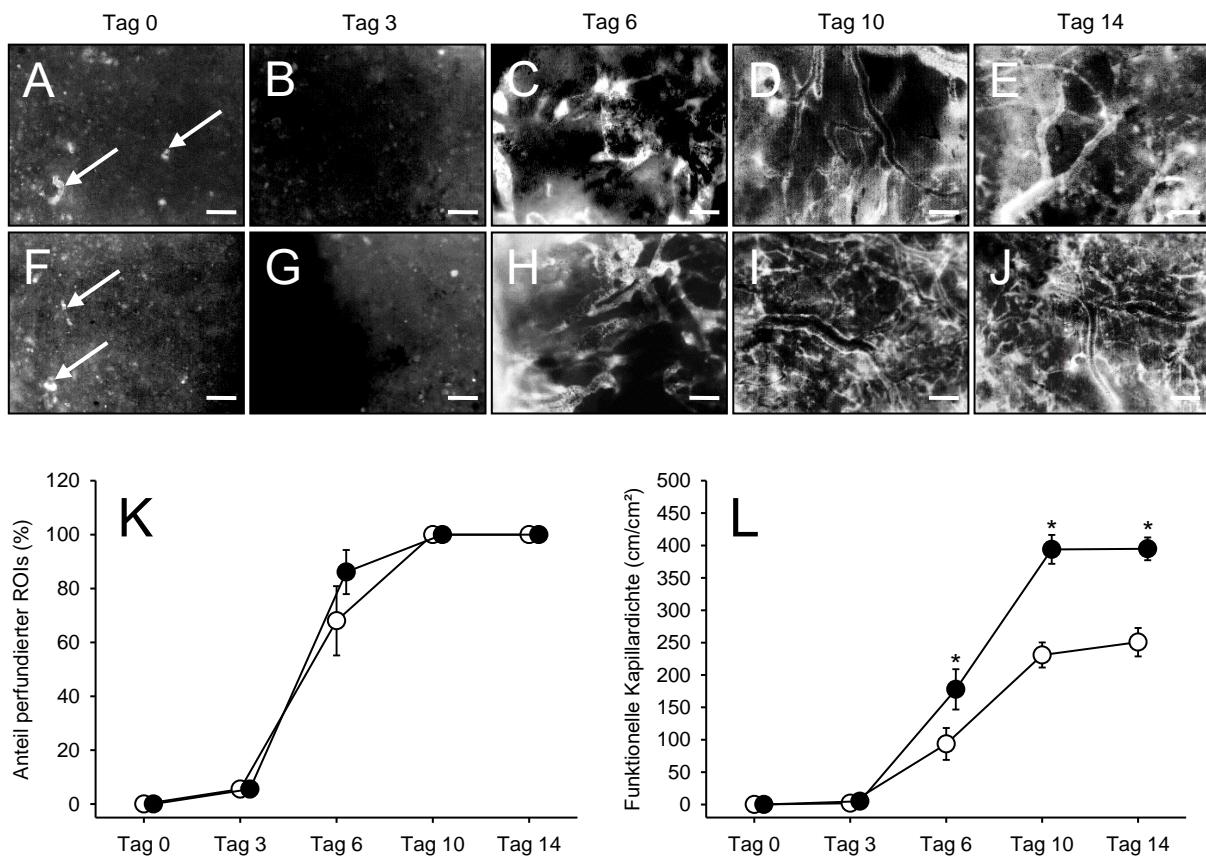
**Abbildung 20: A, B:** Gefäßdichte (A; mm<sup>2</sup>) und GFP<sup>+</sup> Gefäße (B; % von allen sichtbaren Gefäßen) im Randbereich und Zentrum prävaskularisierter Integra®-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (Kontrolle; weiße Balken; n = 9), Insulin- (schwarze Balken; n = 9) oder Insulin + IGFbp4- (graue Balken; n = 9) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Insulin.

### 6.3 Glukose-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente

#### 6.3.1 *In vivo* Untersuchungen

##### 6.3.1.1 Vaskularisierung implantierter Integra®-Scaffolds

Um das Vaskularisierungspotential GFP<sup>+</sup> mikrovaskulärer Fragmente zu untersuchen, welche mit einer hochmolaren Glukose-Lösung behandelt wurden, wurden diese zunächst auf Integra®-Scaffolds gesiedelt und anschließend in die Rücken- hautkammern von GFP<sup>-</sup> Empfängermäusen implantiert. In der Kontrollgruppe wurden die Gefäßfragmente wie im ersten Studienabschnitt mit Vehikel behandelt.



**Abbildung 21: A - J:** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (in Blaulicht-Epi-Illumination; kontrastverstärkt durch 0,1 ml 5 % FITC-Dextran i.v.) prävaskularisierter Integra®-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rücken- hautkammer von C57BL/6 Mäusen direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (A - E), oder 30 mM Glukose- (F - J) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Pfeile: GFP<sup>+</sup> mikrovaskuläre Fragmente direkt nach Besiedlung der Scaffolds. Maßstab: 85 µm. **K, L:** Anteil perfundierter ROIs (K; %) und funktionelle Kapillardichte (L; cm/cm<sup>2</sup>) prävaskularisierter Integra®-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rücken- hautkammer von C57BL/6 Mäusen direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (Kontrolle; weiße Kreise; n = 9) oder 30 mM Glukose- (schwarze Kreise; n = 9) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

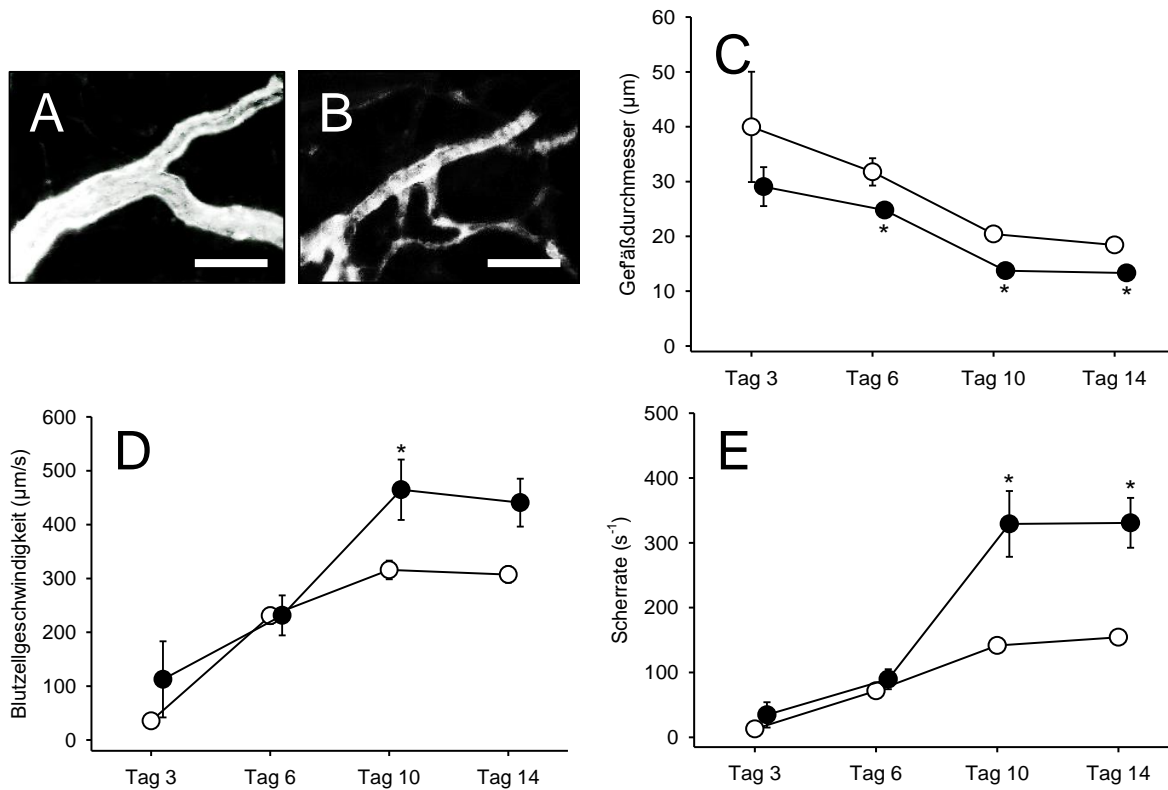
Im darauffolgenden 14-tägigen Beobachtungszeitraum bildeten die mikrovaskulären Fragmente beider Gruppen untereinander und mit den Gefäßen des umgebenden GFP<sup>-</sup> Empfängergeribes ein neues Gefäßnetzwerk aus (*Abbildungen 21A - J*). Hierbei konnte kein wesentlicher Unterschied im Anteil der perfundierten ROIs zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden (*Abbildung 21K*). Allerdings bildeten die Glukose-behandelten Fragmente ein signifikant dichteres mikrovaskuläres Netzwerk in den Poren der Integra<sup>®</sup>-Scaffolds aus. Waren am dritten Untersuchungstag noch keine Unterschiede in der Vaskularisierung beider Gruppen erkennbar, so zeigte sich bereits am 6. Tag nach Implantation eine annähernd doppelt so hohe Gefäßdichte in der Behandlungsgruppe. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums stieg die funktionelle Kapillardichte der Glukose-behandelten Gruppe auf ~ 400 cm/cm<sup>2</sup> an, wohingegen in der Kontrollgruppe lediglich eine Dichte von ~ 250 cm/cm<sup>2</sup> erreicht wurde (*Abbildung 21L*).

### **6.3.1.2 Mikrohämodynamik**

Von randomisiert ausgewählten Gefäßen innerhalb der implantierten Integra<sup>®</sup>-Scaffolds wurden repetitiv der Durchmesser, die Blutzellgeschwindigkeit und die Scherrate gemessen (*Abbildung 22*). Dabei konnten deutliche Unterschiede in den ermittelten Parametern beider Gruppen erfasst werden. So wiesen die Gefäße der Glukose-behandelten Gruppe ab dem 3. Untersuchungstag einen mit ~ 29 µm wesentlich niedrigeren Gefäßdurchmesser auf als die Kontrollgruppe mit ~ 40 µm. Bis zum 14. Tag nach Implantation reduzierten sich die Gefäßdurchmesser auf ~ 13 µm in der Behandlungsgruppe und ~ 18 µm in der Kontrollgruppe (*Abbildung 22C*). Wie es für den Ausreifungsprozess von Gefäßen typisch ist, nahmen mit den sich reduzierenden Gefäßdurchmessern die Blutzellgeschwindigkeiten kontinuierlich zu [LASCHKE et al., 2014a]. Entsprechend stieg die Blutzellgeschwindigkeit in der Glukose-behandelten Gruppe von ~ 110 µm/s am 3. Untersuchungstag auf ~ 440 µm/s am 14. Untersuchungstag an, während in der Vehikel-behandelten Gruppe lediglich ein Anstieg von ~ 40 µm/s auf ~ 310 µm/s beobachtet werden konnte (*Abbildung 22D*).

Aus dem schnelleren Anstieg der Blutzellgeschwindigkeiten und der Reduktion der Gefäßdurchmesser in der Behandlungsgruppe resultierten signifikante Unterschiede der Scherrate ab dem 10. Tag nach Implantation. Die Scherrate war bis

zum letzten Untersuchungstag mit  $\sim 330 \text{ s}^{-1}$  in der Glukose-behandelten Gruppe mehr als doppelt so hoch wie mit  $\sim 150 \text{ s}^{-1}$  in der Kontrollgruppe (Abbildung 22E).



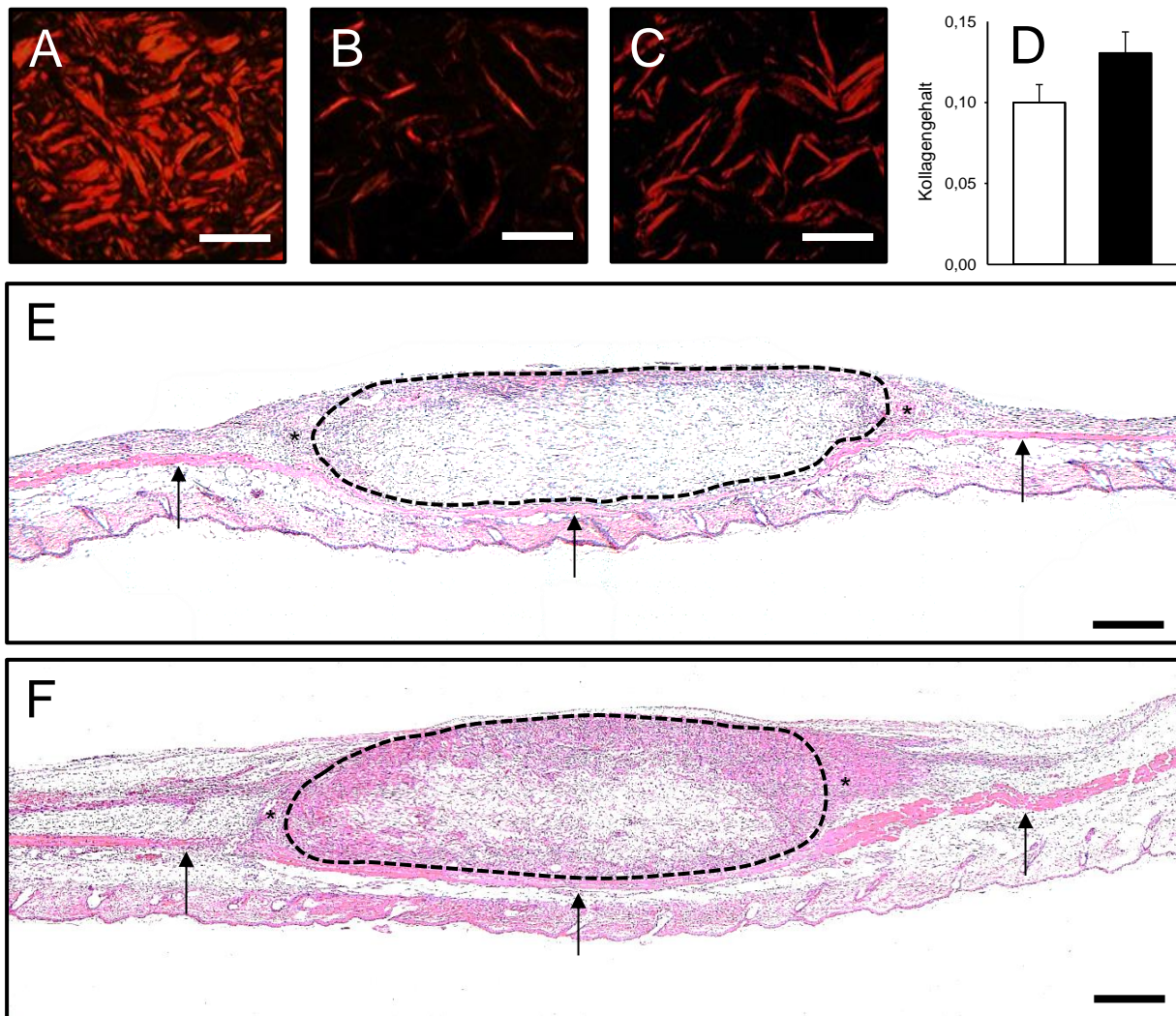
**Abbildung 22:** **A, B:** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (in Blaulicht-Epi-Illumination; kontrastverstärkt durch 0,1 ml 5 % FITC-Dextran i.v.) randomisiert ausgewählter Gefäße prävascularisierter Integra®-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (A), oder 30 mM Glukose- (B) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Maßstab: 35 µm. **C - E:** Gefäßdurchmesser (C; µm), Blutzellgeschwindigkeit (D; µm/s) und Scherrate (E; s<sup>-1</sup>) randomisiert ausgewählter Gefäße prävascularisierter Integra®-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (Kontrolle; weiße Kreise; n = 9) oder 30 mM Glukose- (schwarze Kreise; n = 9) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

### 6.3.2 Histologie und Immunhistochemie

Die Integra®-Scaffolds mit umgebendem Rückenhautgewebe wurden am 14. Tag nach Implantation exzidiert und für histologische Untersuchungen asserviert. In der Färbung mit Sirius Red zeigte sich ein höherer Kollagengehalt der Scaffolds der Glukose-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildungen 23A - D). Daneben konnte in der HE-Färbung ein dichteres Granulationsgewebe sowohl im Randbereich als auch in den Poren der Integra®-Scaffolds der Behandlungsgruppe beobachtet werden (Abbildungen 23E und F). Die Implantate mit den Glukose-exponierten

mikrovaskulären Fragmenten wurden demzufolge besser in das Empfängergewebe inkorporiert.

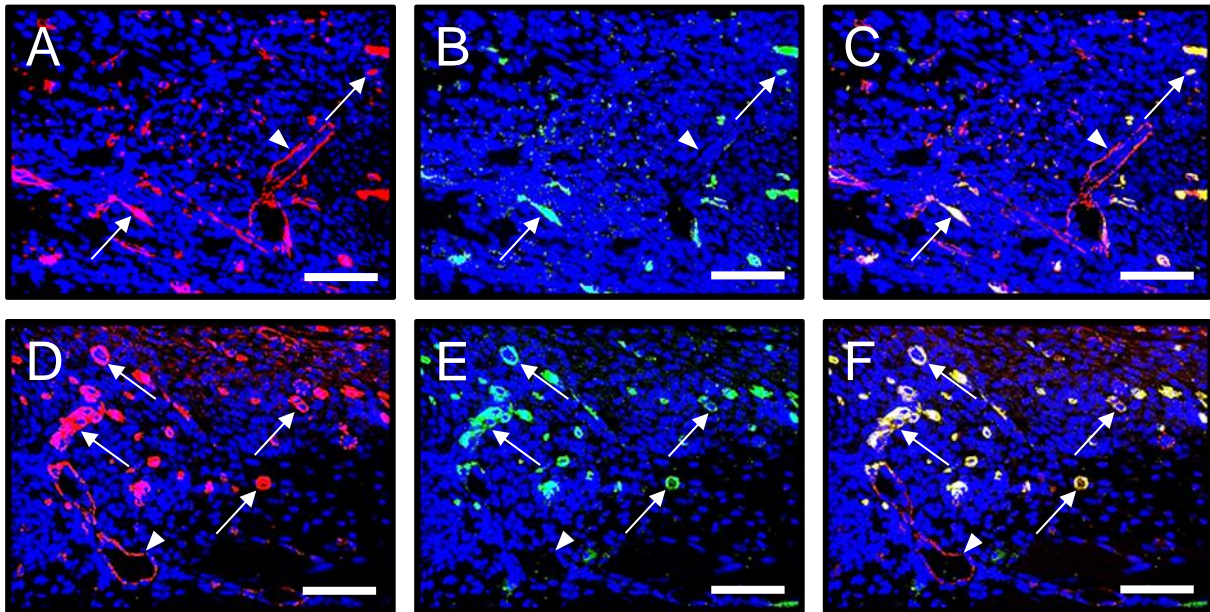
Des Weiteren zeigten detaillierte Untersuchungen des Granulationsgewebes mittels immunhistochemischer Färbungen (*Abbildung 24*) eine erhöhte Dichte CD31<sup>+</sup> Gefäße im Randbereich der Integra<sup>®</sup>-Scaffolds der Behandlungsgruppe. Im Zentrum war dieser Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer ausgeprägt



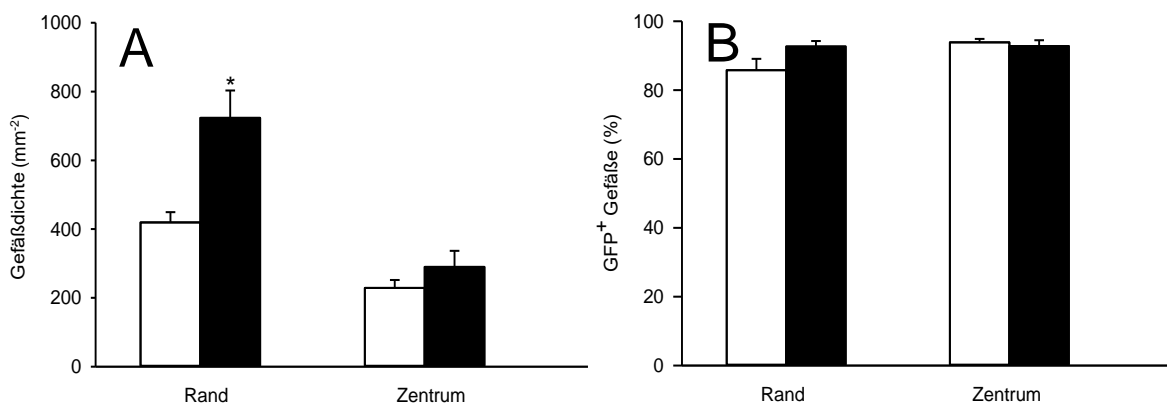
**Abbildung 23:** A - C: Sirius Red-gefärbte Schnitte der normalen Haut (A) sowie prävascularisierter Integra<sup>®</sup>-Scaffolds (B, C), die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 14. Tag nach Implantation. Zum Kollagengehalt der Haut (A) wurde der Kollagengehalt der Implantate (B bzw. C) in Relation gesetzt. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (B) oder 30 mM Glukose- (C) supplementierter UW-Lösung kultiviert. D: Mithilfe der Software cellSens Dimension 1.11 errechneter Kollagengehalt der prävascularisierten Integra<sup>®</sup>-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (Kontrolle; weißer Balken; n = 9) oder 30 mM Glukose- (schwarzer Balken; n = 9) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Mittelwert ± SEM. E, F: HE-gefärbte Schnitte prävascularisierter Integra<sup>®</sup>-Scaffolds (Rand mit gestrichelter Linie markiert), die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (E) oder 30 mM Glukose- (F) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Pfeile in E, F: quergestreifter Muskel, auf den die Integra<sup>®</sup>-Scaffolds platziert wurden; Sterne in E, F: Granulationsgewebe. Maßstab: A - C: 50 µm; E, F: 360 µm.

(Abbildung 25A). Darüber hinaus lag der Anteil GFP<sup>+</sup> Gefäße in beiden Gruppen sowohl im Rand- als auch Zentrumsbereich bei über 80 % (Abbildungen 24A - F und 25B).

Somit kann in beiden Gruppen auf ein gutes Überleben der mikrovaskulären Fragmente nach der 24-stündigen Behandlungsperiode mit nachfolgender Implantation geschlossen werden.



**Abbildung 24:** A - F: Immunhistochemisch gefärbte Schnitte des Granulationsgewebes im Randbereich prävaskularisierter Integra<sup>®</sup>-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (A - C) oder 30 mM Glukose- (D - F) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Die Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen CD31 (A, D; rot) zur Detektion der Endothelzellen, einem Antikörper gegen GFP (B, E; grün) sowie Hoechst 33342 (A - F; blau) zur Visualisierung der Zellkerne gefärbt. G und F wurden durch Überlagerung von A und B bzw. D und E erzeugt. Pfeile: CD31<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Gefäße; Pfeilspitzen: CD31<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup> Gefäße. Maßstab: 40 µm.



**Abbildung 25:** A, B: Gefäßdichte (A; mm<sup>2</sup>) und GFP<sup>+</sup> Gefäße (B; % von allen sichtbaren Gefäßen) im Randbereich und Zentrum prävaskularisierter Integra<sup>®</sup>-Scaffolds, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (Kontrolle; weiße Balken; n = 9) oder 30 mM Glukose- (schwarze Balken; n = 9) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.



### **6.3.3 *In vitro* Untersuchungen**

#### **6.3.3.1 *Proteinexpression mikrovaskulärer Fragmente***

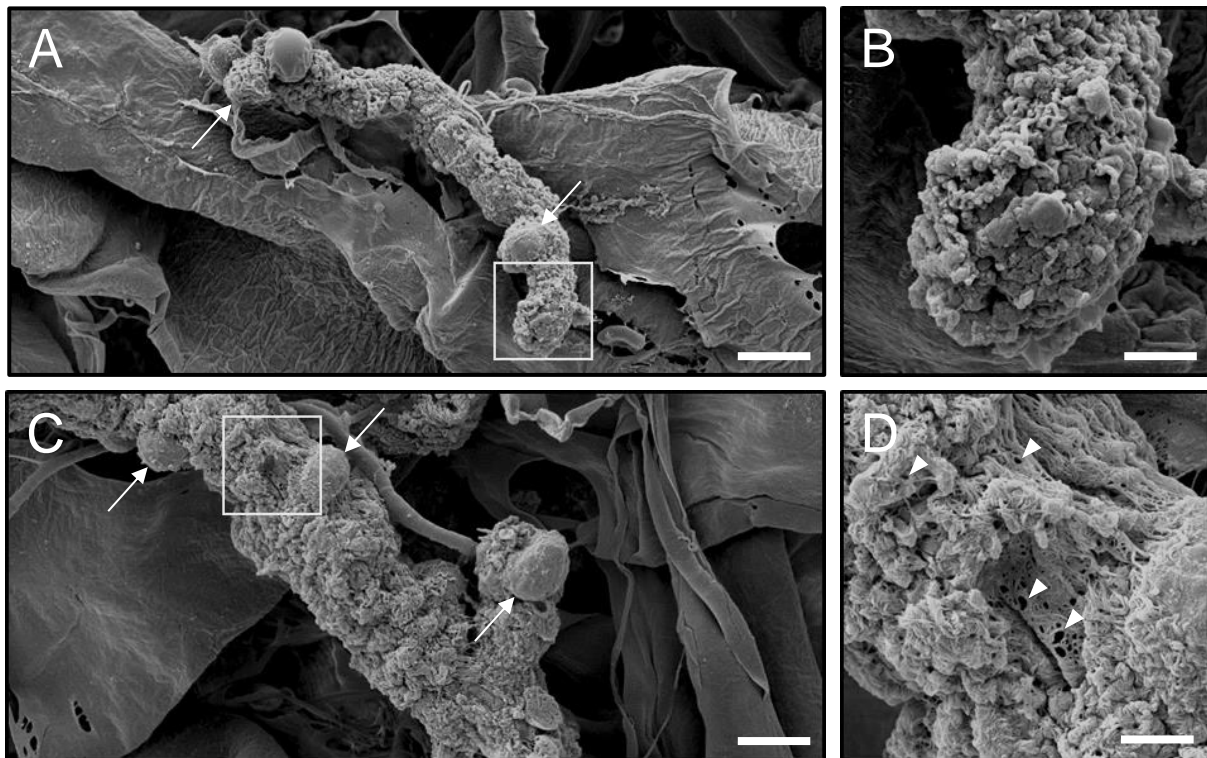
Um die Expression pro- und anti-angiogener Faktoren innerhalb der mikrovaskulären Fragmente beider Gruppen zu analysieren, wurde ein Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese-Array durchgeführt. Es wurden 53 verschiedene Proteine untersucht, welche Bestandteil angiogener Signalkaskaden sind. Der Array konnte zeigen, dass die mikrovaskulären Fragmente ein zum Teil deutlich abweichendes Expressionsmuster aufwiesen. So waren im Vergleich zu den Vehikel-behandelten mikrovaskulären Fragmenten die pro-angiogenen Proteine Endoglin, Interleukin (IL)-1 $\beta$  und Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1 durch Stimulation mit 30 mM Glukose am stärksten erhöht. Demgegenüber wurde der pro-angiogene Faktor Matrix Metalloproteinase (MMP)-8 in den Glukose-behandelten mikrovaskulären Fragmenten am stärksten herunterreguliert. Interessanterweise war das Protein Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase (TIMP)-1 auf der Seite der anti-angiogenen Faktoren am deutlichsten reduziert (*Tabelle 2*). TIMP-1 fungiert im Gewebe als Gegenspieler von MMP-8 [BREW et al., 2000].

#### **6.3.3.2 *Morphologie mikrovaskulärer Fragmente***

Auf Integra<sup>®</sup>-Scaffolds gesiedelte mikrovaskuläre Fragmente wurden mittels REM untersucht, um ihre Morphologie zu beurteilen (*Abbildung 26*). Hierbei konnten die mikrovaskulären Fragmente mit stabilisierenden Perizyten in den Poren der Scaffolds visualisiert werden (*Abbildungen 26A und C*). Die Fragmente beider Gruppen zeigten dabei eine vergleichbare Morphologie mit dem Unterschied, dass die Glukose-behandelten Fragmente zahlreiche Nanoporen in ihrer Gefäßwand aufwiesen (*Abbildungen 26B und D*). Diese Nanoporen deuten auf eine beginnende Auflösung der Gefäßwandintegrität mit konsekutiv gesteigerter vaskulärer Permeabilität hin, wie dies für frühe Phasen der Angiogenese charakteristisch ist [DÍAZ-FLORES et al., 2017].

<b>Protein</b>	<b>Expression (% der Kontrolle)</b>
<i>Pro-angiogen</i>	
Endoglin/CD105	203,2
IL-1beta	190,0
MCP-1/CCL2/JE	184,5
HGF	152,4
KC/CXCL1/CINC-1/GRO-alpha	148,9
EGF	128,0
Osteopontin/OPN	113,9
FGF basic/FGF-2	113,2
SDF-1/CXCL 12	110,7
Leptin/OB	107,3
GM-CSF	102,0
Angiogenin/ANG	101,7
FGF acid/FGF-1/ECGF/HBGF-1	99,8
Amphiregulin/AR	99,7
Angiopoietin-1/Ang-1	95,3
Coagulator Factor III/Tissue Factor/TF	95,3
Endothelin-1/ET-1	94,4
DLL4	92,5
MMP-9	90,9
CXCL 16	90,7
NOV/CCN3/IGFBP-9	90,6
KGF/FGF-7	90,1
IL-1alpha	89,9
IGFBP-2	89,7
IGFBP-1	87,4
VEGF B/VRF	87,2
Cyr61/CCN1, IGFBP-10	83,7
HB-EGF	83,6
VEGF/VPF	82,3
PDGF-AA	79,8
Fractalkine/CX3CL 1	79,3
Proliferin	67,2
IL-10/CSIF	67,0
MIP-1alpha	65,8
PD-ECGF	64,7
MMP-3	64,7
PIGF-2	62,2
IGFBP-3	60,1
MMP-8	38,7
<i>Anti-angiogen</i>	
Endostatin/Collagen VIII	148,8
Serpin E1/PAI-1	111,6
ADAMTS1/METH1	106,9
DPP IV/CD26	104,1
PDGF-AB/BB	103,0
Platelet Factor 4/CXCL4/PF4	102,6
Thrombospondin-2/TSP-2	83,8
Serpin F1/PEDF	79,5
Pentraxin-3/PTX3/TSG-14	74,3
Prolactin/PRL	66,5
TIMP-4	63,4
IP-10/CXCL 10	63,3
Angiopoietin-3/Ang-3	60,8
TIMP-1	42,6

**Tabelle 2:** Expression von 53 Angiogenese-assoziierten Proteinen in Glukose-behandelten mikrovaskulären Fragmenten (angegeben in Prozent der Vehikel-behandelten mikrovaskulären Fragmente; Kontrolle). Die Analyse erfolgte mittels Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese-Array. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (n = 2) oder 30 mM Glukose- (n = 2) supplementierter UW-Lösung kultiviert.

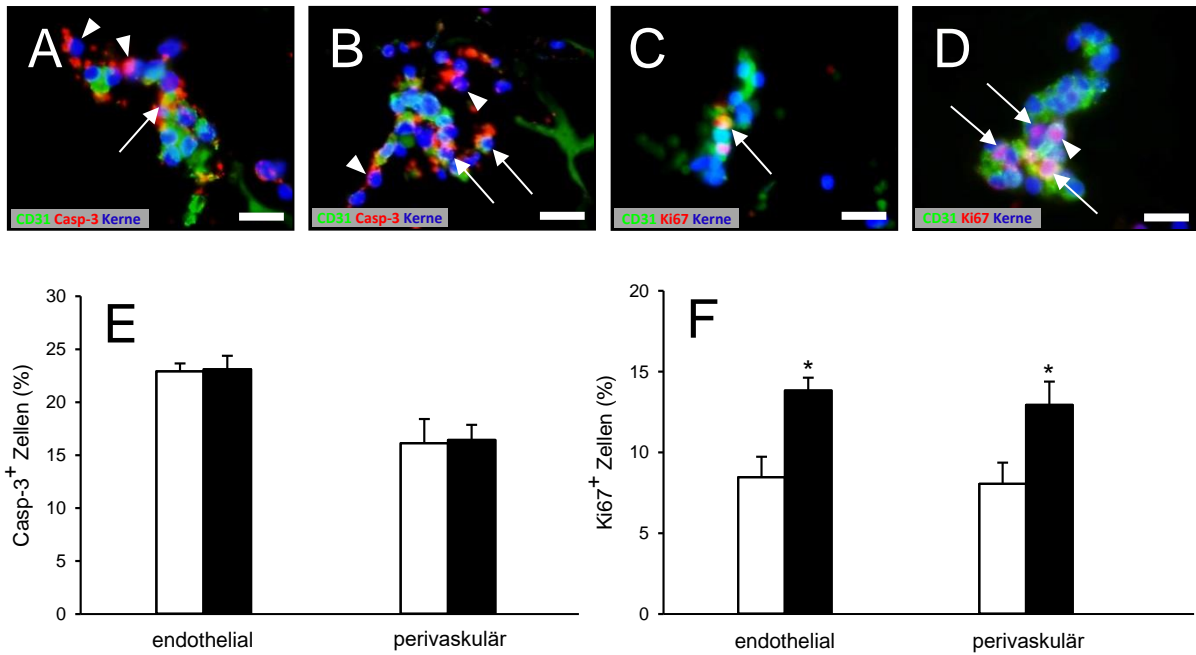


**Abbildung 26: A - D:** REM mikrovaskulärer Fragmente nach deren Siedlung auf Integra®-Scaffolds. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (A, B) oder 30 mM Glukose- (C, D) supplementierter UW-Lösung kultiviert. B und D stellen den Ausschnitt aus A und C (weißer Rahmen) vergrößert dar. Pfeile: Perizyten; Pfeilspitzen: Nanoporen. Maßstab: A, C: 11 µm; B, D: 3,4 µm.

### 6.3.3.3 Viabilität und Proliferation mikrovaskulärer Fragmente

Immunhistochemische Analysen ermöglichten den Vergleich der zellulären Viabilität und Proliferation von Vehikel- und Glukose-behandelten mikrovaskulären Fragmenten nach deren Siedlung auf Integra®-Scaffolds. Zu diesem Zweck wurden Doppelfluoreszenzfärbungen mit CD31-Casp-3 und CD31-Ki67 durchgeführt (Abbildungen 27A - D). Die Endothelzellen konnten dabei von den perivaskulären Zellen über deren Färbeverhalten unterschieden werden. So waren Endothelzellen CD31<sup>+</sup> und die von außen stabilisierenden perivaskulären Zellen CD31<sup>-</sup>.

In der Auswertung der immunhistochemisch angefärbten Präparate zeigte sich ein vergleichbarer Anteil an apoptotischen Casp-3<sup>+</sup> endothelialen und perivaskulären Zellen in beiden Gruppen (Abbildung 27E). Demgegenüber wurde in der Glukose-behandelten Gruppe ein statistisch signifikant erhöhter Anteil Ki67<sup>+</sup> endothelialer sowie perivaskulärer Zellen nachgewiesen (Abbildung 27F).



**Abbildung 27: A – D:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mikrovascularer Fragmente nach deren Siedlung auf Integra®-Scaffolds. Die mikrovascularen Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (A, C) oder 30 mM Glukose- (B, D) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Die Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen CD31 (A - D; grün) zur Detektion der Endothelzellen sowie Hoechst 33342 (A - D; blau) zur Visualisierung der Zellkerne gefärbt. Zusätzlich wurden apoptotische Zellen mit einem Antikörper gegen Casp-3 (A, B; rot) und proliferierende Zellen mit einem Antikörper gegen Ki67 (C, D; rot) dargestellt. Pfeile: Casp-3<sup>+</sup> (A, B) bzw. Ki67<sup>+</sup> (C, D) Endothelzellen; Pfeilspitzen: Casp-3<sup>+</sup> (A, B) bzw. Ki67<sup>+</sup> (C, D) perivaskuläre Zellen. Maßstab: 11 µm. **E, F:** Anteil Casp-3<sup>+</sup> (E; %) und Ki67<sup>+</sup> (F; %) endothelialer bzw. perivaskulärer Zellen in den mikrovascularen Fragmenten. Die mikrovascularen Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (Kontrolle; weiße Balken; n = 4) oder 30 mM Glukose- (schwarze Balken; n = 4) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

## 6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer Behandlung mit Insulin bzw. hochkonzentrierter Glukose auf mikrovascularen Fragmente analysiert.

Der **erste Studienabschnitt** erbrachte folgende Ergebnisse:

1. Eine Behandlung der mikrovascularen Fragmente mit Insulin hatte keinen wesentlichen Effekt auf die funktionelle Kapillardichte der sich neu entwickelnden mikrovascularen Netzwerke innerhalb besiedelter Integra®-Scaffolds. Demgegenüber bildete sich ein dichteres Granulationsgewebe im Randbereich der Implantate aus, wie mittels HE- und immunhistochemischer Färbung belegt werden konnte. Somit wurden die Scaffolds der Insulin-behandelten Gruppe besser in das Empfängergewebe inkorporiert. Darüber hinaus konnten

verbesserte mikrohämodynamische Verhältnisse in den Gefäßen der Behandlungsgruppe nachgewiesen werden. Dies zeigte sich in kleineren Gefäßdurchmessern, bei schneller ansteigenden Blutzellgeschwindigkeiten und Scherraten, was auf eine beschleunigte Ausreifung der mikrovaskulären Netzwerke in den Scaffolds mit Insulin-behandelten Gefäßfragmenten zurückgeführt werden kann.

2. Die Inkubation der mikrovaskulären Fragmente in Insulin + IGFbp4-supplementierter UW-Lösung führte zu Ergebnissen, die mit denen der Vehikel-behandelten Kontrollgruppe vergleichbar waren. Die Angiogenese-fördernden Effekte der Insulin-Behandlung konnten somit durch Zugabe von IGFbp4 verhindert werden.

Der **zweite Studienabschnitt** erbrachte folgende Ergebnisse:

1. Eine Behandlung der mikrovaskulären Fragmente mit hochkonzentrierter Glukose-Lösung führte zu einer signifikant erhöhten funktionellen Kapillardichte der sich neu entwickelnden Gefäßnetzwerke innerhalb besiedelter Integra®-Scaffolds. Darüber hinaus beschleunigte die Behandlung die Ausreifung der entstehenden mikrovaskulären Netzwerke, was sich an kleineren Gefäßdurchmessern sowie höheren Blutzellgeschwindigkeiten und Scherraten zeigte. Zusätzlich war die immunhistochemisch erfasste Gefäßdichte im Randbereich der Scaffolds der Behandlungsgruppe deutlich erhöht. In der HE-Färbung wurde ein dichteres Granulationsgewebe im Randbereich der Implantate nachgewiesen. Dies zeigte, dass diese Scaffolds im Vergleich zu den Kontrollscaffolds besser in das Empfängergewebe inkorporiert waren.
2. Die rasterelektronenmikroskopische Analyse zeigte eine vergleichbare Morphologie der mikrovaskulären Fragmente mit stabilisierenden Perizyten in beiden Versuchsgruppen. In höheren Vergrößerungen konnten jedoch zahlreiche Nanoporen in der Gefäßwand der Glukose-behandelten mikrovaskulären Fragmente detektiert werden. Diese Nanoporen weisen auf eine beginnende Auflösung der Gefäßwand hin, wie sie in Frühphasen der Angiogenese

stattfindet. Dies konnte in den Gefäßfragmenten der Kontrollgruppe nicht beobachtet werden.

3. Eine Behandlung der mikrovaskulären Fragmente mit hochkonzentrierter Glukose führte zur Hochregulierung der Expression mehrerer pro-angiogener Proteine. Möglicherweise wurde die verminderte Bildung des pro-angiogenen Faktors MMP-8 in der Behandlungsgruppe durch die reduzierte Expression des anti-angiogenen Faktors TIMP-1 kompensiert. Darüber hinaus stimulierte die Glukose-Behandlung die Proliferation mikrovaskulärer Fragmente, wohingegen die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe unbeeinträchtigt blieb.

## 7 DISKUSSION

### 7.1 Diskussion von Material und Methoden

#### 7.1.1 Rückenhautkammermodell

Zur Analyse des Vaskularisierungspotentials der unterschiedlich behandelten mikrovaskulären Fragmente wurde in der vorliegenden Arbeit auf das Modell der Rückenhautkammer zurückgegriffen. Dieses ermöglichte es, den Zusammenschluss mikrovaskulärer Fragmente zu einem Gefäßnetzwerk am lebenden Organismus zu untersuchen.

SANDISON entwarf im Jahr 1924 ein transparentes Fenster für das Kaninchenohr, womit physiologische zelluläre Prozesse *in vivo* analysiert werden konnten. Dieses Modell wurde 1943 von ALGIRE für die Anwendung an der Maus weiterentwickelt. Hiermit wurde die repetitive Untersuchung von Fett- und Bindegewebe sowie quergestreiftem Hautmuskel ermöglicht. Inzwischen werden solche Beobachtungsfenster auch bei anderen Tieren, wie dem Hamster oder der Ratte, präpariert [GREENBLATT, 1972; PAPENFUSS et al., 1979; FUNK et al., 1986]. Durch Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen wie hochmolekulare FITC-Dextrane können dabei unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie Daten zur Gefäßdichte und Mikrohämodynamik gewonnen werden [FENG et al., 2014]. Um die Messungen dabei nicht zu verfälschen, muss darauf geachtet werden, dass sowohl die Kammerpräparation als auch das Kammermaterial nicht zu einer Störung der Gewebephysiologie führt. Aus diesem Grund bekommen die Tiere nach Abschluss der Kammerimplantation 48 h Zeit, um sich von dem chirurgischen Trauma zu erholen. Außerdem wurden die früher verwendeten Kammern aus rostfreiem Stahl bzw. Aluminium inzwischen durch Titankammern ersetzt. Letztere bieten bei einer guten Biokompatibilität und einer geringeren Wärmeleitfähigkeit auch ein höheres Maß an Stabilität [SCHREITER et al., 2017].

Heutzutage ist die Rückenhautkammer ein etabliertes Modell im Bereich des Tissue Engineerings [LASCHKE & MENGER, 2016b] und vielen anderen Forschungszweigen. Mithilfe von Rückenhautkammern kann neben der Vaskularisierung synthetischer Biomaterialien [LASCHKE et al., 2016] auch die Vaskularisierung von Tumorgewebe [VAJKOCZY et al., 1998, 2000], Langerhans-Inseln

[MENGER et al., 1989, 1990, 1991], Milz, Myokard und spongiösem Knochen [FUNK et al., 1986], Stammzell-Sphäroiden [MOOSMANN et al., 2005], Ovarialfollikeln [LASCHKE et al., 2002] sowie Endometriumgewebe [LASCHKE et al., 2005] untersucht werden. Die in der Vergangenheit häufig dafür eingesetzten Hamster bieten den Vorteil, dass die Kammerpräparation aufgrund weniger vaskulärer Querverbindungen zwischen den zu präparierenden Gewebeschichten vergleichsweise einfach ist. Außerdem lassen sich durch den dünneren Unterhautmuskel qualitativ hochwertigere mikroskopische Bilder aufnehmen als in der Ratte oder der Maus. Trotzdem werden Rückenhautkammern inzwischen vermehrt in Mäusen angewandt. Dies liegt daran, dass Mäuse einfacher in der Haltung sind. Weiterhin sind sie genetisch besser charakterisiert als andere Spezies. So existieren für Mäuse eine Vielzahl von transgenen Linien, Knockout-Stämmen sowie monoklonalen Antikörpern [LASCHKE et al., 2011].

Um die Mikrozirkulation von Gewebe *in vivo* beurteilen zu können, stehen sowohl akute als auch chronische Modelle zur Verfügung. Mithilfe akuter Präparationen konnte in der Vergangenheit bereits die Mikrozirkulation der Lunge [McCORMACK et al., 2000; SCHNEIDER et al., 2001; TABUCHI et al., 2008], der Leber [TSUKADA & SUEMATSU, 2012] und der Muskulatur [LOEB et al., 1997] untersucht werden. Dabei wird jedoch nur ein zeitlich begrenzter Einblick in die Mikrozirkulation ermöglicht, da die Tiere aufgrund der Invasivität akuter Präparationen im Anschluss eingeschläfert werden müssen. Demgegenüber steht das chronische Modell der Rückenhautkammer, welches über einen Zeitraum von bis zu drei Wochen repetitive Analysen ermöglicht. Speziell für die longitudinale Beurteilung mikrovaskulärer Prozesse eignet sich die Rückenhautkammer somit in besonderem Maße [LASCHKE et al., 2011]. Zudem bietet das herausnehmbare Deckglas den Vorteil, dass jederzeit Zugang zum Beobachtungsfenster geschaffen werden kann. Die Implantation von Biomaterialien [RÜCKER et al., 2006] oder die lokale Applikation Angiogenese-fördernder Substanzen [LASCHKE et al., 2014b] gestaltet sich somit verhältnismäßig einfach.

In der Rückenhautkammer können lediglich Implantate mit einer maximalen Größe von ca. 3 x 3 x 1 mm untersucht werden. Der Grund für diese Restriktion ist, dass größere Implantate den luftdichten Verschluss durch das Deckglas behindern und darüber hinaus eine Beurteilung des Implantat-umgebenden Gewebes einschränken würden. Folglich ist der Einsatz von Implantatgrößen, wie sie in der Klinik Anwendung finden, in diesem Modell nicht möglich. Dennoch ermöglicht der



standardisierte Versuchsaufbau eine gute Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien im Rückenhautkammermodell [LASCHKE & MENGER, 2016b].

### 7.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist eine Untersuchungstechnik, die idealerweise für die Auswertung dynamischer Prozesse geeignet ist. So können mittels intravitalmikroskopischer Verfahren Zellmigration [CONDEELIS & SEGALL, 2003] sowie Zellproliferation und Apoptose [PITTET & WEISSLEDER, 2011] untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie Analysen der Mikrozirkulation durchgeführt. In Epi-Illuminationstechnik war damit eine direkte Visualisierung des Gefäßsystems möglich.

Neben dieser Technik stehen auch indirekte Methoden zur Untersuchung der Mikrozirkulation zur Verfügung. Dazu gehören zum Beispiel die Mikrosphären-Technik [ZWISSLER et al., 1991], die Xenon-Auswaschmethode [ANDRADE et al., 1992], die Elektronen-Spin-Resonanz-Messung [WEISSMANN et al., 2005] oder die Thermographie mittels Infrarotstrahlung [CHOJNOWSKI, 2017]. Diese Methoden erlauben jedoch keine detaillierte Analyse mikrohämodynamischer Parameter und kamen daher in der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz.

Als Fluoreszenzfarbstoff diente in der vorliegenden Arbeit der hochmolekulare Plasma-Marker FITC-Dextran 150.000 (5 %), welcher vor der Durchführung der Intravitalmikroskopie in den retroorbitalen Venenplexus der Mäuse injiziert wurde. Bei einer Grundfrequenz von ca. 600 Schlägen pro Minute dauert eine vollständige Blutzirkulation im kardiovaskulären System von C57BL/6 Mäusen weniger als 0,125 Sekunden [SWOAP & GUTILLA, 2009; LI et al., 2011]. Somit konnte direkt im Anschluss an die Applikation des FITC-Dextrans mit den mikroskopischen Aufnahmen begonnen werden. Diese wurden auf DVD gespeichert, um die zeitaufwändigen Analysen der mikrohämodynamischen Parameter zeitlich versetzt zur Aufzeichnung zu ermöglichen. Durch diese Vorgehensweise konnte die Narkosedauer der Versuchstiere auf ein Minimum beschränkt werden.

Fluoreszenzfarbstoffe können unter Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge phototoxische Effekte auf Gewebe ausüben [OLSSON et al., 1989; ZDOLSEK et al., 1990; ZDOLSEK, 1993]. So ruft zum Beispiel die Belichtung des FITC-Dextran-gefärbten Blutplasmas mit blauem Licht der Wellenlänge 488 nm eine

Thrombozytenaggregation mit anschließendem Blutdruckabfall durch Thrombusbildung hervor [BEKKER et al., 1986]. Außerdem führen die phototoxischen Effekte zu einer verringerten funktionellen Kapillardichte [FRIESENECKER et al., 1994], Extravasation und Mikrozirkulationsstörungen [WAHL et al., 1985], arteriellen Vasospasmen [SAETZLER et al., 1997], Perfusionsausfällen sowie zu einer gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion [STEINBAUER et al., 2000]. Um diese unphysiologischen Effekte zu verhindern, wurden in der vorliegenden Arbeit lediglich 0,1 ml FITC-Dextran pro Untersuchung verwendet und die Belichtungszeit auf näherungsweise 20 min beschränkt. Somit gelang die Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter unter physiologischen Bedingungen.

Insgesamt erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie sowohl die Visualisierung des aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen aufgebauten Gefäßsystems des Rückenhautkammergewebes als auch der sich neu entwickelnden Gefäßnetzwerke innerhalb der implantierten, prä-vaskularisierten Integra<sup>®</sup>-Scaffolds.

## **7.2 Diskussion der Ergebnisse**

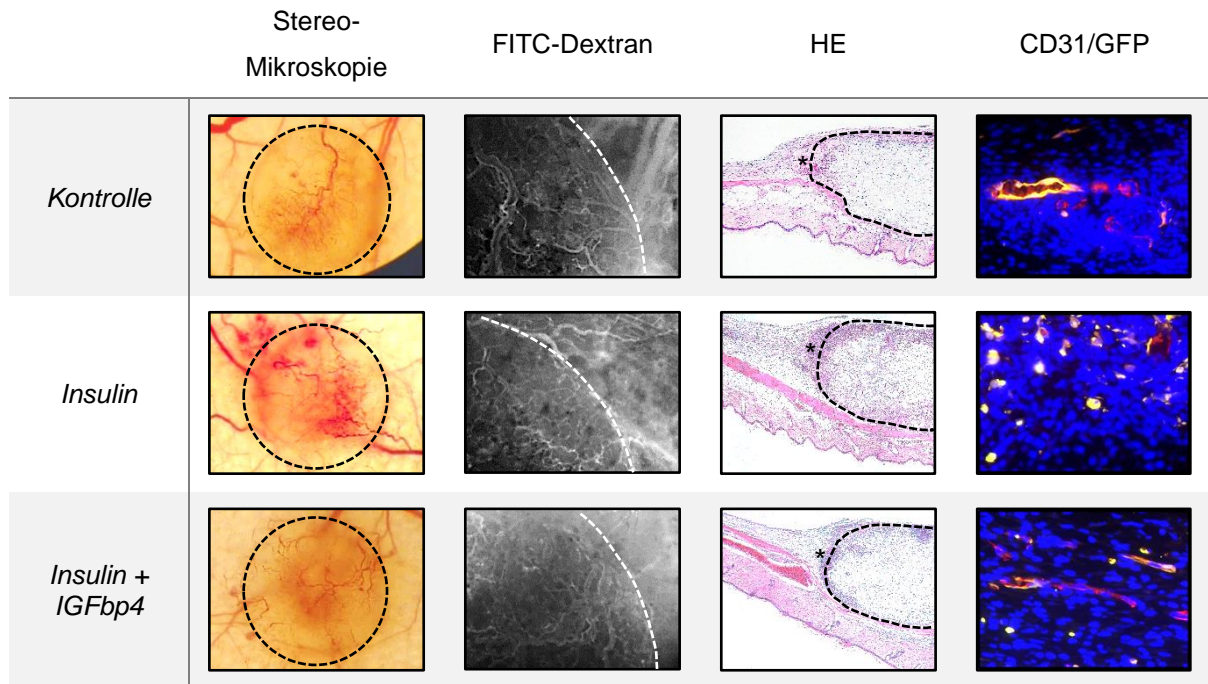
### **7.2.1 Insulin-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente**

Aus Fettgewebe gewonnene mikrovaskuläre Fragmente sind vielversprechende Vaskularisierungseinheiten für Anwendungen im Bereich des Tissue Engineerings. Sie konnten bereits die Blutversorgung von Hautlappen [NAKANO et al., 1998], epikardialen Patches [SHEPHERD et al., 2007] und transplantierten Langerhans'schen Inseln [HISCOX et al., 2008] verbessern. Dabei ist es möglich, sie für 24 h zu kultivieren, ohne ihre typische Gefäßmorphologie zu verändern. Diese Zeit kann genutzt werden, um sie angiogen zu stimulieren [LASCHKE et al., 2019a]. Forschungsergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass Insulin über pro-angiogene Signalkaskaden eine solche Stimulation bewirken kann. So konnten BUDI et al. [2015] nachweisen, dass Insulin über Akt-vermittelte Autophosphorylierung des GTPase-aktivierenden Proteins AS160 zu einer Translokation von Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ -Rezeptoren aus intrazellulären Vesikeln auf die Plasmamembran der Zelloberfläche führt. Die hieraus resultierende erhöhte Sensitivität gegenüber TGF- $\beta$  führt über eine verstärkte Smad Aktivierung zu einer gesteigerten Angiogenese in humanen Endothelzellen [BUDI et al.,

2019]. Weitere pro-angiogene Signalmoleküle, welche durch Insulinexposition in Endothelzellen hochreguliert werden, sind VEGF [YAMAGISHI et al., 1999; SHRADER et al., 2009] und Angiopoietin (Ang) [ESCUDEO et al., 2017]. Die Synthese dieser beiden Moleküle verläuft über Signalwege, die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) bzw. Mitogen-Activated Protein-Kinasen (MAPK) und fortfolgende intrazelluläre Phosphorylierungskaskaden enthalten [ESCUDEO et al., 2017]. Außerdem wird durch die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor eine direkte, von anderen Wachstumsfaktoren unabhängige, Aktivierung von PI3K induziert, welche über die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) endotheliale Migrations- und Proliferationsprozesse induziert [LIU et al., 2009; ESCUDEO et al., 2017]. Weiterhin ist Insulin auch an der Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten beteiligt. So gibt es Hinweise dafür, dass Insulin über den Insulinrezeptor Perizyten zur vermehrten Expression und Ausschüttung von VEGF stimuliert. VEGF initiiert wiederum über den VEGF-Rezeptor angiogene Prozesse in Endothelzellen. [ESCUDEO et al., 2017]. Darüber hinaus ist Insulin als wichtiges Stoffwechselformon direkt am Metabolismus von einzelnen Endothel- und perivaskulären Zellen beteiligt, indem es die Konzentration zirkulierender Glukose, Lipide und Proteine reguliert [ESCUDEO et al., 2017].

Die mikrovaskulären Fragmente wurden in der vorliegenden Arbeit aus dem Nebenhodenfettgewebe von transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J Mäusen isoliert. Hinsichtlich seiner angiogenen Stimulierbarkeit nimmt das Gefäßsystem des Fettgewebes eine Sonderstellung ein. So besitzt es die Eigenschaft, auf metabolische Reize mit Wachstum zu reagieren [CAO, 2013]. Beispielsweise führt eine hochkalorische, fettreiche Ernährungsweise zu erhöhten Insulinkonzentrationen, die das Gefäßsystem des Fettgewebes proliferieren lassen. Vermittelt wird dieser Effekt über erhöhte IGF-1-Ausschüttung und eine Drosselung der IGFbp4-Sekretion [GEALEKMAN et al., 2014]. Dieser Mechanismus war auch der Ausgangspunkt für die durchgeführten Untersuchungen **im ersten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit.

Entsprechend dem oben beschriebenen pro-angiogenen Potential des Insulins konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Kultivierung mit Insulin zu einer leichten Steigerung der Vaskularisierungskapazität mikrovaskulärer Fragmente führt (*Tabelle 3*).



**Tabelle 3:** Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten Studienabschnitts. Von links nach rechts: Aufnahmen aus Stereo-Mikroskopie, intravitale Fluoreszenzmikroskopie (in Blaulicht-Epi-Illumination; kontrastverstärkt durch 0,1 ml 5 % FITC-Dextran i.v.), Histologie und Immunhistochemie. Die Vaskularisierung der mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelten Integra®-Scaffolds wurde im Rückenhautkammermodell der Maus untersucht. Nach Abschluss des 14-tägigen *in vivo* Untersuchungszeitraums erfolgte die Asservierung des Rückenhautkammergewebes und die Färbung mit HE sowie Antikörpern gegen CD31 und GFP. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (Kontrolle), Insulin- oder Insulin + IGFbp4-supplementierter UW-Lösung kultiviert. Diese Behandlung führte zu einer vergleichbaren Vaskularisierung im Zentrum der Integra®-Scaffolds an Tag 14. Im Randbereich zeigte sich in der Behandlungsgruppe mit Insulin eine verstärkte Vaskularisierung und Inkorporation der Integra®-Scaffolds in das Gewebe der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen.

So konnten während des 14-tägigen *in vivo* Untersuchungszeitraums im Rückenhautkammermodell der Maus bei vergleichbaren funktionellen Kapillardichten gesteigerte Blutzellgeschwindigkeiten und Scherraten in der Behandlungsgruppe mit Insulin gefunden werden. Nach Abschluss der *in vivo* Analysen wurde das Rückenhautkammergewebe für histologische Färbungen mit HE und immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD31 und GFP asserviert. Hierbei konnte in der Insulin-Gruppe eine etwa 35 % Steigerung der Dichte CD31+ Gefäße im Randbereich implantierter Integra®-Scaffolds nachgewiesen werden. Die verbesserte Vaskularisierung führte darüber hinaus auch zu einem dichteren Granulationsgewebe, wie mittels HE-Färbung nachgewiesen wurde. In Analogie zu diesen Ergebnissen konnten LIU et al. [2009] zeigen, dass die Injektion von Insulin in die Haut von Mäusen zu verstärktem Gefäßwachstum führt. Die Steigerung der Angiogenese ist dabei erforderlich für die Bildung eines Granulationsgewebes [LIU et al., 2009]. Die relative Insulinresistenz bei Diabetes mellitus Typ 2 resultiert außerdem

häufig in einer Hyperinsulinämie, auch als Folge einer Überbehandlung mit dem Hormon [JIA et al., 2016]. Somit decken sich die Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit damit, dass bei Diabetikern häufig Komplikationen durch vermehrte Neovaskularisation in Verbindung mit Fibrose hervorgerufen werden. Zu nennen sind hier in erster Linie Gefäßneubildungen und Bindegewebsvermehrung in der Retina und Niere von Diabetikern [MARTIN et al., 2003; NAKAGAWA et al., 2009; FORBES & COOPER, 2013].

Der Anteil GFP<sup>+</sup> Gefäße lag sowohl im Randbereich als auch im Zentrum der Scaffolds aller drei Gruppen bei über 80 %. Die Vaskularisierung der Implantate erfolgte somit hauptsächlich über die GFP<sup>+</sup> mikrovaskulären Fragmente der Spendertiere. Interessanterweise zeigte sich trotz der erhöhten Dichte von GFP<sup>+</sup> Gefäßen im Randbereich der Behandlungsgruppe ein nahezu identischer prozentualer Anteil der GFP<sup>+</sup> Gefäße in diesem Bereich. Daher kann geschlussfolgert werden, dass durch die Behandlung der GFP<sup>+</sup> mikrovaskulären Fragmente mit Insulin nicht nur deren Angiogenesekapazität, sondern auch die Angiogenese von GFP<sup>-</sup> Gefäßen des angrenzenden Empfängergewebes gesteigert wird.

Ferner wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie während der zweiwöchigen *in vivo* Untersuchungszeit ein beschleunigter vaskulärer Reifungsprozess nach Aktivierung der mikrovaskulären Fragmente mit Insulin nachgewiesen, welcher sich durch geringere Gefäßdurchmesser und höhere Blutzellgeschwindigkeiten sowie Scherraten zeigte. Dabei stellen erhöhte Scherraten ebenfalls einen pro-angiogenen Reiz dar. Durch diese Art von endotheliale Stress bilden sich neue Gefäßsprossen aus, die den kumulativen Gefäßdurchmesser des gesamten Gefäßsystems erhöhen und somit die Scherraten wieder normalisieren sollen [GALIE et al., 2014].

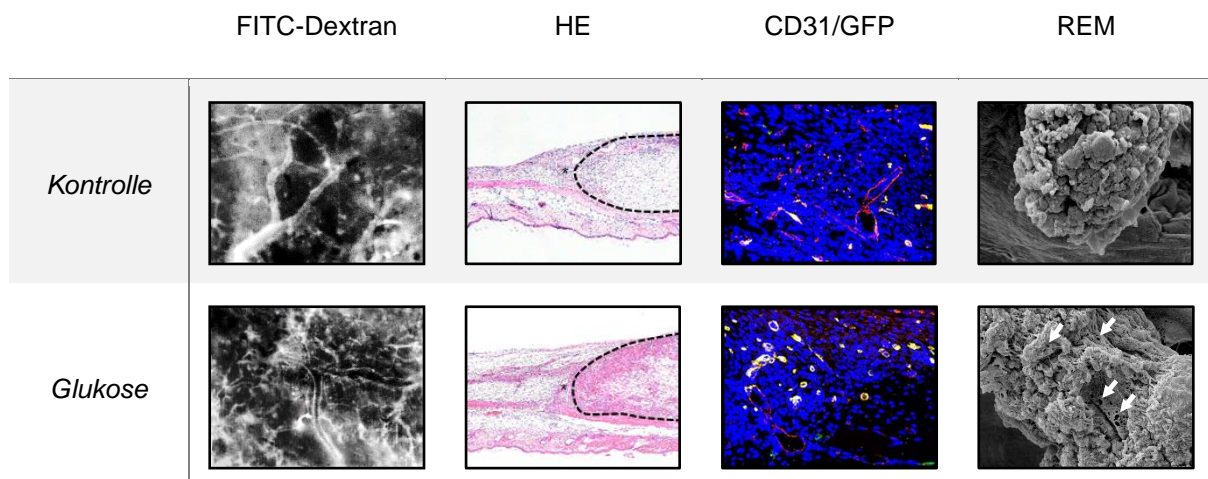
### **7.2.2 Glukose-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente**

**Im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass hohe Glukosekonzentrationen eine starke pro-angiogene Wirkung auf mikrovaskuläre Fragmente ausüben (*Tabelle 4*).

Entsprechend wiesen die mikrovaskulären Fragmente nach Glukose-Behandlung gesteigerte Proliferationsraten ihrer Endothel- und perivaskulären Zellen auf. Weiterhin zeigte sich im Rückenhautkammermodell der Maus mithilfe

intravitalfluoreszenzmikroskopischer Analysen eine schnellere Ausreifung der in hochkonzentrierter Glukose kultivierten mikrovaskulären Fragmente zu einem dichteren Gefäßnetzwerk in den Integra®-Scaffolds. Auch mittels eines Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese-Arrays konnte diese pro-angiogene Stimulation nachgewiesen werden. So konnte nach Stimulation der mikrovaskulären Fragmente mit hochkonzentrierter Glukose ein verändertes Sekretionsmuster pro- und anti-angiogener Proteine beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung mit hochkonzentrierter Glukose die Vaskularisierungskapazität mikrovaskulärer Fragmente deutlich verbessern kann. Die Kultivierung mikrovaskulärer Fragmente in Glukose-haltigen Medien könnte daher eine gute Alternative zum Einsatz teurer und nebenwirkungsreicher, rekombinanter Wachstumsfaktoren werden [WITSCH et al., 2010; LEE et al., 2011; MITCHELL et al., 2016].



**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Ergebnisse des zweiten Studienabschnitts. Von links nach rechts: Aufnahmen aus intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (in Blaulicht-Epi-Illumination; kontrastverstärkt durch 0,1 ml 5 % FITC-Dextran i.v.), Histologie, Immunhistochemie und REM. Die Vaskularisierung der mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelten Integra®-Scaffolds wurde im Rückenhautkammermodell der Maus untersucht. Nach Abschluss des 14-tägigen in vivo Untersuchungszeitraums erfolgte die Asservierung des Rückenhautkammergewebes und die Färbung mit HE sowie Antikörpern gegen CD31 und GFP. Weiterhin wurde die Morphologie der mikrovaskulären Fragmente mittels REM analysiert. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (Kontrolle) oder 30 mM Glukose-supplementierter UW-Lösung kultiviert. Diese Behandlung führte zu einer deutlichen Steigerung der Vaskularisierung und Inkorporation der Integra®-Scaffolds in das Gewebe der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen an Tag 14. Als morphologisches Korrelat dieser Aktivierung zeigten sich rasterelektronenmikroskopisch zahlreiche Nanoporen (Pfeile) in der Gefäßwand der Glukose-exponierten mikrovaskulären Fragmente.

Der pro-angiogene Effekt erhöhter Glukosekonzentrationen ist bereits aus der Diabetesforschung bekannt. Um die Mechanismen der pathologischen Neovaskularisation beim Krankheitsbild der diabetischen Retinopathie zu

untersuchen, wurden bisher allerdings vorrangig retinale Endothelzellen verwendet [BETTS-OBREGON et al., 2016; FERNANDO et al., 2018; QIU et al., 2018; SHI et al., 2019]. In der vorliegenden Arbeit wurden nun erstmals aus Fettgewebe isolierte mikrovaskuläre Fragmente zur Analyse einer Glukose-induzierten Angiogenese eingesetzt. Diese haben im Gegensatz zu Endothelzell-Monokulturen den entscheidenden Vorteil, dass sie neben Endothelzellen auch Perizyten enthalten, welche einen wichtigen Anteil an der Pathophysiologie Diabetes-assoziiierter Komplikationen haben. So findet man bei Diabetespatienten eine Reduktion der retinalen Perizyten, was zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und gehäufterem Auftreten kapillärer Mikroaneurysmen führt [HAMMES et al., 2002]. Mikrovaskuläre Fragmente bieten demzufolge realistischere Voraussetzungen zur Erforschung vaskulärer Komplikationen bei Diabetes. Folglich könnten sie zukünftig auch in der Diabetesforschung eingesetzt werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorangegangener Studien konnte in der vorliegenden Arbeit ein höherer Anteil an Ki67<sup>+</sup> Endothelzellen in Glukose-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten nachgewiesen werden [FERNANDO et al., 2018; QIU et al., 2018]. Überraschenderweise zeigte sich dabei auch eine erhöhte Proliferationsrate der Perizyten. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass hohe Glukosekonzentrationen jedoch eher die Apoptose und weniger die Proliferation steigern, weshalb die Perizytenpopulation in der Retina von Diabetespatienten stark abnimmt [HAMMES et al., 2002; ROMEO et al., 2002; SUAREZ et al., 2015; PYUN et al., 2017]. Demnach konnte erstmals ein gegensätzlicher Effekt der Glukose auf die unterschiedlich spezialisierten Perizyten in Retina und Fettgewebe detektiert werden. Der wahrscheinlichste Grund für diese Beobachtung ist, dass die mikrovaskulären Fragmente auch mesenchymale Stammzellen enthalten. Diese Stammzellen können nach entsprechender Aktivierung zu Perizyten differenzieren und somit die neugebildeten Gefäße stabilisieren [MENDEL et al., 2013; HAJMOUSA et al., 2018; TERLIZZI et al., 2018].

Des Weiteren konnten mittels REM in der Gefäßwand der Glukose-behandelten mikrovaskulären Fragmente zahlreiche Nanoporen nachgewiesen werden. Diese können einerseits als Glukose-induzierter Zellschaden, beispielsweise durch ROS, interpretiert werden. Andererseits erscheint es aufgrund des verbesserten Vaskularisierungspotentials der Glukose-behandelten Gefäßfragmente wahrscheinlicher, dass die Nanoporen ein morphologisches Korrelat früher Angiogenese-Stadien

darstellen. So geht die Angiogenese typischerweise in frühen Stadien mit einer Auflösung der Gefäßwandintegrität und erhöhter vaskulärer Permeabilität sowie einer Desintegration der Basallamina einher [DÍAZ-FLORES et al., 2017]. Darüber hinaus könnten die Nanoporen möglicherweise auch die klinisch auftretenden Hämorrhagien beim Krankheitsbild der diabetischen Retinopathie erklären [MURUGESAN et al., 2015]. Eine längere Exposition gegenüber supraphysiologischen Glukosekonzentrationen führt außerdem zu weiteren pathologischen Gefäßveränderungen wie Mikroaneurysmen, Störungen der Blut-Retina-Schranke mit sequentiellen Ablagerungen von Blutplasmafetten, den sogenannten harten Exsudaten, Mikrothrombosen sowie intraretinalen mikrovaskulären Anomalien [BEK & LUND-ANDERSEN, 1990; MURUGESAN et al., 2015; AMIN et al., 2016]. Entsprechend würden chronisch erhöhte Glukose-Konzentrationen das regenerative Potential mikrovaskulärer Fragmente voraussichtlich negativ beeinträchtigen.

Um zu einem dichten Gefäßnetzwerk heranzureifen, müssen sich die mikrovaskulären Fragmente zunächst durch Aussprossung miteinander verbinden [NUNES et al., 2010]. Dabei reagieren die beteiligten Zellen auf ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher pro- und anti-angiogener Faktoren [WEIS & CHERESH, 2011]. Die Veränderung der Expression Angiogenese-assoziiierter Proteine in mikrovaskulären Fragmenten durch eine Glukose-Behandlung wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese-Array analysiert. Insbesondere die pro-angiogenen Proteine Endoglin, IL-1 $\beta$  und MCP-1 zeigten nach Glukose-Exposition eine starke Hochregulation. Endoglin ist ein integrales Membranglykoprotein, das im Zuge angiogener Prozesse in proliferierenden Endothelzellen hochreguliert wird [LÓPEZ-NOVOA & BERNABEU, 2010]. Dabei fördert es über die TGF- $\beta$ /Activin receptor-Like Kinase (ALK)1/Smad1/5/8-Signalkaskade sowohl die Proliferation als auch die Migration von Endothelzellen [KASPRZAK & ADAMEK, 2018]. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und MCP-1 sind für die Rekrutierung unterschiedlicher Immunzellen verantwortlich [FENINI et al., 2017; BIANCONI et al., 2018]. Dabei wirkt eine geringe Entzündungsaktivität stimulierend auf die Angiogenese des Empfängergewebes [RÜCKER et al., 2006]. Entsprechend sind auch für IL-1 $\beta$  und MCP-1 Angiogenese-fördernde Effekte beschrieben [HAYASHI et al., 2015; SUN et al., 2016; MOHR et al., 2017]. Interessanterweise zeigt sich im Prozess der Entstehung Diabetes-assoziiierter Komplikationen, wie der diabetischen Retinopathie, ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Inflammation und Angiogenese [CAPITÃO & SOARES, 2016].



Ferner wurde in der Behandlungsgruppe auf der Seite der pro-angiogenen Faktoren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Reduktion der MMP-8-Expression um ca. 60 % beobachtet. Jedoch führte die verminderte Expression von MMP-8 nicht zu einer Hemmung der angiogenen Aktivität Glukose-behandelter mikrovaskulärer Fragmente. Dies liegt möglicherweise daran, dass anti-angiogene Faktoren wie TIMP-1 in der Glukose-exponierten Gruppe ebenfalls deutlich herunterreguliert wurden. TIMP-1 bindet im menschlichen Organismus an MMPs und inhibiert hierdurch deren Wirkung [BREW et al., 2000].

Wie bereits im ersten Studienabschnitt konnte mittels immunhistochemischer Analysen eine fast vollständige Vaskularisierung der Scaffolds beider Gruppen durch die GFP<sup>+</sup> mikrovaskulären Fragmente nachgewiesen werden. In Analogie zu den in den *in vitro* Untersuchungen nachgewiesenen pro-angiogenen Effekten der Stimulation mit Glukose zeigte sich zudem eine verbesserte Vaskularisierung prävaskularisierter Integra<sup>®</sup>-Scaffolds *in vivo*. Neben den oben beschriebenen Auswirkungen könnten zusätzliche Mechanismen an diesem positiven Resultat beteiligt sein. So konnten YOON et al. [2014] zeigen, dass Sphäroide, die Endothelzellen und glatte Muskelzellen enthalten, nach Exposition gegenüber hochkonzentrierter Glukose eine größere Anzahl verzweigter Gefäßsprossen ausbilden. Diese dichtere Vaskularisierung wird über die Induktion von Jagged 1 sowie die Suppression von Notch1 in den Endothelzellen vermittelt [YOON et al., 2014]. Dabei wird die Differenzierung der Endothelzellen zu sogenannten Tip-Zellen begünstigt, welche eine Vielzahl von Filopodien besitzen. Mithilfe der Filopodien verfügen die Tip-Zellen über die Fähigkeit, sich innerhalb kürzester Zeit in Richtung angiogener Stimuli fortzubewegen [CHEN et al., 2019]. Schließlich waren auch im zweiten Studienabschnitt die Scherraten individueller Gefäße der Behandlungsgruppe signifikant erhöht. Es ist daher anzunehmen, dass sich zusätzliche Gefäßsprossen ausbilden, welche zu einem erhöhten Gesamtdurchmesser des Gefäßsystems führen. Durch diesen Prozess können die Scherraten wieder in den physiologischen Zielbereich abgesenkt werden [GALIE et al., 2014].

### 7.2.3 Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven

**Im ersten Studienabschnitt** konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Insulin zu einer nur mäßigen pro-angiogenen Aktivierung adipöser mikrovaskulärer

Fragmente führt. Die Blockade dieser Wirkung durch Zugabe von IGFbp4 zeigt, dass dieser pro-angiogene Effekt im Wesentlichen über IGF-1 vermittelt wird. Dennoch wurde, im Vergleich zu einer vorherigen Studie mit IGF-1, durch Insulin eine deutlich geringere Aktivierung der Gefäßfragmente nachgewiesen [LASCHKE et al., 2019b]. So konnten nach 24-stündiger Kultivierung der mikrovaskulären Fragmente in IGF-1-supplementierter UW-Lösung deutlich erhöhte funktionelle Kapillardichten in den implantierten Scaffolds im Vergleich zur Insulin-Behandlung beobachtet werden [LASCHKE et al., 2019b].

Somit kann die Verwendung von Insulin zur metabolischen Aktivierung mikrovaskulärer Fragmente nicht empfohlen werden, da deutlich wirksamere Stimulanzien zur Verfügung stehen [KARSCHNIA et al., 2018; LASCHKE et al., 2019b]. Als interessante Fragestellung für zukünftige Untersuchungen bleibt zu klären, ob Insulin bei Diabetespatienten mit Insulinmangel eine veränderte Vaskularisierungskapazität der mikrovaskulären Fragmente hervorruft.

**Im zweiten Studienabschnitt** konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit hochkonzentrierter Glukose zu einer starken pro-angiogenen Aktivierung adipöser mikrovaskulärer Fragmente führt. Entsprechend bildeten die Glukose-behandelten Gefäßfragmente ein dichteres mikrovaskuläres Netzwerk sowie ein dichteres Granulationsgewebe in den Randbereichen und im Zentrum der implantierten Integra®-Scaffolds aus.

Somit könnte die Stimulation mikrovaskulärer Fragmente mit Glukose eine hochwirksame Methode sein, um im Tissue Engineering und der regenerativen Medizin die Vaskularisierung von Scaffolds oder Gewebedefekten maßgeblich zu verbessern. Insbesondere bei ausgedehnten oder mehrzeitigen operativen Verfahren können in zukünftigen Anwendungen frisch isolierte mikrovaskuläre Fragmente möglicherweise nicht immer unmittelbar eingesetzt werden. In solchen Situationen würde sich folglich deren kurzfristige Kultivierung in Glukose-supplementierter UW-Lösung empfehlen. Dies wäre eine simple und kosteneffiziente Methode, um die Effektivität einer Behandlung mit mikrovaskulären Fragmenten zu verbessern.

## 8 LITERATUR

1. **ALGIRE GH** (1943) An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4: 1-11
2. **AMIN J, SHARIF M, YASMIN M** (2016) A review on recent developments for detection of diabetic retinopathy. *Scientifica (Cairo)* 2016: 6838976
3. **ANDRADE SP, HART IR, PIPER PJ** (1992) Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature. *Br J Pharmacol* 107: 1092-1095
4. **AUGER FA, GIBOT L, LACROIX D** (2013) The pivotal role of vascularization in tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 15: 177-200
5. **BAKER M, WAYLAND H** (1974) On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7: 131-143
6. **BEK T, LUND-ANDERSEN H** (1990) Localised blood-retinal barrier leakage and retinal light sensitivity in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 74: 388-392
7. **BEKKER AY, RITTER AB, DURAN WN** (1986) Reduction of pressure in postcapillary venules induced by EPI-fluorescent illumination of FITC-dextran. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 3: 411-423
8. **BETTS-OBREGON BS, VELLANKI S, BUIKEMA J, TSIN AT, WRIGHT K** (2016) Effect of glucose on retinal endothelial cell viability and VEGF secretion. *HSOA J Cell Biol Cell Metabol* 3: 008
9. **BIANCONI V, SAHEBKAR A, ATKIN SL, PIRRO M** (2018) The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Curr Opin Hematol* 25: 44-51

10. **BOCCACCINI AR, BLAKER JJ** (2005) Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* 2: 303-317
11. **BORSELLI C, UNGARO F, OLIVIERO O, D'ANGELO I, QUAGLIA F, LA ROTONDA MI, NETTI PA** (2010) Bioactivation of collagen matrices through sustained VEGF release from PLGA microspheres. *J Biomed Mater Res A* 92: 94-102
12. **BREKKE E, MORKEN TS, SONNEWALD U** (2015) Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain. *Neurochem Int* 82: 33-41
13. **BREW K, DINAKARPANDIAN D, NAGASE H** (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta Prot Struct Mol Enzymol* 1477: 267-283
14. **BRUNO S, DARZYNKIEWICZ Z** (1992) Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 25: 31-40
15. **BUDI EH, MUTHUSAMY BP, DERYNCK R** (2015) The insulin response integrates increased TGF- $\beta$  signaling through Akt-induced enhancement of cell surface delivery of TGF- $\beta$  receptors. *Sci Signal* 8: ra96
16. **BUDI EH, MAMAI O, HOFFMAN S, AKHURST RJ, DERYNCK R** (2019) Enhanced TGF- $\beta$  signaling contributes to the insulin-induced angiogenic responses of endothelial cells. *iScience* 11: 474-491
17. **CAO Y** (2013) Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell Metab* 18: 478-489
18. **CAPITÃO M, SOARES R** (2016) Angiogenesis and inflammation crosstalk in diabetic retinopathy. *J Cell Biochem* 117: 2443-2453

19. **CHAUDHARI A, VIG K, BAGANIZI D, SAHU R, DIXIT S, DENNIS V, SINGH SR, PILLAI S** (2016) Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A Review. *Int J Mol Sci* 17: 1974
20. **CHEN F-M, LIU X** (2016) Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 53: 86-168
21. **CHEN W, XIA P, WANG H, TU J, LIANG X, ZHANG X, LI L** (2019) The endothelial tip-stalk cell selection and shuffling during angiogenesis. *J Cell Commun Signal* 13: 291-301
22. **CHEN Y, FRY BC, LAYTON AT** (2017) Modeling glucose metabolism and lactate production in the kidney. *Math Biosci* 289: 116-129
23. **CHEVALIER E, CHULIA D, POUGET C, VIANA M** (2008) Fabrication of porous substrates: a review of processes using pore forming agents in the biomaterial field. *J Pharm Sci* 97: 1135-1154
24. **CHO CH, KOH YJ, HAN J, SUNG HK, JONG LEE H, MORISADA T, SCHWENDENER RA, BREKKEN RA, KANG G, OIKE Y, CHOI TS, SUDA T, YOO OJ, KOH GY** (2007) Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res* 100: e47-e57
25. **CHOJNOWSKI M** (2017) Infrared thermal imaging in connective tissue diseases. *Reumatologia* 55: 38-43
26. **CHOUDHARY GS, AL-HARBI S, ALMASAN A** (2015) Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol* 1219: 1-9
27. **CONDEELIS J, SEGALL JE** (2003) Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 3: 921-930

28. **DÍAZ-FLORES L, GUTIÉRREZ R, GARCÍA-SUÁREZ MP, SÁEZ FJ, GUTIÉRREZ E, VALLADARES F, CARRASCO JL, DÍAZ-FLORES L JR, MADRID JF** (2017) Morphofunctional basis of the different types of angiogenesis and formation of postnatal angiogenesis-related secondary structures. *Histol Histopathol* 32: 1239-1279
29. **DIMITRIADIS G, MITROU P, LAMBADIARI V, MARATOU E, RAPTIS SA** (2011) Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1: 52-59
30. **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
31. **ELÇIN YM, DIXIT V, GITNICK G** (2001) Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. *Artif Organs* 25: 558-565
32. **ENDRICH B, ASAISHI K, GÖTZ A, MESSMER K** (1980) Technical report – a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177: 125-134
33. **ESCUDERO CA, HERLITZ K, TRONCOSO F, GUEVARA K, ACURIO J, AGUAYO C, GODOY AS, GONZÁLEZ M** (2017) Pro-angiogenic role of insulin: from physiology to pathology. *Front Physiol* 8: 204
34. **FAYE N, FOURNIER L, BALVAY D, THIAM R, ORLIAGUET G, CLÉMENT O, DEWACHTER P** (2012) Macromolecular capillary leakage is involved in the onset of anaphylactic hypotension. *Anesthesiology* 117: 1072-1079
35. **FENG D, MENGER MD, WANG H, LASCHKE MW** (2014) Luminal epithelium in endometrial fragments affects their vascularization, growth and morphological

- development into endometriosis-like lesions in mice. *Dis Model Mech* 7: 225-232
36. **FENINI G, CONTASSOT E, FRENCH LE** (2017) Potential of IL-1, IL-18 and inflammasome inhibition for the treatment of inflammatory skin diseases. *Front Pharmacol* 8: 278
  37. **FERNANDO KHN, YANG HW, JIANG Y, JEON YJ, RYU B** (2018) Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *ishige okamurae* represses high glucose-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Mar Drugs* 16: E375
  38. **FISCHER U, JÄNICKE R, SCHULZE-OSTHOFF K** (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10: 76-100
  39. **FORBES JM, COOPER ME** (2013) Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93: 137-188
  40. **FRIESENECKER B, TSAI AG, INSTAGLIETTA M** (1994) Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol* 267: 2204-2212
  41. **FRUEH FS, SPÄTER T, LINDENBLATT N, CALCAGNI M, GIOVANOLI P, SCHEUER C, MENGER MD, LASCHKE MW** (2017) Adipose tissue-derived microvascular fragments improve vascularization, lymphangiogenesis, and integration of dermal skin substitutes. *J Invest Dermatol* 137: 217-227
  42. **FUNK W, ENDRICH B, MESSMER K** (1986) A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med* 186: 259-270
  43. **GALIE PA, NGUYEN DH, CHOI CK, COHEN DM, JANMEY PA, CHEN CS** (2014) Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7968-7973

44. **GEALEKMAN O, GURAV K, CHOUINARD M, STRAUBHAAR J, THOMPSON M, MALKANI S, HARTIGAN C, CORVERA S** (2014) Control of adipose tissue expandability in response to high fat diet by the insulin-like growth factor-binding protein-4. *J Biol Chem* 289: 18327-18338
45. **GREENBLATT M** (1972) Hamster cheek pouch chamber: homograft studies of normal and neoplastic tissues. *Prog Exp Tumor Res* 16: 380-395
46. **GUAN J, STANKUS JJ, WAGNER WR** (2007) Biodegradable elastomeric scaffolds with basic fibroblast growth factor release. *J Control Release* 120: 70-78
47. **HAJMOUSA G, PRZYBYT E, PFISTER F, PAREDES-JUAREZ GA, MOGANTI K, BUSCH S, KUIPERS J, KLAASSEN I, VAN LUYN MJA, KRENNING G, HAMMES HP, HARMSEN MC** (2018) Human adipose tissue-derived stromal cells act as functional pericytes in mice and suppress high-glucose-induced proinflammatory activation of bovine retinal endothelial cells. *Diabetologia* 61: 2371-2385
48. **HALBERG N, KHAN T, TRUJILLO ME, WERNSTEDT-ASTERHOLM I, ATTIE AD, SHERWANI S, WANG ZV, LANDSKRONER-EIGER S, DINEEN S, MAGALANG UJ, BREKKEN RA, SCHERER PE** (2009) Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* 29: 4467-4483
49. **HALL S** (1997) Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat* 190: 57-71
50. **HAMMES HP, LIN J, RENNER O, SHANI M, LUNDQVIST A, BETSHOLTZ C, BROWNLEE M, DEUTSCH U** (2002) Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 51: 3107-3112
51. **HAN J, ZHANG L, GUO H, WYSHAM WZ, ROQUE DR, WILLSON AK, SHENG X, ZHOU C, BAE-JUMP VL** (2015) Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and



- invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecol Oncol* 138: 668-675
52. **HAYASHI Y, MURAKAMI M, KAWAMURA R, ISHIZAKA R, FUKUTA O, NAKASHIMA M** (2015) CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. *Stem Cell Res Ther* 6: 111
  53. **HE Q, ZHAO Y, CHEN B, XIAO Z, ZHANG J, CHEN L, CHEN W, DENG F, DAI J** (2011) Improved cellularization and angiogenesis using collagen scaffolds chemically conjugated with vascular endothelial growth factor. *Acta Biomater* 7: 1084-1093
  54. **HISCOX AM, STONE AL, LIMESAND S, HOYING JB, WILLIAMS SK** (2008) An islet-stabilizing implant constructed using a preformed vasculature. *Tissue Eng Part A* 14: 433-440
  55. **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
  56. **INGRAM JH, KOROSSIS S, HOWLING G, FISHER J, INGHAM E** (2007) The use of ultrasonication to aid recellularization of acellular natural tissue scaffolds for use in anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Eng* 13: 1561-1572
  57. **JÄGERS J, BRAUCKMANN S, KIRSCH M, EFFENBERGER-NEIDNICH K** (2018) Moderate glucose supply reduces hemolysis during systemic inflammation. *J Inflamm Res* 11: 87-94
  58. **JANKOWSKI V, TÖLLE M, TRAN TN, VAN DER GIET M, SCHUCHARDT M, LEHMANN K, JANKE D, FLICK B, ORTIZ A, SANCHEZ-NIÑO MD, TEPEL M, ZIDEK W, JANKOWSKI J** (2013) Identification of a potent endothelium-derived angiogenic factor. *PLoS One* 8: e68575

59. **JIA G, DEMARCO VG, SOWERS JR** (2016) Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* 12: 144-153
60. **JUMABAY M, ABDMAULEN R, URS S, HEYDARKHAN-HAGVALL S, CHAZENBALK GD, JORDAN MC, ROOS KP, YAO Y, BOSTRÖM KI** (2012) Endothelial differentiation in multipotent cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *J Mol Cell Cardiol* 53: 790-800
61. **KARSCHNIA P, SCHEUER C, HEß A, SPÄTER T, MENGER MD, LASCHKE MW** (2018) Erythropoietin promotes network formation of transplanted adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 35: 268-280
62. **KASPRZAK A, ADAMEK A** (2018) Role of endoglin (CD105) in the progression of hepatocellular carcinoma and anti-angiogenic therapy. *Int J Mol Sci* 19: 3887
63. **KIM BS, BAEZ CE, ATALA A** (2000) Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol* 18: 2-9
64. **KIM WS, VACANTI CA, UPTON J, VACANTI JP** (1994) Bone defect repair with tissue-engineered cartilage. *Plast Reconstr Surg* 94: 580-584
65. **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
66. **KNIGHT RL, WILCOX HE, KOROSSIS SA, FISHER J, INGHAM E** (2008) The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. *Proc Inst Mech Eng* 22: 129-143
67. **KOKEMUELLER H, SPALTHOFF S, NOLFF M, TAVASSOL F, ESSIG H, STUEHMER C, BORMANN KH, RÜCKER M, GELLRICH NC** (2010) Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction:

- experimental pilot study in sheep and first clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39: 379-387
68. **LANGER R, VACANTI JP** (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920-926
69. **LASCHKE MW, MENGER MD, VOLLMAR B** (2002) Ovariectomy improves neovascularization and microcirculation of freely transplanted ovarian follicles. *J Endocrinol* 172: 535-544
70. **LASCHKE MW, ELITZSCH A, VOLLMAR B, MENGER MD** (2005) In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil Steril* 84 Suppl 2: 1199-1209
71. **LASCHKE MW, RÜCKER M, JENSEN G, CARVALHO C, MÜLHAUPT R, GELLRICH NC, MENGER MD** (2008) Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inoculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Ann Surg* 248: 939-948
72. **LASCHKE MW, VOLLMAR B, MENGER MD** (2009) Inoculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Eng Part B Rev* 15: 455-465
73. **LASCHKE MW, VOLLMAR B, MENGER MD** (2011) The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater* 22: 147-167
74. **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
75. **LASCHKE MW, MENGER MD** (2012) Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inoculation. *Eur Surg Res* 48: 85-92

76. **LASCHKE MW, GRÄSSER C, KLEER S, SCHEUER C, EGLIN D, ALINI M, MENGER MD** (2014a) Adipose tissue-derived microvascular fragments from aged donors exhibit an impaired vascularisation capacity. *Eur Cell Mater* 28: 287-298
77. **LASCHKE MW, AUGUSTIN V, KLEER S, TSCHERNIG T, MENGER MD** (2014b) Locally applied macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) promotes early vascularization of implanted porous polyethylene (Medpor®). *Acta Biomater* 10: 4661-4669
78. **LASCHKE MW, MENGER MD** (2015) Adipose tissue-derived microvascular fragments: natural vascularization units for regenerative medicine. *Trends Biotechnol* 33: 442-448
79. **LASCHKE MW, MENGER MD** (2016a) Prevascularization in tissue engineering: current concepts and future directions. *Biotechnol Adv* 34: 112-121
80. **LASCHKE MW, MENGER MD** (2016b) The dorsal skinfold chamber: a versatile tool for preclinical research in tissue engineering and regenerative medicine. *Eur Cell Mater* 32: 202-215
81. **LASCHKE MW, AUGUSTIN VA, SAHIN F, ANSCHÜTZ D, METZGER W, SCHEUER C, BISCHOFF M, AKTAS C, MENGER MD** (2016) Surface modification by plasma etching impairs early vascularization and tissue incorporation of porous polyethylene (Medpor®) implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 104: 1738-1748
82. **LASCHKE MW, HEß A, SCHEUER C, KARSCHNIA P, MENGER MD** (2019a) Subnormothermic short-term cultivation improves the vascularization capacity of adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng Regen Med* 13: 131-142

83. **LASCHKE MW, KONTAXI E, SCHEUER C, HEß A, KARSCHNIA P, MENGER MD** (2019b) Insulin-like growth factor 1 stimulates the angiogenic activity of adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng* 10: 1-11
84. **LEE K, SILVA EA, MOONEY DJ** (2011) Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface* 8: 153-170
85. **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
86. **LEVENBERG S, ROUWKEMA J, MACDONALD M, GARFEIN ES, KOHANE DS, DARLAND DC, MARINI R, BLITTERSWIJK CA, MULLIGAN RC, D'AMORE PA, LANGER R** (2005) Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 23: 879-884
87. **LI B, DAVIDSON JM, GUELCHER SA** (2009) The effect of the local delivery of platelet-derived growth factor from reactive two-component polyurethane scaffolds on the healing in rat skin excisional wounds. *Biomaterials* 30: 3486-3494
88. **LI S, LI T, LUO Y, YU H, SUN Y, ZHOU H, LIANG X, HUANG J, TANG S** (2011) Retro-orbital injection of FITC-dextran is an effective and economical method for observing mouse retinal vessels. *Mol Vis* 17: 3566-3573
89. **LIU Y, SUWA F, WANG X, TAKEMURA A, FANG YR, LI Y, ZHAO Y, JIN Y** (2007) Reconstruction of a tissue-engineered skin containing melanocytes. *Cell Biol Int* 31: 985-990
90. **LIU Y, PETREACA M, MARTINS-GREEN M** (2009) Cell and molecular mechanisms of insulin-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med* 13: 4492-4504

91. **LOEB AL, GÖDÉNY I, LONGNECKER DE** (1997) Anesthetics alter relative contributions of NO and EDHF in rat cremaster muscle microcirculation. *Am J Physiol* 273: 618-627
92. **LÓPEZ-NOVOA JM, BERNABEU C** (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H959-974
93. **LU Q, WANG WW, ZHANG MZ, MA ZX, QIU XR, SHEN M, YIN XX** (2019) ROS induces epithelial-mesenchymal transition via the TGF- $\beta$ 1/PI3K/Akt/mTOR pathway in diabetic nephropathy. *Exp Ther Med* 17: 835-846
94. **MARTIN A, KOMADA MR, SANE DC** (2003) Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev* 23: 117-145
95. **MCCORMACK DG, MEHTA S, TYML K, SCOTT JA, POTTER R, ROHAN M** (2000) Pulmonary microvascular changes during sepsis: evaluation using intravital videomicroscopy. *Microvasc Res* 60: 131-140
96. **MCDANIEL JS, PILIA M, WARD CL, POLLOT BE, RATHBONE CD** (2014) Characterization and multilineage potential of cells derived from isolated microvascular fragments. *J Surg Res* 192: 214-222
97. **MENDEL TA, CLABOUGH EB, KAO DS, DEMIDOVA-RICE TN, DURHAM JT, ZOTTER BC, SEAMAN SA, CRONK SM, RAKOCZY EP, KATZ AJ, HERMAN IM, PEIRCE SM, YATES PA** (2013) Pericytes derived from adipose-derived stem cells protect against retinal vasculopathy. *PLoS One* 8: e65691
98. **MENGER MD, JAEGER S, WALTER P, FEIFEL G, HAMMERSEN F, MESSMER K** (1989) Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes* 38: 199-201

99. **MENGER MD, JÄGER S, WALTER P, HAMMERSEN F, MESSMER K** (1990) A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. *Int J Microcirc Clin Exp* 9: 103-117
100. **MENGER MD, WOLF B, HÖBEL R, SCHORLEMMER HU, MESSMER K** (1991) Microvascular phenomena during pancreatic islet graft rejection. *Langenbecks Arch Chir* 376: 214-221
101. **MITCHELL AC, BRIQUEZ PS, HUBBELL JA, COCHRAN JR** (2016) Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater* 30: 1-12
102. **MOHR T, HAUDEK-PRINZ V, SLANY A, GRILLARI J, MICKSCHE M, GERNER C** (2017) Proteome profiling in IL-1 $\beta$  and VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells delineates the interlink between inflammation and angiogenesis. *PLoS One* 12: e0179065
103. **MOOSMANN S, HUTTER J, MOSER C, KROMBACH F, HUSS R** (2005) Milieu-adopted in vitro and in vivo differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones. *Cells Tissues Organs* 179: 91-101
104. **MURUGESAN N, ÜSTUNKAYA T, FEENER EP** (2015) Thrombosis and hemorrhage in diabetic retinopathy: a perspective from an inflammatory standpoint. *Semin Thromb Hemost* 41: 659-664
105. **NAKAGAWA T, KOSUGI T, HANEDA M, RIVARD CJ, LONG DA** (2009) Abnormal angiogenesis in diabetic nephropathy. *Diabetes* 58: 1471-1478
106. **NAKANO M, NAKAJIMA Y, TSUCHIDA Y, KUDO S, NAKAMURA H, FUKUDA O** (1997) Direct evidence of a connection between autotransplanted microvessel fragments and the host microvascular system. *Int J Microcirc Clin Exp* 17: 159-163

107. **NAKANO M, NAKAJIMA Y, KUDO S, TSUCHIDA Y, NAKAMURA H, FUKUDA O** (1998) Effect of autotransplantation of microvessel fragments on experimental random-pattern flaps in the rat. *Eur Surg Res* 30: 149-160
  
108. **NOLAN DJ, GINSBERG M, ISRAELY E, PALIKUQI B, POULOS MG, JAMES D, DING B-S, SCHACHTERLE W, LIU Y, ROSENWAKS Z, BUTLER JM, XIANG J, RAFII A, SHIDO K, RABBANY SY, ELEMENTO O, RAFII S** (2013) Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration. *Dev Cell* 26: 204-219
  
109. **NOMI M, MIYAKE H, SUGITA Y, FUJISAWA M, SOKER S** (2006) Role of growth factors and endothelial cells in therapeutic angiogenesis and tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther* 1: 333-343
  
110. **NUNES SS, GREER KA, STIENING CM, CHEN HY, KIDD KR, SCHWARTZ MA, SULLIVAN CJ, REKAPALLY H, HOYING JB** (2010) Implanted microvessels progress through distinct neovascularization phenotypes. *Microvasc Res* 79: 10-20
  
111. **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
  
112. **OLSSON GM, BRUNMARK A, BRUNK UT** (1989) AO-mediated photo-damage of microsomal- and lysosomal fractions. *Virchows Arch [B]* 56: 247-257
  
113. **ORIVE G, HERNANDEZ RM, GASCON AR, CALAFIORE R, CHANG TM, DE VOS P, HORTELANO G, HUNKELER D, LACIK I, SHAPIRO AM, PEDRAZ JL** (2003) Cell encapsulation: promise and progress. *Nat Med* 9: 104-107
  
114. **PAPENFUSS HD, GROSS JF, INTAGLIETTA M, TREESE FA** (1979) A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18: 311-318



115. **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
116. **PETERS EB** (2018) Endothelial progenitor cells for the vascularization of engineered tissues. *Tissue Eng Part B Rev* 24: 1-24
117. **PILIA M, MCDANIEL JS, GUDA T, CHEN XK, RHOADS RP, ALLEN RE, CORONA BT, RATHBONE CR** (2014) Transplantation and perfusion of microvascular fragments in a rodent model of volumetric muscle loss injury. *Eur Cell Mater* 28: 11-23
118. **PITTET MJ, WEISSLEDER R** (2011) Intravital imaging. *Cell* 147: 983-991
119. **PYUN BJ, KIM YS, LEE IS, KIM JS** (2017) Homonoia riparia and its major component, myricitrin, inhibit high glucose-induced apoptosis of human retinal pericytes. *Integr Med Res* 6: 300-309
120. **QIU F, TONG H, WANG Y, TAO J, WANG H, CHEN L** (2018) Recombinant human maspin inhibits high-glucose-induced oxidative stress and angiogenesis of human retinal microvascular endothelial cells via PI3K/AKT pathway. *Mol Cell Biochem* 446: 127-136
121. **REDWAN EM, LINJAWI MH, UVERSKY VN** (2016) Looking at the carcinogenicity of human insulin analogues via the intrinsic disorder prism. *Sci Rep* 6: 23320
122. **ROMEO G, LIU WH, ASNAGHI V, KERN TS, LORENZI M** (2002) Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* 51: 2241-2248
123. **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
124. **SAETZLER RK, JALLO J, LEHR HA, PHILIPS CM, VASTHARE U, ARFORS KE, TUMA RF** (1997) Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45: 505-513
  125. **SANDISON JC** (1924) A new method for the study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec* 28: 281-287
  126. **SANTIAGO AR, BOIA R, AIRES ID, AMBROSIO AF, FERNANDES R** (2018) Sweet stress: coping with vascular dysfunction in diabetic retinopathy. *Front Physiol* 9: 820
  127. **SCHNEIDER P, FOITZIK T, KAHRAU S, PODUFAL A, BUHR HJ** (2001) An experimental rat model for studying pulmonary microcirculation by in vivo videomicroscopy. *Microvasc Res* 62: 421-434
  128. **SCHREITER J, MEYER S, SCHMIDT C, SCHULZ RM, LANGER S** (2017) Dorsal skinfold chamber models in mice. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg* 6: 1-8
  129. **SCHUIT F, MOENS K, HEIMBERG H, PIPELEERS D** (1999) Cellular origin of hexokinase in pancreatic islets. *J Biol Chem* 274: 32803-32809
  130. **SCHUMANN P, VON SEE C, KAMPMANN A, LINDHORST D, TAVASSOL F, KOKEMÜLLER H, BORMANN KH, GELLRICH NC, RÜCKER M** (2011) Comparably accelerated vascularization by preincorporation of aortic fragments and mesenchymal stem cells in implanted tissue engineering constructs. *J Biomed Mater Res A* 97: 383-394
  131. **SHAHROKHI S, ARNO A, JESCHKE MG** (2014) The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase. *Wound Repair Regen* 22: 14-22

132. **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
133. **SHEPHERD BR, HOYING JB, WILLIAMS SK** (2007) Microvascular transplantation after acute myocardial infarction. *Tissue Eng* 13: 2871-2879
134. **SHI Y, CHEN C, XU Y, LIU Y, ZHANG H, LIU Y** (2019) LncRNA FENDRR promotes high-glucose-induced proliferation and angiogenesis of human retinal endothelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 83: 869-875
135. **SHRADER CD, BAILEY KM, KONAT GW, CILENTO EV, REILLY FD** (2009) Insulin enhances proliferation and viability of human umbilical vein endothelial cells. *Arch Dermatol Res* 301: 159-166
136. **SONG SE, Jo HJ, KIM YW, CHO YJ, KIM JR, PARK SY** (2016) Delphinidin prevents high glucose-induced cell proliferation and collagen synthesis by inhibition of NOX-1 and mitochondrial superoxide in mesangial cells. *J Pharmacol Sci* 130: 235-243
137. **SPÄTER T, FRUEH FS, MENGER MD, LASCHKE MW** (2017) Potentials and limitations of Integra® flowable wound matrix seeded with adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 33: 268-278
138. **STEINBAUER M, HARRIS AG, ABELS C, MESSMER K** (2000) Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385: 290-298
139. **SUAREZ S, MCCOLLUM GW, JAYAGOPAL A, PENN JS** (2015) High glucose-induced retinal pericyte apoptosis depends on association of GAPDH and Siah1. *J Biol Chem* 290: 28311-28320

140. **SUN J, CHEN J, CAO J, LI T, ZHUANG S, JIANG X** (2016) IL-1 $\beta$ -stimulated  $\beta$ -catenin up-regulation promotes angiogenesis in human lung-derived mesenchymal stromal cells through a NF- $\kappa$ B-dependent microRNA-433 induction. *Oncotarget* 7: 59429-59440
141. **SWOAP SJ, GUTILLA MJ** (2009) Cardiovascular changes during daily torpor in the laboratory mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: 769-774
142. **TABUCHI A, MERTENS M, KUPPE H, PRIES AR, KUEBLER WM** (2008) Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol (1985)* 104: 338-346
143. **TAKEZAWA T, MORI Y, YOSHIZATO K** (1990) Cell culture on a thermo-responsive polymer surface. *Biotechnology* 8: 854-856
144. **TANG W, ZEVE D, SUH JM, BOSNAKOVSKI D, KYBA M, HAMMER RE, TALLQUIST MD, GRAFF JM** (2008) White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322: 583-586
145. **TERLIZZI V, KOLIBABKA M, BURGESS JK, HAMMES HP, HARMSSEN MC** (2018) The pericytic phenotype of adipose tissue-derived stromal cells is promoted by NOTCH2. *Stem Cells* 36: 240-251
146. **TSUKADA K, SUEMATSU M** (2012) Visualization and analysis of blood flow and oxygen consumption in hepatic microcirculation: application to an acute hepatitis model. *J Vis Exp* 66: e3996
147. **ULUDAG H, DE VOS P, TRESKO PA** (2000) Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev* 42: 29-64
148. **UTZINGER U, BAGGET B, WEISS JA, HOYING JB, EDGAR LT** (2015) Large-scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis. *Angiogenesis* 18: 219-232

149. **VAJKOCZY P, SCHILLING L, ULLRICH A, SCHMIEDECK P, MENGER MD** (1998) Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifuorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 510-520
150. **VAJKOCZY P, ULLRICH A, MENGER MD** (2000) Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2: 53-61
151. **WAHL M, UNTERBERG A, BAETHMANN A** (1985) Intravital fluorescence microscopy for the study of blood-brain-barrier function. *Int J Microcirc Clin Exp* 4: 3-18
152. **WALTON RG, FINLIN BS, MULA J, LONG DE, ZHU B, FRY CS, WESTGATE PM, LEE JD, BENNETT T, KERN PA, PETERSON CA** (2015) Insulin-resistant subjects have normal angiogenic response to aerobic exercise training in skeletal muscle, but not in adipose tissue. *Physiol Rep* 3: e12415
153. **WANG X, WANG Y, GOU W, LU Q, PENG J, LU S** (2013) Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop* 37: 2491-2498
154. **WEIS SM, CHERESH DA** (2011) Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 17: 1359-1370
155. **WEISSMANN N, KUZKAYA N, FUCHS B, TIYERILI V, SCHÄFER RU, SCHÜTTE H, GHOFRANI HA, SCHERMULY RT, SCHUDT C, SYDYKOV A, EGEMNAZAROW B, SEEGER W, GRIMMINGER F** (2005) Detection of reactive oxygen species in isolated, perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy. *Respir Res* 6: 86

156. **WILKINSON-BERKA JL, RANA I, ARMANI R, AGROTIS A** (2013) Reactive oxygen species, Nox and angiotensin II in angiogenesis: implications for retinopathy. *Clin Sci (Lond)* 124: 597-615
157. **WITSCH E, SELA M, YARDEN Y** (2010) Roles for growth factors in cancer progression. *Physiol Bethesda* 25: 85-101
158. **YAMAGISHI S, KAWAKAMI T, FUJIMORI H, YONEKURA H, TANAKA N, YAMAMOTO Y, URAYAMA H, WATANABE Y, YAMAMOTO H** (1999) Insulin stimulates the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *Microvasc Res* 57: 329-339
159. **YOON CH, CHOI YE, KOH SJ, CHOI JI, PARK YB, KIM HS** (2014) High glucose-induced jagged 1 in endothelial cells disturbs notch signaling for angiogenesis: a novel mechanism of diabetic vasculopathy. *J Mol Cell Cardiol* 69: 52-66
160. **ZDOLSEK JM, OLSSON GM, BRUNK UT** (1990) Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange. *Photochem Photobiol* 51: 67-76
161. **ZDOLSEK JM** (1993) AO-mediated photodamage to cultured cells. *APMIS* 101: 127-132
162. **ZHANG B, SHI YQ, ZOU JJ, CHEN XF, TANG W, YE F, LIU ZM** (2017) High glucose stimulates cell proliferation and collagen IV production in rat mesangial cells through inhibiting AMPK-K<sub>ATP</sub> signaling. *Int Urol Nephrol* 49: 2079-2086
163. **ZHAO W, HAN Q, LIN H, SUN W, GAO Y, ZHAO Y, WANG B, WANG X, CHEN B, XIAO Z, DAI J** (2009) Human basic fibroblast growth factor fused with Kringle4 peptide binds to a fibrin scaffold and enhances angiogenesis. *Tissue Eng Part A* 15: 991-998

- 
164. **ZWISSLER B, SCHOSSER R, WEISS C, IBER V, WEISS M, SCHWICKERT C, SPENGLER P, MESSMER K** (1991) Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. *Res Exp Med (Berl)* 191: 47-63

## 9 DANKSAGUNG

Auf diesem Weg möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger und Herrn Prof. Dr. Matthias W. Laschke für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes entsprechende Forschungen durchführen zu dürfen.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias W. Laschke bedanken, der jederzeit für Rückfragen zur Verfügung stand und mit seinen konstruktiven Ratschlägen maßgeblich zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beigetragen hat. Die Freude und Begeisterung für seine Tätigkeit, der Perfektionismus und die engmaschige Betreuung werden mir fortwährend in sehr guter Erinnerung bleiben.

Für die Erstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen möchte ich mich bei Herrn Dr. Wolfgang Metzger bedanken.

Zudem danke ich Frau Elena Kontaxi für die kompetente Einarbeitung in die Methodik und Frau Dr. Claudia Scheuer, Frau Julia Parakenings sowie Frau Janine Becker für die Unterstützung bei verschiedenen Laborarbeiten und der Erstellung der histologischen Präparate.

Schließlich gilt mein Dank meinem Vater und meiner Großmutter, welche mit ihrer beständigen Unterstützung das Fundament meiner wissenschaftlichen Arbeit gebildet haben. Ohne deren Liebe und Geduld wäre dieser Weg niemals möglich gewesen.



## **10 LEBENS LAUF**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

## 11 PUBLIKATION

LASCHKE MW, **SEIFERT MS**, SCHEUER C, KONTAXI E, METZGER W, MENGER MD (2019)  
High glucose exposure promotes proliferation and in vivo network formation of adipose  
tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 38: 188-200