

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

Vaskularisierung implantierter Polyurethan- Scaffolds durch Besiedlung mit Sphäroiden aus mesenchymalen Stammzellen

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

2015

vorgelegt von Timo Emanuel Schank
geboren am 02.12.1985 in Saarbrücken

meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Summary	3
3. Einleitung.....	5
4. Ziel der Studie.....	11
5. Material und Methodik	12
5.1. Versuchstiere	12
5.2. Modell	12
5.2.1. Isolierung und Charakterisierung von adMSCs	12
5.2.2. Herstellung undifferenzierter und differenzierter adMSC-Sphäroide.....	13
5.2.3. Herstellung der Scaffolds	15
5.2.4. Besiedlung der Scaffolds.....	15
5.2.5. Modell der Rückenhautkammer.....	17
5.2.6. Präparation der Rückenhautkammer.....	17
5.2.7. Implantation der Scaffolds	21
5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	21
5.3.1. Mikrozirkulatorische Parameter	22
5.3.1.1. Perfundierte ROIs.....	23
5.3.1.2. Funktionelle Kapillardichte.....	24
5.4. Histologie und Immunhistochemie	24
5.4.1. Histologische Färbungen.....	24
5.4.2. CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung.....	24
5.4.3. Mikroskopische Analyse	25
5.4.4. Hochauflösende Mikrocomputertomographie (μ CT)	26
5.5. Experimentelles Protokoll	26
5.5.1. Versuchsgruppen	26
5.5.2. Versuchsablauf.....	27
5.6. Statistik	28

6. Ergebnisse.....	29
6.1. Mikrozirkulation der Rückenhautkammer	29
6.2. Vaskularisierung der Scaffolds in Abhängigkeit ihrer Besiedlung mit Einzelzellen oder adMSC-Sphäroiden	29
6.2.1. Charakterisierung undifferenzierter adMSCs und Herstellung der Sphäroide	29
6.2.2. Besiedlung der Polyurethan-Scaffolds	30
6.2.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	31
6.2.4. Immunhistochemische Analyse	34
6.3. Vaskularisierung der Scaffolds in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades der adMSC-Sphäroide	37
6.3.1. Herstellung undifferenzierter und differenzierter adMSC-Sphäroide.....	37
6.3.2. Besiedlung von Polyurethan-Scaffolds.....	38
6.3.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	39
6.3.4. Histologische, immunhistochemische und μ CT Analyse implantierter Scaffolds	41
6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	45
7. Diskussion	47
7.1. Diskussion von Material und Methodik	47
7.2. Diskussion der Ergebnisse	49
7.2.1. Vaskularisierung der Scaffolds in Abhängigkeit ihrer Besiedlung mit Einzelzellen oder adMSC-Sphäroiden	49
7.2.2. Vaskularisierung der Scaffolds in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades der adMSC-Sphäroide	52
7.3. Schlussfolgerungen	55
8. Literaturverzeichnis	56
9. Danksagung.....	64
10. Publikationen	65

1. Zusammenfassung

Beim Tissue Engineering werden Zellen auf ein Trägermaterial gesiedelt, das man als Scaffold bezeichnet. Das Scaffold und die Zellen bilden zusammen ein Gewebekonstrukt, das in einen Gewebedefekt eines Patienten implantiert werden kann. Wichtig für den klinischen Erfolg des Tissue Engineering ist eine ausreichende Versorgung der Zellen innerhalb der Implantate mit Nährstoffen. Eine wesentliche Grundvoraussetzung hierfür ist eine ausreichend schnelle Vaskularisierung. Aus diesem Grund wurden bereits verschiedene Strategien entwickelt, um die Gefäßneubildung innerhalb von Scaffolds zu verbessern. Hierzu zählt auch die Besiedlung von Scaffolds mit Stammzellen.

Stammzellen besitzen die Eigenschaft, sich unter bestimmten Umgebungsbedingungen in verschiedene Gewebetypen zu differenzieren. Entsprechend können sie auch die Vaskularisierung von Scaffolds durch ihre Differenzierung in Endothelzellen fördern. Unter bestimmten Voraussetzungen aggregieren Stammzellen zu Sphäroiden. Sphäroide sind runde, dreidimensionale Zellverbände mit vielen Zell-Zell-Kontakten. Somit ähneln sie der Zellanordnung in Körpergeweben. Im Gegensatz zu einer einlagigen Zellschicht sind Sphäroide widerstandsfähiger gegenüber Hypoxie und Apoptose. Außerdem sezernieren sie größere Mengen von Wachstumsfaktoren in ihre Umgebung. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig untersucht, ob Stammzell-Sphäroide zur Vaskularisierung von Scaffolds genutzt werden können.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Vaskularisierung von Scaffolds, die mit Stammzell-Sphäroiden besiedelt wurden, im Vergleich zu Einzelzell-besiedelten Scaffolds und unbesiedelten Kontroll-Scaffolds analysiert. Dazu wurden mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe transgener C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)^{10sb/J}-Mäuse isoliert und in Form von Sphäroiden oder Einzelzellen auf Scaffolds gesiedelt. Die Differenzierung zu Blutgefäßen dieser GFP (grün fluoreszierendes Protein)-positiven Zellen konnte mit Hilfe des Modells der Rückenhautkammer und intravitaler Fluoreszenzmikroskopie während eines 14-tägigen Versuchszeitraumes analysiert werden. Im Anschluss an die *in vivo* Untersuchungen wurden zusätzlich histologische sowie immunhistochemische Analysen durchgeführt.

Auf diese Weise wurde gezeigt, dass Stammzellen die Vaskularisierung von Scaffolds im Vergleich zu unbesiedelten Kontrollen erheblich verbessern. Weiterhin konnte durch die Besiedlung mit Stammzell-Sphäroiden im Zentrum der Scaffolds eine gesteigerte Vaskularisierung im Vergleich zu Einzelzell-besiedelten Scaffolds erzielt werden. Anhand immunhistochemischer Färbungen wurde weiterhin gezeigt, dass sich undifferenzierte Stammzell-Sphäroide vermehrt zu Mikrogefäßen differenzieren.

Osteogen differenzierte Stammzell-Sphäroide sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Knochenmatrix sehr gut dazu geeignet, Knochendefekte zu regenerieren. Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, wie bereits osteogen differenzierte Stammzell-Sphäroide die Vaskularisierung von Scaffolds beeinflussen. Die erfolgreiche osteogene Differenzierung der Sphäroide konnte mittels von Kossa-Färbung sowie μ CT-Aufnahmen nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten undifferenzierte Stammzell-Sphäroide.

Nach Implantation in die Rückenhautkammer konnte in den Randbereichen der Sphäroid-besiedelten Scaffolds beider Gruppen eine vergleichbare Vaskularisierung beobachtet werden. Im Zentrum der Scaffolds wurde jedoch in der Gruppe der differenzierten Sphäroide eine deutlich verminderte Gefäßneubildung beobachtet. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die osteogen differenzierten Zellen innerhalb der Sphäroide nicht zu Gefäßzellen umwandeln und sogar dedifferenzieren. Entsprechend verloren sie ihre Fähigkeit, weiterhin Knochenmatrix *in vivo* zu produzieren.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geschlussfolgert werden, dass undifferenzierte Stammzell-Sphäroide die Vaskularisierung von Scaffolds wesentlich verbessern. Osteogen differenzierte Stammzell-Sphäroide verlieren hingegen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht nur diese Eigenschaft, sondern auch ihre Fähigkeit zur Produktion von Knochenmatrix.

2. Summary

In tissue engineering, cells are seeded onto a biomaterial, which is called scaffold. The resulting tissue construct is then implanted into a defect site of the patient. A major prerequisite for the success of tissue engineering is a sufficient vascularization of the tissue constructs after implantation. Accordingly, different strategies for scaffold vascularization have been developed so far. One of these strategies is the seeding of scaffolds with stem cells.

Stem cells exhibit the unique property to differentiate into specific cell types under appropriate conditions. Accordingly, they may also contribute to the vascularization of scaffolds by differentiating into vascular cells. Under certain conditions, stem cells can also aggregate into spheroids. Spheroids are round, three-dimensional cell complexes with many cell-cell interactions that mimic the *in vivo* environment of living tissue. Compared to conventional monolayer cell cultures, spheroids are more resistant against hypoxia and apoptotic cell death. Furthermore, they secrete higher amounts of angiogenic growth factors. Based on these findings the aim of the present thesis was to analyze for the first time, whether stem cell spheroids are suitable for the vascularization of scaffolds.

In the first part of this thesis it was analyzed, whether the vascularization of scaffolds, which were seeded with stem cell spheroids, is improved when compared to scaffolds seeded with single stem cells or non-seeded control scaffolds. For this purpose, adipose tissue-derived mesenchymal stem cells from transgenic C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J mice were isolated and subsequently seeded as spheroids or as single cells onto scaffolds to assess their vascularization potential in the dorsal skinfold chamber model by means of intravital fluorescence microscopy over a time period of 14 days. This was followed by additional histological and immunohistochemical analyses.

It was found that scaffolds seeded with stem cells showed an increased vascularization when compared to non-seeded controls. Furthermore, scaffolds seeded with stem cell spheroids exhibited a significantly improved vascularization in central surface areas when compared to scaffolds seeded with single stem cells.

Additional immunohistochemical analyses revealed that the cells in undifferentiated stem cell spheroids can differentiate into micro-vessels.

Scaffolds seeded with osteogenically differentiated stem cell spheroids may be ideally suited for the regeneration of bone defects, because they can produce mineralized matrix. In the second part of this thesis it was analyzed how spheroids consisting of osteogenically differentiated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells influence the vascularization of scaffolds. The successful osteogenic differentiation of the spheroids was proven by von Kossa staining and micro tomography (μ CT). Undifferentiated mesenchymal stem cell spheroids served as controls.

After implantation into the dorsal skinfold chamber, the scaffolds of both groups induced an angiogenic host tissue response with the formation of newly formed micro-vessels in the border zones of the implants. However, scaffolds seeded with differentiated spheroids presented with a significantly reduced vascularization in central surface areas when compared to scaffolds seeded with undifferentiated spheroids. Additional immunohistochemical analyses revealed that the differentiated stem cells within the spheroids did not differentiate into vascular cells and even lost their capacity of producing bone matrix.

In summary, the present thesis shows that undifferentiated stem cell spheroids are potent initiators of blood vessel formation in scaffolds. In contrast, *in vitro* osteogenic differentiation of stem cell spheroids markedly impairs their *in vivo* vascularization potential. Furthermore, they even lose their capacity of producing mineralized matrix and dedifferentiate under the given experimental conditions.

3. Einleitung

In Deutschland warten derzeit ca. 11.000 Patienten auf ein Spenderorgan [EUROTRANSPLANT, 2015]. Gleichzeitig wurde jedoch 2014 nur bei ca. 3700 Patienten eine Transplantation vorgenommen [EUROTRANSPLANT, 2015]. Somit stehen trotz des großen Bedarfs an Körperersatzgewebe nur wenige Spenderorgane zur Verfügung. Um die Patienten zu versorgen, werden bisher Spenderorgane aus Tot- oder Lebendspendern verwendet. Allerdings hat sich das Tissue Engineering in den letzten Jahren als eine weitere Möglichkeit etabliert, um Körpergewebe zu ersetzen.

Die National Science Foundation (USA) definierte den Begriff des Tissue Engineering 1987 zum ersten Mal. Sie beschreibt das Tissue Engineering als interdisziplinäre Forschungsrichtung, bestehend aus den Fachrichtungen der Zellbiologie, der Materialwissenschaften und der klinischen Forschung, bei der das Ziel der Herstellung organischer Gewebekonstrukte im Mittelpunkt steht [LANGER et al., 1993]. Hierzu werden zunächst Zellen aus einem Patienten isoliert und außerhalb des Organismus in Zellkultur vermehrt. Anschließend werden sie auf ein dreidimensionales Trägermaterial, was man auch als Scaffold bezeichnet, gesiedelt. Das so entstandene Gewebekonstrukt kann anschließend wieder dem Patienten in einen Gewebedefekt implantiert werden.

Mit Hilfe des Tissue Engineering konnte bereits Haut [KREMER et al., 2000] sowie Knorpelgewebe [VACANTI und UPTON, 1994] gezüchtet und im Tiermodell erfolgreich transplantiert werden. Die Anforderungen an eine ausreichende Sauerstoff- sowie Nährstoffversorgung sind bei diesen beiden Gewebetypen im Vergleich zu anderen Geweben jedoch gering. So können transplantierte Haut- und Knorpelzellen größtenteils mit Sauerstoff und Nährstoffen per Diffusion aus den angrenzenden Gefäßen des Empfängergewebes versorgt werden. Diese Art der Nährstoffversorgung ist vor allem aufgrund der kurzen Distanz zwischen Blutgefäßen und Knorpel- bzw. Hautzellen möglich. Sauerstoff kann bis zu einer maximalen Diffusionsstrecke von ca. 150-200µm zu den entsprechenden Zellen gelangen [FOLKMAN und HOCHBERG, 1973; COLTON, 1995]. Dickere Gewebe mit höheren metabolischen Anforderungen können jedoch nicht mittels Diffusion aus

angrenzenden Gefäßen des Empfängergewebes ausreichend versorgt werden. Für eine erfolgreiche Implantation mit langfristiger Funktionsfähigkeit benötigen sie zusätzlich eine eigene, gut ausgebildete Blutversorgung (Vaskularisierung) [BORGES et al., 2004; YARLAGADDA et al., 2005]. Neu hergestellte, dreidimensionale Gewebekonstrukte besitzen noch kein eigenes Blutgefäßsystem. Daraus resultiert eine Minderversorgung mit anschließendem Gewebeuntergang. Besonders die im Inneren eines Scaffolds befindlichen Zellen sind hiervon betroffen. Dies bedeutet, dass die schnelle Vaskularisierung eines Scaffolds von grundlegender Bedeutung für den Erfolg des Tissue Engineerings ist [LASCHKE et al., 2006] und die Herstellung von Knochen- [SALGADO et al., 2004], Muskel- [DEASY et al., 2004], Nerven- [LUNDBORG, 2004] oder Lebergewebe [JIANG et al., 2004; OHASHI et al., 2005] eine große Herausforderung darstellt.

Die Angiogenese, d.h. die Ausbildung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen, spielt bei vielen regenerativen Vorgängen im menschlichen Körper eine wichtige Rolle. Dieser Prozess ist durch ein komplexes Zusammenspiel aus körpereigenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren und den von ihnen aktivierten bzw. kontrollierten Effektorzellen, wie z.B. Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder Bindegewebszellen, gekennzeichnet [PATAN, 2004]. Zu den wichtigsten pro-angiogenen Wachstumsfaktoren zählen vascular endothelial growth factor (VEGF) und fibroblast growth factor (FGF)-1 sowie FGF-2 [NORRBY, 1997]. Zu Beginn der Angiogenese werden Endothelzellen durch diese Faktoren stimuliert. Aus den Endothelzellen werden daraufhin Matrix-Metalloproteinasen freigesetzt, welche die umgebende Basalmembran abbauen. Es kommt somit zu einer Vasodilatation des Gefäßes mit anschließender Migration der Endothelzellen in das interstitielle Gewebe, wodurch sich dort erste Gefäßsprossen ausbilden. Entlang der Gefäßsprossen migrieren weitere Endothelzellen und proliferieren, um auf diese Weise das neu gebildete Gefäßsegment zu verlängern. Zur Stabilisierung des neuen Segments lagern sich schließlich Muskelzellen, Fibroblasten sowie Perizyten an und es kommt zur Produktion von extrazellulärem Bindegewebe. Die Wachstumsgeschwindigkeit von Blutgefäßen beträgt ca. 5µm pro Stunde [ZAREM, 1969; ORR et al., 2003]. Unter physiologischen Bedingungen ist die Gefäßneubildung besonders nach Gewebeschäden [POLVERINI et al., 1977] und bei Entzündungsreaktionen [JONES et al., 1999] von großer Bedeutung.

Beim Tissue Engineering wird bisher mit unterschiedlichen Strategien versucht, eine ausreichend schnelle Vaskularisierung von Scaffolds zu erzielen. Dabei spielt sowohl das Material als auch die Architektur einzelner Scaffold-Typen eine wichtige Rolle. So konnte bereits der Einfluss verschiedener chemischer Zusammensetzungen von Scaffolds auf die Vaskularisierung nachgewiesen werden [SUNG et al., 2004; RÜCKER et al., 2006]. Weiterhin führen unterschiedlich große Poren innerhalb von Scaffolds zu einem unterschiedlichen Einwachsen von Blutgefäßen. Eine Porengröße von 250-300µm zeigt dabei das beste Ergebnis hinsichtlich der Ausbildung von Blutgefäßen und somit der Integration von Scaffolds in das Empfängergewebe [DRUECKE et al., 2004]. Eine weitere Möglichkeit der Stimulation der Vaskularisierung von Scaffolds besteht in der Inkorporation verschiedener Wachstumsfaktoren wie z.B. FGF [PERETS et al., 2003], VEGF [ENNETT et al., 2006] oder FGF in Kombination mit VEGF [NILLESEN et al., 2007] innerhalb des implantierten Materials.

In den letzten Jahren wurde zunehmend versucht, Scaffolds mit Vorläuferzellen bzw. Stammzellen zu besiedeln und somit ein vermehrtes Gefäßwachstum zu fördern. So konnte SHEPHERD et al. [2006] eine verbesserte Vaskularisierung mittels einer Besiedlung mit endothelialen Vorläuferzellen erreichen. Die Besiedlung von Scaffolds mit embryonalen [LEES et al., 2007] und adulten Stammzellen [SMILER et al., 2007] führte ebenfalls zu einer vermehrten Ausbildung von Blutgefäßen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Scaffolds mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) besiedelt. MSCs sind pluripotente Zellen. Das bedeutet, dass sie sich unter bestimmten Bedingungen in jeden Zelltyp des Organismus differenzieren und somit die Vaskularisierung von Scaffolds beschleunigen können. So konnten MSCs bereits in Endothelzellen sowie in perivaskuläre glatte Muskelzellen differenziert werden [DENNIS et al., 2002; OSWALD et al., 2004; JANECEK PORTALSKA et al., 2012; LIN et al., 2012]. Zusätzlich fördern sie das Wachstum von Blutgefäßen durch die Sekretion angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF-2 [SCHUMANN et al., 2009; BHANG et al., 2011]. MSCs kommen beim Erwachsenen im Stroma vieler Gewebe vor und können somit leicht gewonnen werden. Für den klinischen Gebrauch werden vor allem MSCs aus Fettgewebe verwendet, da dieses mittels Fettabsaugung minimal-invasiv in großen Mengen gewonnen werden kann und dieses Verfahren gleichzeitig mit einer geringen Spendermorbidity einher geht [CHENG et al., 2012]. Außerdem konnten FRASER et al., [2006] zeigen, dass der in Fettgewebe enthaltene Anteil an MSCs im Vergleich zu anderen MSC-enthaltenden Gewebetypen, wie z.B.

Knochenmark, deutlich höher ist. Unter spezifischen Kulturbedingungen können sich aus Fettgewebe stammende MSCs (adipose-derived mesenchymal stem cells (adMSCs)) in Knochen-, Knorpel-, Leberzell- oder Nervenzelllinien differenzieren [BONORA-CENTELLES et al., 2009; ESTES et al., 2010; SHI et al., 2012; YING et al., 2012]. Aufgrund dieser vielversprechenden Eigenschaften sind adMSCs für die medizinische Forschung von großem Interesse und werden eine entscheidende Rolle in der zukünftigen regenerativen Medizin spielen.

Befinden sich adMSCs auf nicht haftenden Oberflächen oder in Suspension, lagern sie sich wie viele andere Zelltypen auch spontan zu vielzelligen Sphäroiden zusammen [CHENG et al., 2012; KAPUR et al., 2012; YOON et al., 2012]. Sphäroide sind dreidimensionale Zellverbände mit vermehrten Zell-Zell-Kontakten, welche die *in vivo* Situation besser nachbilden als eine zweidimensionale Zellkultur [HAYCOCK, 2011]. Darüberhinaus zeigen adMSC-Sphäroide ein erhöhtes Differenzierungspotential [YOON et al., 2012] und sind unempfindlicher gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod bzw. Apoptose [BHANG et al., 2011]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Sphäroide im Vergleich zu zweidimensionalen Kulturen vermehrt VEGF und FGF-2 sezernieren. Dies kann unter *in vivo* Bedingungen die Angiogenese stimulieren [BHANG et al., 2011].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit analysiert, ob die Besiedlung von Scaffolds mit adMSC-Sphäroiden im Vergleich zu einer Besiedlung mit Einzelzellen zu einer verbesserten Vaskularisierung führt. Dafür wurden Scaffolds mit adMSC-Sphäroiden bzw. mit einer vergleichbaren Anzahl von adMSC-Einzelzellen besiedelt. Die Vaskularisierung der Scaffolds konnte im Anschluss mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie und immunhistochemischer Methoden analysiert werden.

Sowohl in der Orthopädie als auch in der Traumatologie stellt die Rekonstruktion von ausgedehnten Knochendefekten eine große Herausforderung dar. Der aktuelle Goldstandard zur Therapie solcher Defekte ist noch immer die Transplantation von autologem Knochengewebe. Für dieses Verfahren ist das benötigte Knochenmaterial jedoch nur begrenzt verfügbar. Außerdem ist für dieses Vorgehen auch immer ein zweiter Eingriff zur Entnahme des Gewebes notwendig, was oft mit Schmerzen und erhöhter Morbidität assoziiert ist [BECKER et al., 2011; DIMITRIOU et al., 2011]. Mit Hilfe gentherapeutischer Verfahren und der lokalen Anwendung von

Wachstumsfaktoren kann die körpereigene Fähigkeit zur Knochenheilung zwar gesteigert werden, jedoch kann die Effektivität und Sicherheit solcher Verfahren bis dato nicht ausreichend gewährleistet werden. So wurden beispielsweise bei der Anwendung des Wachstumsfaktors bone morphogenetic protein (BMP)-2 bei Wirbelsäulenoperationen starke Nebenwirkungen wie heterotope Ossifikationen, neurologische Defizite, Ödeme und Entzündungen beobachtet [CARREON et al., 2008; SHAHLAIE und KIM, 2008; EPSTEIN, 2013]. Es besteht folglich ein großes Interesse an einem Knochenzell-basierten Tissue Engineering, das die Schlüsselfunktionen der körpereigenen Knochenheilungskaskade nutzt, um eine simultane Regeneration von Gefäßen und Knochen zu erzielen [RAO und STEGEMANN, 2013].

Die zelluläre Grundlage eines solchen Ansatzes könnten adMSCs sein, da sie sich unter osteogenen Kulturbedingungen in Matrix-produzierende Knochenzellen differenzieren können [QURESHI et al., 2014]. Sie wurden daher bereits im Rahmen klinischer Studien zur Rekonstruktion von Knochendefekten mit vielversprechenden Ergebnissen eingesetzt [SÁNDOR et al., 2014]. Knochenneubildung und Angiogenese sind Prozesse, die während der Knochendefektheilung eng miteinander assoziiert sind [SEGAR et al., 2013]. Im Knochen-Tissue Engineering versucht man daher beide Vorgänge zu stimulieren und zu optimieren. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die Kultivierung von adMSC-Sphäroiden sowohl die Ausbildung von Blutgefäßen als auch eine osteogene Differenzierung bewirken kann [HUTTON et al., 2013]. Somit stellen adMSCs eine ideale Quelle für die *in vitro* Generierung von Knochenkonstrukten mit Gefäßanteilen dar.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden in einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit adMSC-Sphäroide generiert, die zunächst *in vitro* in osteogenem Differenzierungsmedium präkultiviert wurden. Diese wurden anschließend auf Polyurethan-Scaffolds gesiedelt und in die Rückenhautkammer implantiert, um *in vivo* ihr Vaskularisierungsverhalten sowie ihre Knochenmatrix-bildenden Eigenschaften im Vergleich zu undifferenzierten Sphäroiden zu analysieren.

Um die Vaskularisierung der implantierten Polyurethan-Scaffolds zu untersuchen, wurde im ersten und zweiten Teil der vorliegenden Arbeit das Modell der Rückenhautkammer der Maus verwendet. Mit diesem Modell in Kombination mit der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie war es möglich, während eines 14-tägigen Versuchszeitraums die Neubildung sowie das Wachstum von Blutgefäßen

innerhalb der Implantate qualitativ und quantitativ zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Parameter wie z.B. die funktionelle Kapillardichte oder der Anteil perfundierter Untersuchungsfelder, innerhalb der Scaffolds und dem umgebenden Gewebe gemessen. Mit Hilfe immunhistochemischer und histologischer Untersuchungen konnten im Anschluss an den 14-tägigen Beobachtungszeitraum weitere Analysen durchgeführt werden. So wurde das Einwachsen der Implantate in das Empfängergewebe beurteilt. Außerdem konnte untersucht werden, ob die neugebildeten Gefäße aus dem Empfängergewebe stammten oder sich durch die Differenzierung der Stammzellen in Endothelzellen entwickelten.

4. Ziel der Studie

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde eine neue Strategie zur Verbesserung der Vaskularisierung von Scaffolds durch Besiedlung mit adMSC-Sphäroiden untersucht.

Im ersten Abschnitt erfolgte der Vergleich von Polyurethan-Scaffolds, die mit einzelnen adMSCs bzw. adMSC-Sphäroiden besiedelt wurden, mit unbesiedelten Kontroll-Scaffolds. Zu diesem Zweck wurden die Scaffolds in Rückenhautkammern von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen implantiert, um dort ihre Vaskularisierung über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen zu analysieren. Auf diese Weise sollte die Hypothese geprüft werden, dass Scaffolds, die mit adMSC-Sphäroiden besiedelt werden, eine bessere Vaskularisierung aufweisen als Scaffolds, die mit einzelnen adMSCs besiedelt sind.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurden osteogen differenzierte adMSC-Sphäroide mit undifferenzierten adMSC-Sphäroiden verglichen. Dabei sollte die Hypothese geprüft werden, dass *in vitro* osteogen differenzierte adMSC-Sphäroide *in vivo* weiterhin Knochenmatrix bilden und zusätzlich die Vaskularisierung von Scaffolds fördern.

5. Material und Methodik

5.1. Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden 12-16 Wochen alte, transgene C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J-Mäuse (The Jackson Laboratory, Maine, USA) sowie entsprechende C57BL/6-Wildtyp-Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 21-26g verwendet. Während der Versuche wurden alle Tiere in einem klimatisierten Raum (Temperatur: 22°C) bei zwölfstündigem Tag-/Nachtrhythmus unter Bereitstellung von Laborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser *ad libitum* in Einzelkäfigen gehalten. Alle Tierversuche wurden von dem zuständigen Landesamt für Verbraucherschutz (Saarbrücken) genehmigt und unter Berücksichtigung des nationalen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

5.2. Modell

5.2.1. Isolierung und Charakterisierung von adMSCs

Für die Isolierung von adMSCs wurde das epididymale Fettgewebe von männlichen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J-Mäusen entnommen. In diesen Tieren emittieren alle Gewebe außer Erythrozyten und Haare durch das in ihnen enthaltene grün fluoreszierende Protein (GFP) Fluoreszenzlicht unter Blaulicht-Epi-Illumination [OKABE et al., 1997].

Die Versuchstiere wurden mit einer intraperitonealen (i.p.) Injektion eines Gemisches aus Ketaminhydrochlorid (75mg/kg Körpergewicht; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (25mg/kg Körpergewicht; Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Nach medianer Laparotomie konnten die epididymalen Fettpolster vorsichtig exzidiert und umgehend in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; 10% fetales Kälberserum (FKS), 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe, Deutschland) transferiert werden. Nach dreimaliger Spülung der Fettpolster in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurden sie mittels einer Schere zunächst manuell zerkleinert. Unter

Standardkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂) wurden die Fragmente anschließend unter ständigem Rühren für 5-7min in NB4G Kollagenase (0,5U/ml; Serva, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Nach der Neutralisierung der Kollagenase mit PBS, das 20%iges FKS enthielt, wurde die Zellsuspension wiederholt für 5min bei 37°C inkubiert, um dadurch wiederholt Fettüberstände abzunehmen. Die zurückbleibende Zellsuspension wurde für 10min schonend bei 40xg zentrifugiert, um die in der Suspension enthaltenen Gefäßfragmente zu entfernen. Durch erneutes 5-min Zentrifugieren der Restsuspension bei 200xg konnten schließlich die restlichen Zellen isoliert werden, die adMSCs enthielten.

Um die frisch isolierten adMSCs zu charakterisieren, wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (n=4) die Expression verschiedener Stammzellmarker analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit folgenden Antikörpern inkubiert: CD117-Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), CD34-FITC (BD Pharmingen), CD90.2-Phycoerythrin (PE) (BD Pharmingen), unmarkierter Ziege-anti-Maus-CD13-Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) mit Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Cyanin 3 (Cy3) (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) als Sekundärantikörper und unmarkierter Ratte-anti-Maus-CD73-Antikörper (BD Pharmingen) mit Ziege-anti-Ratte-IgG-Cy3 als Sekundärantikörper (Dianova GmbH). Für Doppelfärbungen wurden Sca-1-FITC (BD Pharmingen) und VEGFR-2-PE (BD Pharmingen) eingesetzt. FITC- und PE-markiertes isotyp-identisches Ratte-IgG2a_κ (BD Pharmingen), Ziege-anti-Ratte-IgG-Cy3 (Dianova GmbH) und Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Cy3 (Dianova GmbH) dienen als Kontrolle. Die Durchflusszytometrie wurde mit Hilfe eines FACScan (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die erhaltenen Daten konnten anschließend mit dem CellQuest Pro Softwareprogramm (BD Biosciences) ausgewertet werden.

5.2.2. Herstellung undifferenzierter und differenzierter adMSC-Sphäroide

Für die Herstellung undifferenzierter adMSC-Sphäroide wurden die isolierten adMSCs für 11 Tage in cell growth medium MV (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) kultiviert und expandiert. Um eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten, wurde das Medium alle 2 Tage gewechselt.

Zur Herstellung osteogen differenzierter Sphäroide wurden die isolierten adMSCs für 25 Tage in endothelial cell growth medium MV (PromoCell) kultiviert, welches folgende Zusätze enthielt: 10mM β -Glycerolphosphat (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland), 50 μ g/ml Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 10nM Dexamethason (Sigma-Aldrich), 10nM Vitamin K3 (Sigma-Aldrich), 10nM Vitamin D3 (Calbiochem), 1ng/ml transforming growth factor (TGF)- β (Peprotech, Rocky Hill NJ, USA), 25ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF; Promokine, Heidelberg, Deutschland) und 25ng/ml fibroblast growth factor (FGF)- β (Promokine). Das Medium wurde ebenfalls alle 2 Tage gewechselt. Im Anschluss konnten sowohl die differenzierten als auch die undifferenzierten Zellen mittels der sogenannten Liquid-Overlay-Technik unter identischen Kulturbedingungen zu dreidimensionalen Sphäroiden mit jeweils 5.000 Zellen aggregiert werden.

Die Liquid-Overlay-Technik ist eine etablierte Methode zur Herstellung von Sphäroiden [LASCHKE et al., 2012]. Dabei wird auf den Boden der einzelnen Wells einer 96-Well-Platte 30 μ l 1%iges, in der Mikrowelle geschmolzenes Agarosegel (Sigma-Aldrich) gegeben. Nach einer 2-stündigen Ruhephase, in der das Gel bei Raumtemperatur auspolymerisiert, werden 5.000 adMSCs auf das Gel aufgetragen und in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Da die Zellen nicht an der Agarose adhären können, aggregieren sie unter diesen Bedingungen spontan zu dreidimensionalen Sphäroiden (*Abbildung 1A und B*), welche nach drei Tagen stabil genug sind, um transplantiert zu werden.

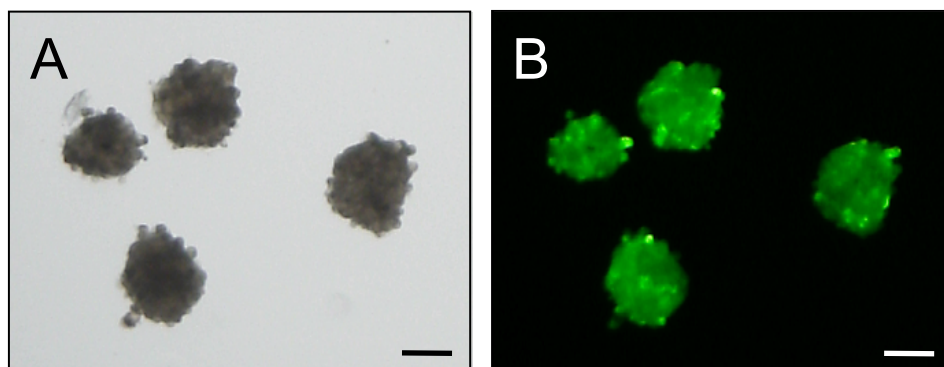


Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahmen von adMSC-Sphäroiden. **A:** Lichtmikroskopische Aufnahme. **B:** Aufnahme in Blaulicht-Epi-Illumination. Die aus C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J-Spendermäusen isolierten adMSCs emittieren aufgrund ihres GFP-Gehalts grünes Licht. Maßstab: **A, B** = 190 μ m.

5.2.3. Herstellung der Scaffolds

In der vorliegenden Arbeit wurden Hydroxylapatit/Polyurethan-Scaffolds verwendet, welche im AO Research Institute in Davos von Dr. David Eglin hergestellt wurden. Für ihre Herstellung wurde die sogenannte Salz-Auswasch-Umkehr-Methode benutzt [GORNA et al., 2006; BOISSARD et al., 2009]. Bei dieser Methode werden Hydroxylapatit-Nanopartikel und Polyurethan, die in Form einer Polymerlösung vorliegen, für 24h mit Salzkristallen bei Raumtemperatur vermischt. Nach Ablauf dieser Zeit wird das Lösungsmittel entzogen, sodass ein Produkt aus festem Salzkristall und Polymer entsteht. Im letzten Schritt wird das Salz ausgewaschen, wodurch das fertige Scaffold zurückbleibt. Die Hydroxylapatit-Partikel werden zugefügt, um die osteokonduktiven Eigenschaften des Scaffolds für die Anwendung im Knochen-Tissue Engineering zu verbessern [LASCHKE et al., 2010]. Die Größe der gewünschten Poren kann über den Salzgehalt reguliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden 3 x 3 x 1mm große Scaffolds mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von 200-600µm benutzt.

5.2.4. Besiedlung der Scaffolds

Die Scaffolds wurden mittels eines dynamischen Besiedlungsverfahrens mit adMSC-Sphäroiden besiedelt. Dazu wurde jeweils ein leeres Scaffold in der Spitze einer 1ml Spritze (BD Plastipak; BD Biosciences) eingelegt und mit Hilfe eines Gummiringes fixiert. In den konischen Teil der Spritzenspitze wurden 100µl PBS pipettiert, in der 40 Sphäroide enthalten waren (*Abbildung 2A*). Durch abwechselndes Ziehen und Drücken des Spritzenstempels wurden die Sphäroide durch die Poren des Scaffolds gesaugt bzw. gedrückt. Auf diese Weise blieben die Sphäroide nach und nach in den Poren hängen, so dass der restliche PBS-Überstand schließlich frei von Sphäroiden war (*Abbildung 2B und C*). Anschließend konnte das besiedelte Scaffold vorsichtig aus der Spritze entnommen werden.

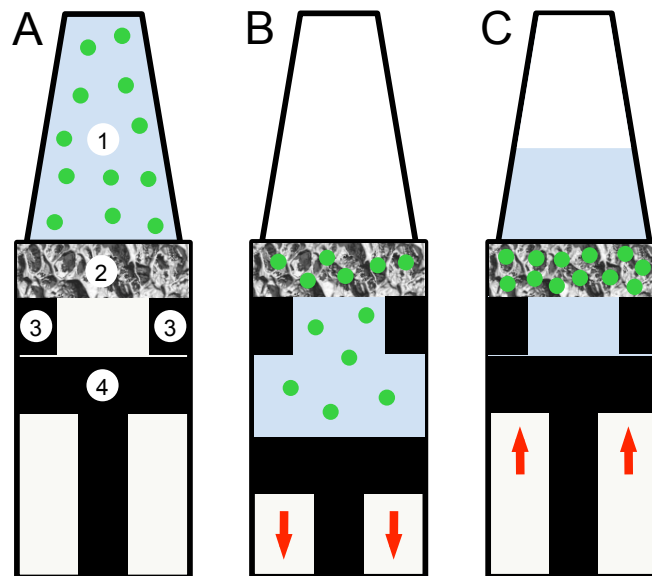


Abbildung 2: Besiedlung von Polyurethan-Scaffolds mit adMSC-Sphäroiden mit Hilfe eines dynamischen Besiedlungsverfahrens. **A:** Das Scaffold (2) wird durch einen Gummiring (3) in einer 1ml Spritze fixiert. Die Spritzen Spitze enthält 100µl PBS-Lösung, in der sich 40 Sphäroide befinden (1). **B, C:** Durch die Bewegung des Spritzenstempels (A, 4) und daraus resultierenden negativen und positiven Druckschwankungen innerhalb der Spritze, wird das PBS mehrmals durch das Scaffold gesaugt bzw. gepresst, in dessen Poren sich schließlich die Sphäroide festsetzen.

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden in einer Kontrollgruppe (adMSC-Einzelzell-Gruppe) 200.000 undifferenzierte adMSCs einzeln auf die Scaffolds gesiedelt. Hierfür wurden die Zellen entsprechend dem Protokoll für undifferenzierte Sphäroide zunächst für 14 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte die Besiedlung der einzelnen adMSCs auf die Scaffolds. Dafür wurden die Scaffolds mit Hilfe einer Pinzette zusammengedrückt und 3µl einer adMSC-Zellsuspension aufgetragen. Durch das Loslassen der Pinzette entstand ein Sog im Inneren der Scaffolds, der die Zellsuspension mit sich zog und somit die Zellen in den Scaffolds verteilte.

Um sicher zu sein, dass sich nach der Besiedlung in den PBS-Überständen keine Einzelzellen oder Sphäroide mehr befanden, wurden die verbliebenen PBS-Überstände im Anschluss an die beiden unterschiedlichen Besiedlungsverfahren mikroskopisch überprüft. Da sich bei beiden Verfahren nach mehrfacher Kontrolle keine relevanten Zellrückstände zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass bei beiden Methoden eine erfolgreiche Besiedlung mit 200.000 Zellen pro Scaffold erfolgte.

5.2.5. Modell der Rückenhautkammer

Die Vaskularisierung der besiedelten Scaffolds wurde mit Hilfe des Modells der Rückenhautkammer analysiert (*Abbildung 3*). Dieses Modell wird seit vielen Jahren verwendet, um angiogene Prozesse wie die Vaskularisierung von transplantierten Geweben und Implantaten zu untersuchen. Mit Hilfe dieses Modells in Kombination mit der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, nach intravenöser Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen die gesamte Mikrozirkulation innerhalb der Rückenhautkammer sowie das Einwachsen neuer Blutgefäße in Implantate zu visualisieren und anschließend computergestützt quantitativ auszuwerten.

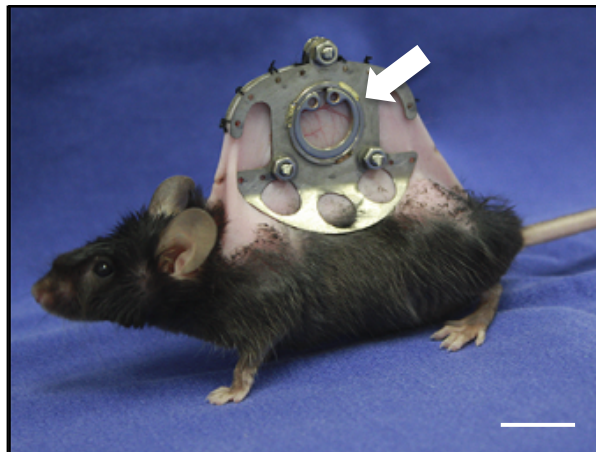


Abbildung 3: C57BL/6-Wildtyp-Maus mit Rückenhautkammer (Gewicht der Kammer: ~2g). In dem Beobachtungsfenster (Pfeil) sind die Blutgefäße des quergestreiften Hautmuskels und des darunter liegenden Subkutangewebes zu erkennen. Maßstab: 14mm.

5.2.6. Präparation der Rückenhautkammer

Zur Präparation der Rückenhautkammer wurde das Versuchstier mit einem Gemisch aus Ketaminhydrochlorid (75mg/kg Körpergewicht; Pharmacia GmbH) und Xylazinhydrochlorid (25mg/kg Körpergewicht; Rompun, Bayer) i.p. narkotisiert. Durch Elektrorasur (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und chemische Depilation (Plica med Creme; Asid Bonz, Böblingen, Deutschland) konnte das Fell des Rückens entfernt werden. Danach wurde die enthaarte Haut mit warmem

Wasser gereinigt und mit 70%-igem Alkohol desinfiziert. Nun begann die eigentliche Präparation der Rückenhautkammer.

Hierzu wurde das Versuchstier zunächst in Bauchlage positioniert und die Haut des Rückens entlang der Mittellinie des Versuchstiers an einer länglichen Hautfalte mit zwei Haltefäden horizontal aufgespannt. Unter Gegenlichtkontrolle wurde hierbei darauf geachtet, dass die beiden Hauptgefäßstämme der Vorder- und Rückseite der Hautfalte zur Deckung kamen. Anschließend wurde der obere Teil der Rückseite der aus zwei symmetrischen Titanrahmen bestehenden Rückenhautkammer (*Abbildung 4*) entlang der Oberkante der Hautfalte mit 5.0-Seidefäden fixiert.

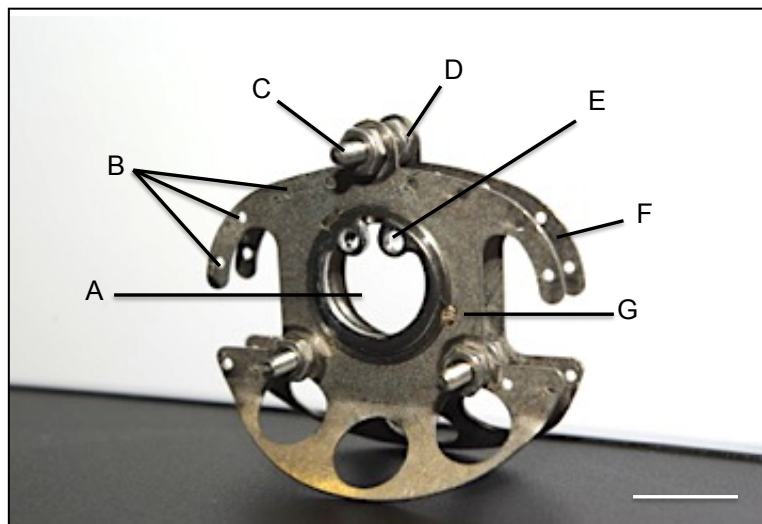


Abbildung 4: Perspektivische Aufsicht auf eine Rückenhautkammer für die Maus bestehend aus zwei symmetrischen Titanrahmen (Gewicht ~2g). **A:** Beobachtungsfenster mit Deckglas; **B:** Bohrlöcher zur Befestigung der Kammer an der Rückenhaut des Versuchstieres mittels Fixationsfäden; **C:** Verbindungsschraube der beiden Kammerrahmen; **D:** Mutter der Verbindungsschraube; **E:** Sprengring zur Fixierung des Deckglases; **F:** Hinterer Kammerrahmen; **G:** Vorderer Kammerrahmen. Maßstab: 11mm.

Zur Befestigung des basalen Teils der Rückseite der Kammer an der Haut des Versuchstieres mussten mit einem Skalpell zwei kleine Inzisionen in diesem Bereich geschaffen werden, um die zuvor am Rahmen befestigten Schrauben auf die andere Seite führen zu können. Diese wurden mit zwei Klemmen fixiert. Unter erneuter Gegenlichtkontrolle zeichnete sich aufgrund des Schattenwurfs des bereits angebrachten Rahmens auf der Haut das kreisrunde Beobachtungsfeld mit einem Durchmesser von 11mm ab. Dies diente der Orientierung beim Einzeichnen des Operationsfelds auf der vorderen Hautfaltenseite mit einem Durchmesser von ca. 15mm. Das Operationsfeld wurde größer als das eigentliche spätere

Beobachtungsfeld gewählt, um auf diese Weise eine Einklemmung des Gewebes durch die Vorderseite des Titanrahmens zu vermeiden. Die anfänglich angebrachten Haltefäden konnten nun wieder entfernt werden. Zur Durchführung der folgenden operativen Schritte wurde das Versuchstier in Seitenlage positioniert.

Um kleinste Strukturen während der Operation besser erkennen zu können, wurde ein Stereo-Operationsmikroskop (Wild M 650; Leitz, Schweiz) verwendet. Mit dessen Hilfe und unter zusätzlichem Einsatz mikrochirurgischer Instrumente konnten folgende Gewebeschichten in dem Operationsfeld klar identifiziert und nacheinander abgetragen werden: Kutis, Subkutis mit quergestreiftem Hautmuskel und beide Schichten des Retraktormuskels sowie subkutanes Fettgewebe (*Abbildung 5*). Das freipräparierte Operationsfeld, bestehend aus dem gegenüberliegenden quergestreiften Hautmuskel und darunter liegender Subkutis und Kutis, konnte anschließend nach mehrfacher Spülung mit steriler Elektrolytlösung verschlossen werden. Dafür wurden die auf die Verbindungsschrauben aufgebrachten Klemmen, die dem Erhalt der Gewebespannung dienen, entfernt sowie der vordere Kammerrahmen entlang der Führung der Schrauben als Gegenstück zum bereits angebrachten hinteren Rahmen positioniert und mit Stahlmuttern in einem Abstand von 400-500µm verschraubt. Als letzter Schritt der Präparation wurde das Deckglas durch Adhäsion unter Vermeidung von Lufteinschlüssen auf den freipräparierten Muskel des Beobachtungsfensters platziert und mit einem Sprengring fixiert.

Während der gesamten 14-tägigen Beobachtungszeit war es möglich, durch Entfernen des Deckglases und des Sprengrings Zugang zum Operationsfeld zu erhalten. Nach der Implantation der Rückenhautkammer wurde den Versuchstieren 48h Zeit gegeben, um sich von Narkose und chirurgischem Trauma zu erholen. Im Anschluss konnte der Versuch fortgeführt und die Scaffolds der jeweiligen Untersuchungsgruppen in die Rückenhautkammer implantiert werden.

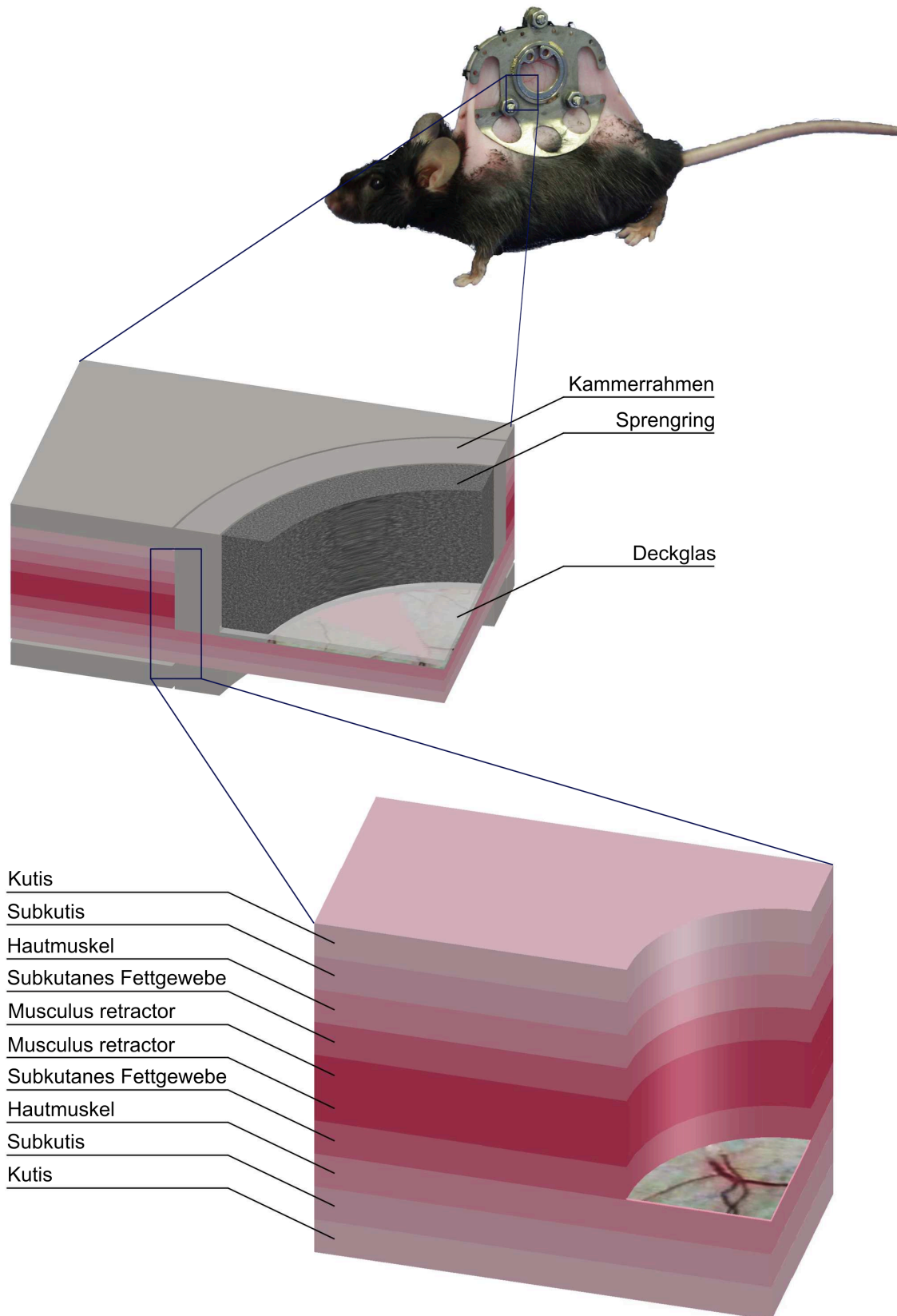


Abbildung 5: Schematischer Querschnitt der für die Implantation der Rückenhautkammer präparierten Hautschichten.

5.2.7. Implantation der Scaffolds

Zur Implantation eines Scaffolds in die Rückenhautkammer wurde das Versuchstier narkotisiert, in Seitenlage auf einer eigens angefertigten Plexiglasbühne fixiert und der Sprengring und das Deckglas entfernt. Das Scaffold wurde zentral in das Beobachtungsfeld der Kammer implantiert, welches anschließend erneut mit einem Deckglas und einem Sprengring verschlossen wurde (*Abbildung 6*). Durch Zugabe steriler, 0,9%iger NaCl-Lösung konnten dabei Lufteinschlüsse vermieden werden.

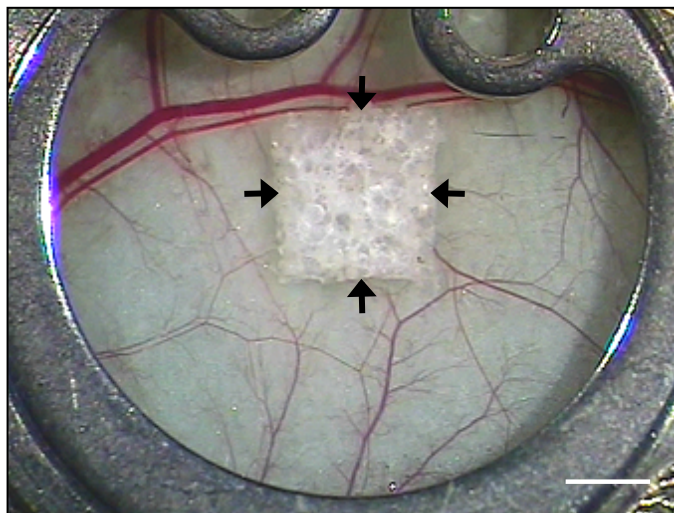


Abbildung 6: Beobachtungsfenster einer Kammer mit implantiertem Polyurethan-Scaffold (Pfeile markieren die Kanten des Scaffolds). Maßstab: 1,4mm.

5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurden die Versuchstiere narkotisiert und auf einer speziellen Plexiglasbühne horizontal platziert. Zur Kontrastverstärkung der Blutgefäße durch Anfärben des Blutplasmas wurde anschließend 0,05ml 5%iges Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)-markiertes Dextran 150.000 (Sigma-Aldrich) intravenös (i.v.) in den retrobulbären Venenplexus appliziert. Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Zeiss AxioTech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100W Quecksilber (HBO)-Dampflampe benutzt, die an einen Filterblock gekoppelt war, mit dem blaues, grünes sowie ultraviolettes Licht erzeugt werden konnte. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe einer CCD (charge coupled device)-Videokamera (FK69990, Pieper, Schwerte,

Deutschland) auf DVD aufgenommen. Auf diese Weise konnte die Auswertung der mikroskopischen Bilder zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden. 5x, 10x und 20x Objektive mit langem Arbeitsabstand (Zeiss) wurden benutzt, um Vergrößerungen von x115, x230 und x460 auf einem 14-Zoll Bildschirm zu erzielen (Trinitron, Sony, Tokyo, Japan) (*Abbildung 7*).

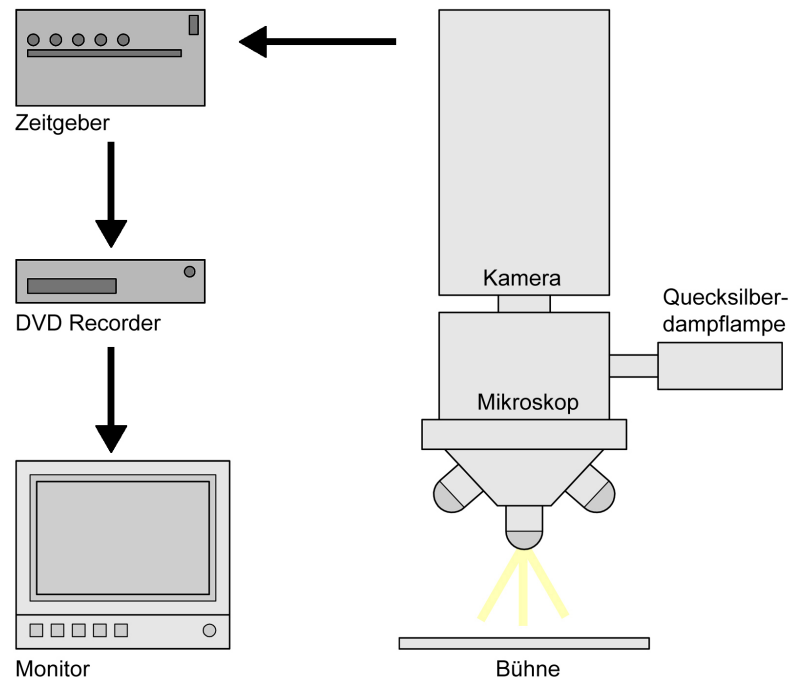


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Arbeitsplatzes zur intravitalem Fluoreszenzmikroskopie.

5.3.1. Mikrozirkulatorische Parameter

Die Rückenhautkammern der Versuchstiere wurden am Tag der Scaffold-Implantation (Tag 0) sowie an den Versuchstagen 3, 6, 10 und 14 intravitalemikroskopisch untersucht und auf DVD aufgenommen. Die DVDs konnten im Anschluss an die Aufnahmen zu einem beliebigen Zeitpunkt mit Hilfe des computerassistierten Bildverarbeitungssystems CapImage (Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet werden.

Es wurden ein 5x, 10x sowie ein 20x Objektiv verwendet, um Bilder von den Scaffolds in den Rückenhautkammern aufzunehmen. Zunächst wurden an Tag 0 Aufnahmen der leuchtenden GFP-positiven Sphäroide bzw. Einzelzellen in Blaulicht-Epi-Illumination angefertigt. Diese wurden an den folgenden Versuchstagen erneut

aufgesucht, um morphologische Veränderungen während des Versuchszeitraumes zu dokumentieren. Anschließend wurde FITC-markiertes Dextran injiziert, um blutperfundierte Gefäße darstellen zu können.

Unter Verwendung des 20x Objektivs erfolgte eine Unterteilung der Randbereiche sowie des Zentrums der Scaffolds in 8 Beobachtungsfelder (regions of interest (ROIs), *Abbildung 8A und B*). In diesen Feldern wurde zu jedem Beobachtungszeitpunkt das Vorhandensein und die Dichte neu gebildeter Blutgefäße untersucht.

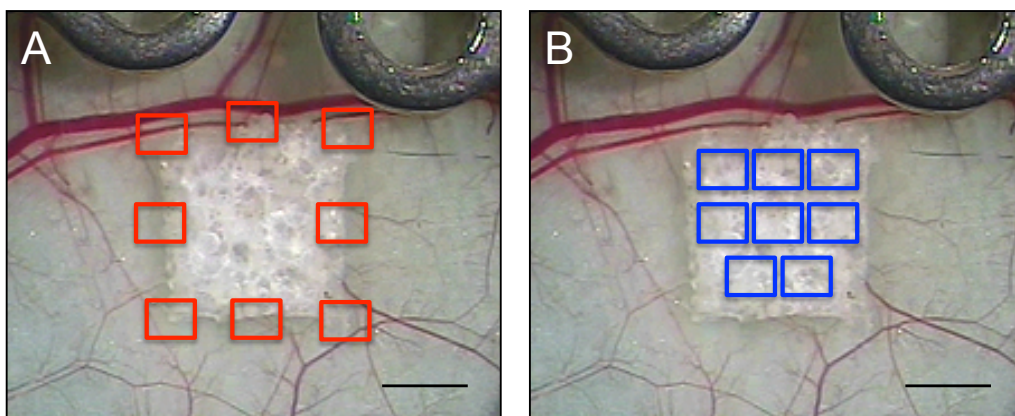


Abbildung 8: Aufnahmen des Beobachtungsfensters einer Rückenhautkammer mit implantiertem Polyurethan-Scaffold. **A:** Die 8 roten Rahmen markieren die Beobachtungsfelder im Randbereich des Scaffolds. **B:** Die 8 blauen Rahmen markieren die Beobachtungsfelder im Zentrum des Scaffolds. Maßstab: 1,5mm.

5.3.1.1. Perfundierte ROIs

Mit dem 20x Objektiv wurde an den einzelnen Versuchstagen untersucht, in wie vielen ROIs im Randbereich und Zentrum der Scaffolds sich neue, perfundierte Gefäße ausgebildet hatten. Dabei betrug die Größe eines ROIs jeweils $0,4\text{mm}^2$. Die Anzahl der ROIs, welche diese Kriterien erfüllten, wurde anschließend durch die Gesamtzahl der analysierten ROIs ($n=8$ im Randbereich und $n=8$ im Zentrum) geteilt und prozentual als „perfundierte ROIs“ angegeben.

5.3.1.2. Funktionelle Kapillardichte

Zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte wurde die Gesamtlänge der neugebildeten Blutgefäße auf die Auswertefläche bezogen. Dafür wurden die Gefäße in jedem ROI am Computermonitor mittels Maus nachgezeichnet und deren Gesamtlänge ausgemessen. Daraus konnte im Anschluss die funktionelle Kapillardichte pro ROI in cm/cm^2 errechnet werden.

5.4. Histologie und Immunhistochemie

5.4.1. Histologische Färbungen

Im Anschluss an die letzten intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Tag 14 wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Narkose getötet. Anschließend wurden die Implantate zusammen mit dem angrenzenden Gewebe exzidiert und für 24h in 4%iger Formaldehydlösung bei 20°C fixiert, um danach in Paraffin eingebettet zu werden. Die im Anschluss hergestellten Serienschnitte mit einer Schichtdicke von 2 μm wurden nach Standardprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Mineralisierung der Sphäroide wurde durch Anfärben von Phosphatablagerungen innerhalb der histologischen Schnitte mit Hilfe einer von Kossa-Färbung nachgewiesen. Hierzu wurden die Schnitte in 5%iger Silbernitratlösung (Applichem, Darmstadt, Deutschland) für 1h unter ultraviolettem Licht inkubiert und anschließend mittels 0,1%iger Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung (Sigma-Aldrich) für 5min gegengefärbt. Es resultierte so eine Schwarzfärbung der Phosphateinlagerungen.

5.4.2. CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung

Um nachzuweisen, dass sich innerhalb der Scaffolds neue Gefäße ausgebildet haben, wurden den Schnittpräparaten ein monoklonaler Ratte-anti-Maus CD31-Antikörper (1:30; Dianova GmbH) zugegeben. Das Oberflächenantigen CD31 ist ein Marker für Endothelzellen. Um diesen Antikörper im Anschluss an seine Anlagerung an CD31 sichtbar zu machen, wurde ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der eine

spezifische Bindung mit dem CD31-Antikörper einging. Als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Ratte-Cy3-Antikörper (1:50; Dianova GmbH), der durch Bindung an den CD31-Antikörper die Gefäße unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machte.

Die verwendeten adMSCs stammten von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Spendermäusen. Es konnte daher untersucht werden, ob die in den Gewebekonstrukten vorhandenen Gefäße aus dem Empfängergewebe einwuchsen und somit GFP-negativ waren oder ob sich die Gefäße aus GFP-positiven adMSCs entwickelten. Dafür wurde den Schnitten im Anschluss an die CD31-Fluoreszenzfärbung ein 0,05%iger Citraconsäureanhydrid-Puffer zugegeben und die Schnitte bei einem pH-Wert von 7,4 für 1h auf 98°C erhitzt. Zur Verstärkung des GFP-Signals erfolgte im Anschluss eine Inkubation der Schnitte bei 4°C mit einem Ziege-anti-GFP-Antikörper (1:200; Biomol, Hamburg, Deutschland). Ein Biotin markierter Affe-anti-Ziege-Sekundärantikörper wurde nun für 2h bei 37°C hinzugegeben (1:15; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, MD, USA). Nach dem Hinzufügen von grün fluoreszierendem, FITC-markiertem Streptavidin (1:50; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) war aufgrund der großen Affinität zwischen Biotin und Streptavidin das GFP-Signal schließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop gut detektierbar. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit Hoechst 33342 (1:500; Sigma-Aldrich) gefärbt.

5.4.3. Mikroskopische Analyse

Mit Hilfe eines BX60 Mikroskops (Olympus, Hamburg, Deutschland) konnten alle Schnitte quantitativ analysiert werden. Dafür wurden sowohl im Zentrum als auch in den Randbereichen der implantierten Scaffolds die Gefäßdichte (mm^{-2}) sowie der Anteil GFP-positiver Gefäße von allen vorhandenen Gefäßen (%) ermittelt.

5.4.4. Hochauflösende Mikrocomputertomographie (μ CT)

Der Nachweis mineralisierter Matrix erfolgte zusätzlich zu der Analyse der von Kossa gefärbten, histologischen Schnittpräparate mit Hilfe eines hochauflösenden μ CTs. Hierzu wurden sowohl histologische Schnitte frisch besiedelter Scaffolds als auch histologische Schnitte von Scaffolds, die 14 Tage in der Rückenhautkammer implantiert waren, untersucht. Mit einer isotropen Voxelgröße von $2\mu\text{m}$ (SkyScan 1172, Version 1.6, RJL Micro & Analytic GmbH, Karlsdorf-Neuthard, Deutschland) und einer Energie von 50 kV bei $167\mu\text{A}$ wurden die Schnitte ohne Filter gescannt. Die Rekonstruktion der Bilder erfolgte mit Hilfe des SkyScan NRecon Package (Version 1.6; RJL Micro & Analytic GmbH). Dabei konnten die ROIs in 5 aufeinanderfolgenden Schichten mit einer Dicke von jeweils $2\mu\text{m}$ dreidimensional dargestellt werden (SkyScan CTAn, Version 1.9.1.0; RJL Micro & Analytic GmbH). Die Abgleichung der Knochengewebdichte wurde durch das Protokoll des Systemherstellers ausgeführt. Übereinstimmend mit vorherigen Studien [BOSEMARK et al., 2013] wurden Graustufen von 0-67 und von 68-255 benutzt, um zwischen Weichgewebe und mineralisiertem Gewebe zu unterscheiden. Die Kontrolle der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe visueller Inspektion der Bilder und qualitativem Vergleich mit histologischen Schnitten.

5.5. Experimentelles Protokoll

5.5.1. Versuchsgruppen

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in 2 Studienabschnitte. Im ersten Studienabschnitt wurden die folgenden 3 Gruppen analysiert:

Gruppe 1: 7 nicht besiedelte Hydroxylapatit/Polyurethan-Scaffolds wurden in Rückenhautkammern implantiert.

Gruppe 2: 7 besiedelte Hydroxylapatit/Polyurethan-Scaffolds wurden in Rückenhautkammern implantiert. Sie enthielten jeweils 200.000 undifferenzierte adMSC-Einzelzellen.

Gruppe 3: 7 besiedelte Hydroxylapatit/Polyurethan-Scaffolds wurden in Rücken-
hautkammern implantiert. Sie enthielten jeweils 40 undifferenzierte
adMSC-Sphäroide à 5.000 Zellen, was ebenfalls einer Gesamtzahl von
200.000 Zellen entsprach.

Im zweiten Studienabschnitt wurden die folgenden 2 Gruppen untersucht:

Gruppe 1: 7 besiedelte Hydroxylapatit/Polyurethan-Scaffolds wurden in Rücken-
hautkammern implantiert. Sie enthielten jeweils 40 undifferenzierte
adMSC-Sphäroide à 5.000 Zellen.

Gruppe 2: 7 besiedelte Hydroxylapatit/Polyurethan-Scaffolds wurden in Rücken-
hautkammern implantiert. Sie enthielten jeweils 40 osteogen
differenzierte adMSC-Sphäroide à 5.000 Zellen.

5.5.2. Versuchsablauf

Nach Präparation der Rückenhautkammer schloss sich eine Ruhephase von 48h an, in der sich die Versuchstiere von dem Operationstrauma und der Narkose erholen konnten. Danach wurden die jeweiligen Scaffolds in die Kammern implantiert (Tag 0). Nach der Implantation sowie an den Beobachtungstagen 3, 6, 10 und 14 erfolgte die intravitalmikroskopische Analyse. Vor jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung wurden die Versuchstiere narkotisiert. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Kammern regelmäßig auf das Vorhandensein von Entzündungen überprüft. Entzündete Kammern wurden aus dem Versuch ausgeschlossen. Im Anschluss an den letzten Beobachtungstag wurden die Versuchstiere mittels einer Überdosis des Narkosemittels eingeschläfert und Gewebeproben der Rückenhautkammer zu weiteren histologischen sowie immunhistochemischen Analysen entnommen.

5.6. Statistik

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

Es wurden folgende statistische Analysen durchgeführt:

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Datensätze in Bezug auf Normalverteilung und Varianzgleichheit. Unterschiede zwischen zwei Gruppen konnten mit Hilfe des ungepaarten Student's t-Test geprüft werden. Bei Vergleichen von drei Gruppen erfolgte eine „one way analysis of variance for multiple comparisons“ (ANOVA) und anschließend Student-Newman-Keuls Post-hoc-Test. Bei nicht parametrischer Datenverteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Um Vergleiche innerhalb der unterschiedlichen Gruppen an verschiedenen Zeitpunkten zu erfassen, wurde „ANOVA for repeated measures“ mit anschließendem Student-Newman-Keuls Post-hoc-Test angewandt.

Bei sämtlichen statistischen Tests wurde das Software Paket SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet. Unterschiede mit $P < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

6. Ergebnisse

6.1. Mikrozirkulation der Rückenhautkammer

Bei jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung der Versuchstiere wurden die Gefäße des quergestreiften Hautmuskels und des darunterliegenden Subkutangewebes innerhalb der Rückenhautkammer dargestellt. Dazu wurde der Plasmamarker 5% FITC-Dextran in den retrobulbären, venösen Gefäßplexus injiziert. Die Mikrozirkulation der Rückenhautkammer besteht aus verschiedenen Gefäßabschnitten. Es können terminale Arteriolen, Kapillaren, postkapilläre Venolen und Sammelvenolen unterschieden werden. So fließt das oxygenierte Blut über sich verzweigende terminale Arteriolen zu den nutritiven Kapillaren. Die Kapillaren sind parallel in einem Abstand von ca. 40-60µm zueinander angeordnet und strickleiterartig miteinander verbunden. Hier findet der Sauerstoff- und Nährstoffaustausch zwischen Blut und umliegenden Muskelzellen statt. Aus den Kapillaren fließt das Blut in postkapilläre Venolen, die das desoxygenierte Blut in Sammelvenolen drainieren. Venolen und Arteriolen haben einen größeren Durchmesser als Kapillaren und lassen sich somit leicht von ihnen unterscheiden. Venolen unterscheiden sich von Arteriolen wiederum durch ihren langsameren Blutfluss, ihren unregelmäßigeren Wandaufbau sowie ihre Flussrichtung.

6.2. Vaskularisierung der Scaffolds in Abhängigkeit ihrer Besiedlung mit Einzelzellen oder adMSC-Sphäroiden

6.2.1. Charakterisierung undifferenzierter adMSCs und Herstellung der Sphäroide

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass die isolierten adMSCs aus unterschiedlichen Zellpopulationen bestanden. Alle Zellen exprimierten jedoch auf ihrer Zelloberfläche typische mesenchymale Stammzellmarker [MITCHEL et al., 2006; ZIMMERLIN et al., 2010]. Folgende Marker wurden detektiert:

- CD13 ($48 \pm 16\%$)
- CD73 ($21 \pm 1\%$)
- CD90.2 ($70 \pm 3\%$)
- CD117 ($12 \pm 2\%$)

Zusätzlich konnten auch $9 \pm 2\%$ CD34-positive Zellen sowie $6 \pm 1\%$ Sca-1/VEGFR-2-positive endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) identifiziert werden.

Aus diesen Zellpopulationen wurden mit Hilfe der Liquid-Overlay-Technik unter standardisierten Bedingungen runde, dreidimensionale Sphäroide mit einem Durchmesser von $270 \pm 8\mu\text{m}$ hergestellt. Diese Sphäroide wiesen makroskopisch untereinander keine erkennbaren Unterschiede auf.

6.2.2. Besiedlung der Polyurethan-Scaffolds

Alle mit Zellen besiedelten Scaffolds innerhalb der vorliegenden Arbeit enthielten eine Gesamtzahl von 200.000 Zellen. Diese Zellen wurden entweder in Form von Einzelzellen oder als Sphäroide auf die Scaffolds gesiedelt (*Abbildung 9*). Für die Besiedlung der Scaffolds mit Sphäroiden wurde ein dynamisches Besiedlungsverfahren angewandt. Diese Methode wurde ursprünglich für die Beladung von Scaffolds mit Gefäßfragmenten entwickelt [LASCHKE et al., 2012]. Hierbei wurden die Poren eines Scaffolds durch abwechselnden positiven und negativen Druck mit einer Sphäroid-Suspension durchspült. Mit Hilfe dieser Methode konnten die Sphäroide nicht nur auf der Scaffold-Oberfläche, sondern auch in ihrem Zentrum inkorporiert werden (*Abbildung 9A*).

Für die Besiedlung der Scaffolds mit adMSC-Einzelzellen wurden $3\mu\text{l}$ einer adMSC-Einzelzell-Suspension hergestellt und auf die mit Hilfe einer Pinzette komprimierten Scaffolds aufgetragen. Durch das Loslassen der Pinzette entstand ein Sog im Inneren der Scaffolds, der einen Teil der Zellen mit sich zog. Dadurch konnte eine gleichmäßige Verteilung der Einzelzellen innerhalb der Scaffolds erreicht werden (*Abbildung 9B*).

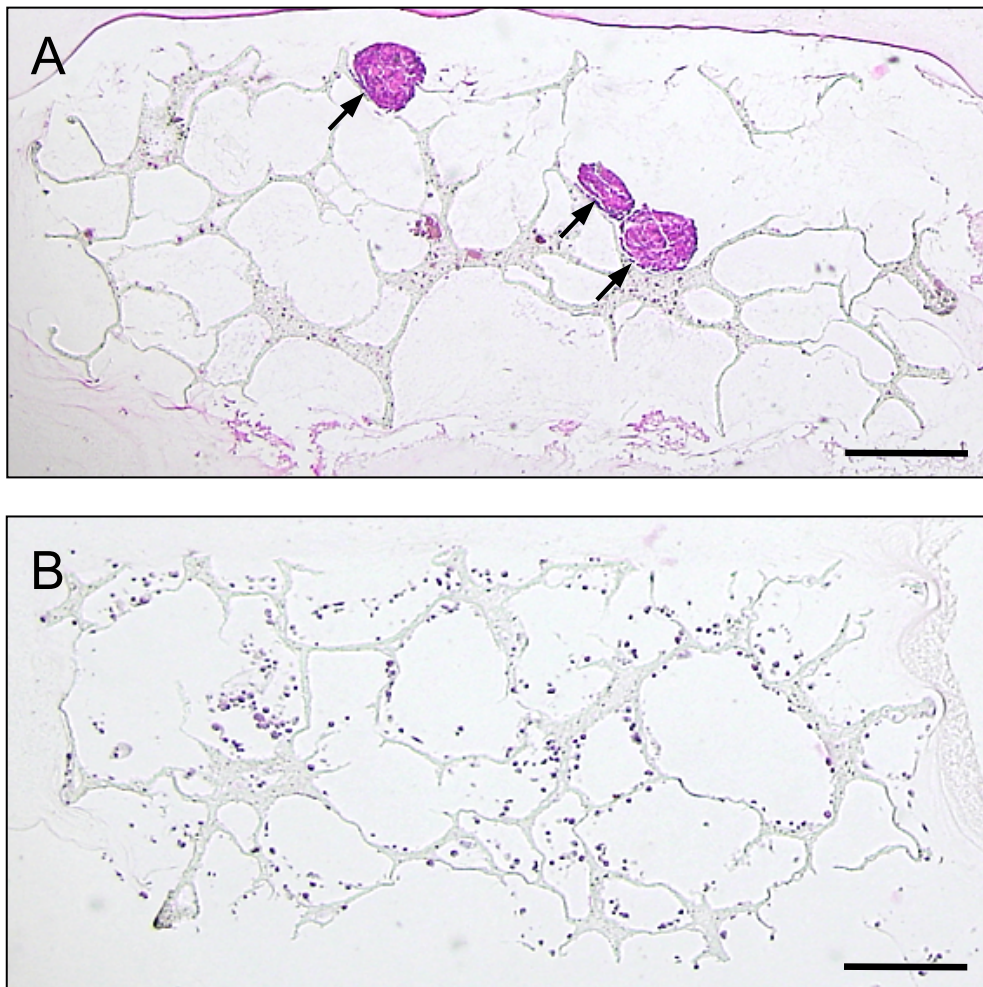


Abbildung 9: HE-Färbung von adMSC-besiedelten Scaffolds. **A:** Scaffold mit adMSC-Sphäroiden (Pfeile). **B:** Scaffold mit adMSC-Einzelzellen. Maßstab: 350µm

6.2.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie konnte die Vaskularisierung der in die Rückenhautkammern von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen implantierten Scaffolds analysiert werden. Die unbesiedelten Kontroll-Scaffolds zeigten dabei die geringste Vaskularisierung während des 14-tägigen Beobachtungszeitraums. In den randständigen Beobachtungsfeldern dieser Scaffolds konnten zwar vereinzelt eingewachsene Gefäße nachgewiesen werden, im Zentrum der Scaffolds waren jedoch keine neugebildeten Gefäße zu finden (*Abbildung 10A und D; Abbildung 11A-D*). adMSC-besiedelte Scaffolds wiesen hingegen eine starke Vaskularisierung auf. So konnte bei Scaffolds, die mit Einzelzell-adMSCs besiedelt waren, ein verstärktes Einwachsen von Blutgefäßen sowohl im Randbereich als auch im Zentrum beobachtet werden (*Abbildung 10B und E*). Bei Scaffolds, die mit adMSC-

Sphäroiden besiedelt wurden, war dies nochmals gesteigert (*Abbildung 10C und F und Abbildung 11A-D*). Im Vergleich zu Einzelzell-adMSC-Scaffolds wurde an den Beobachtungstagen 10 und 14 eine größere Zahl von Gefäßen in zentralen Beobachtungsfeldern detektiert (*Abbildung 11B*). Außerdem konnte bei ihnen eine signifikant höhere Dichte der neu gebildeten Gefäßnetzwerke an Tag 14 nachgewiesen werden (*Abbildung 11D*).

Bei allen Versuchsgruppen wurden zudem unterschiedlich starke Einblutungen im Bereich der Scaffolds beobachtet. Bei unbesiedelten Scaffolds waren diese im Randbereich der Scaffolds lokalisiert. adMSC-besiedelte Scaffolds zeigten sowohl im Randbereich als auch im Zentrum Einblutungen. Bei den Sphäroid-besiedelten Scaffolds waren die Einblutungen am stärksten ausgeprägt (*Abbildung 10A-C*).

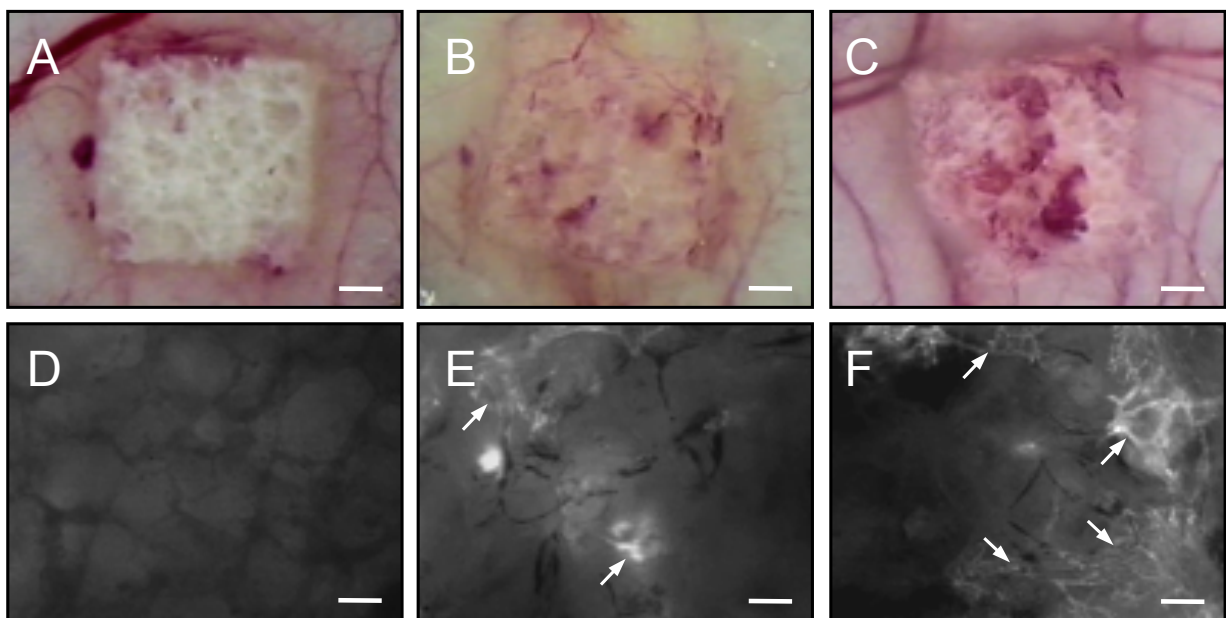


Abbildung 10: *A-C:* Stereomikroskopische Aufnahmen implantierter Scaffolds. *D-F:* Intravitale Fluoreszenzmikroskopie implantierter Scaffolds; Kontrastverstärkung mit 5% FITC-Dextran 150.000 in Blaulicht-Epi-Illumination an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Das adMSC-Sphäroid-besiedelte Scaffold (*C,F*) zeigt im Vergleich zu dem nicht besiedelten Kontroll-Scaffold (*A,D*) sowie dem adMSC-Einzelzell-besiedelten Scaffold (*B,E*) eine verbesserte Vaskularisierung auf der Oberfläche mit vielen perfundierten Gefäßen (*F* vs. *D* und *E* Pfeile) sowie viele Einblutungen (*C* vs. *A* und *B*). Maßstab: *A-C:* 600µm; *D-F:* 190µm.

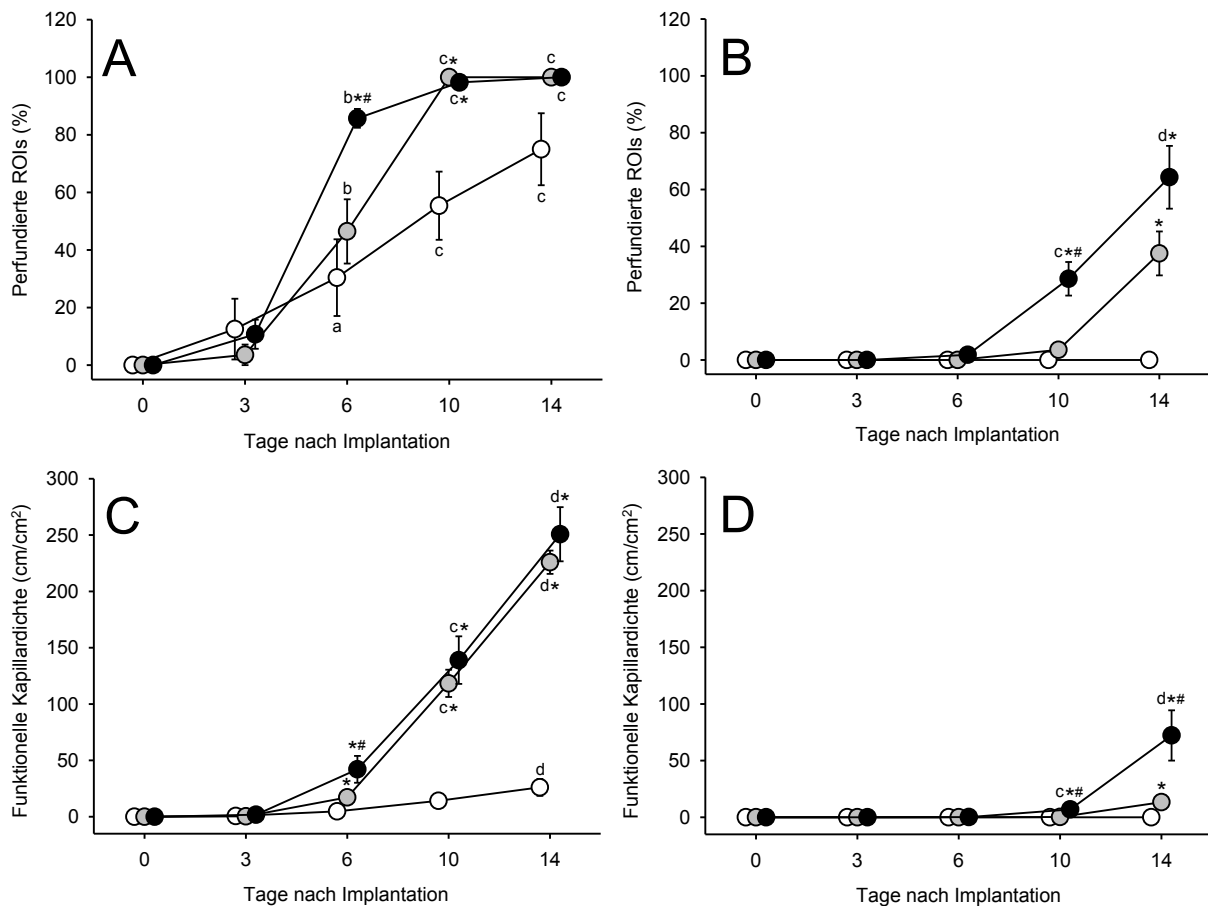


Abbildung 11: A-D: Perfundierte ROIs (Größe: 0,4mm²) (%) (A,B) und funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) (C,D) im Randbereich (A,C) und im Zentrum (B,D) von nicht besiedelten Kontroll-Scaffolds (weiße Kreise; n=7), adMSC-Einzelzell-besiedelten Scaffolds (graue Kreise; n=7) und adMSC-Sphäroid-besiedelten Scaffolds (schwarze Kreise; n=7) nach Implantation in die Rückenmarkskammer. Die implantierten Scaffolds wurden mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie sowie computerassistierter Bildanalyse über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen analysiert. Mittelwerte \pm SEM. ^aP<0,05 vs. Tag 0 innerhalb jeder einzelnen Gruppe; ^bP<0,05 vs. Tag 0 und 3 innerhalb jeder einzelnen Gruppe; ^cP<0,05 vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb jeder einzelnen Gruppe; ^dP<0,05 vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb jeder einzelnen Gruppe; ^{*}P<0,05 vs. unbesiedelte Kontroll-Scaffolds; [#]P<0,05 vs. Einzelzell-adMSC-besiedelte Scaffolds.

Transgene C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäuse wurden als Spender-Tiere für die Isolierung von adMSCs benutzt. Die Zellen dieser Tiere emittieren ein GFP-Signal unter Blaulicht-Epi-Illumination. Somit waren die in den oberflächlichen Poren der Scaffolds gelegenen Zellen am Tag der Implantation leicht visualisierbar (Abbildung 12A-D). Während des Beobachtungszeitraums blieb die ursprünglich runde Form der Sphäroide nicht erhalten. So lösten sich einzelne Zellen mit zunehmender Beobachtungsdauer aus dem Zellverband der Sphäroide. Weiterhin wuchsen Gefäße aus den Sphäroiden in die umgebenden Poren der Scaffolds ein (Abbildung 12E und F).

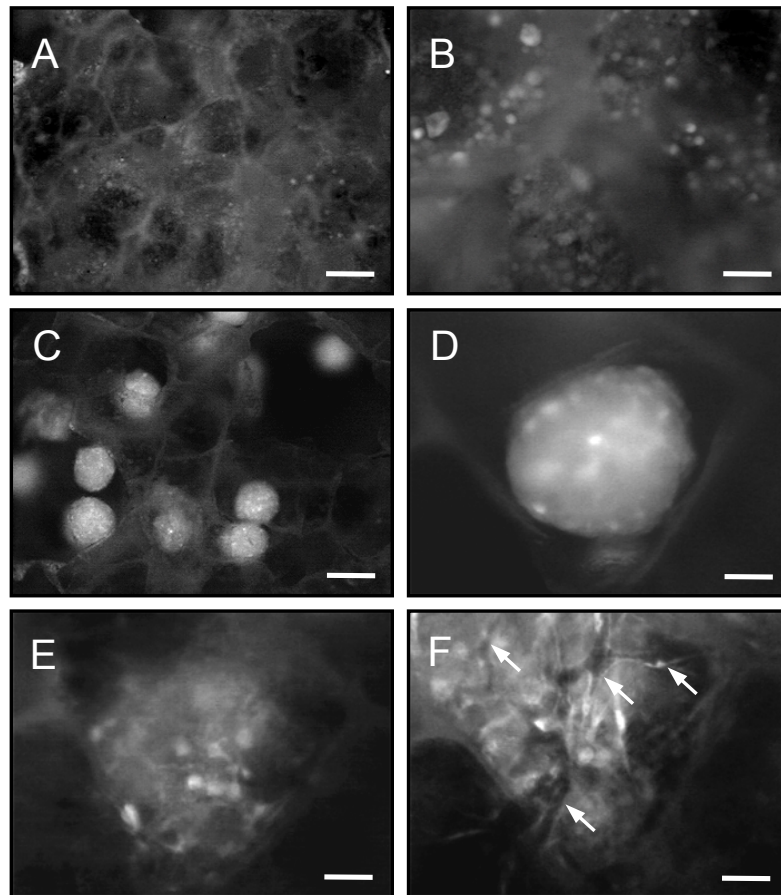


Abbildung 12: Intravital Fluoreszenzmikroskopie von adMSC-Einzelzell-besiedelten (A,B) und adMSC-Sphäroid-besiedelten (C,D) Scaffolds direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer. Sowohl die Einzelzellen als auch die Sphäroide können unter Blaulicht-Epi-Illumination aufgrund ihres GFP-positiven Signals gut dargestellt werden. E,F: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Sphäroids in D an den Tagen 6 (E) und 10 (F). Das Sphäroid verliert seine runde Form und es entwickeln sich aus ihm Gefäße, die in die Scaffold-Poren einwachsen (F, Pfeile). Maßstab: A,C: 270µm; B,D,E,F: 70µm.

6.2.4. Immunhistochemische Analyse

Im Anschluss an die *in vivo* Experimente wurde die Vaskularisierung der Scaffolds mit Hilfe immunhistochemischer Techniken untersucht. Entsprechend den intravitalmikroskopischen Ergebnissen konnte auch hier in der Gruppe der Scaffolds, die mit adMSC-Sphäroiden besiedelt wurden, eine verbesserte Vaskularisierung festgestellt werden. So war im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen sowohl in den zentralen als auch in den am Rand der Scaffolds befindlichen ROIs die Dichte neugebildeter Gefäße signifikant erhöht (Abbildung 13 und 14).

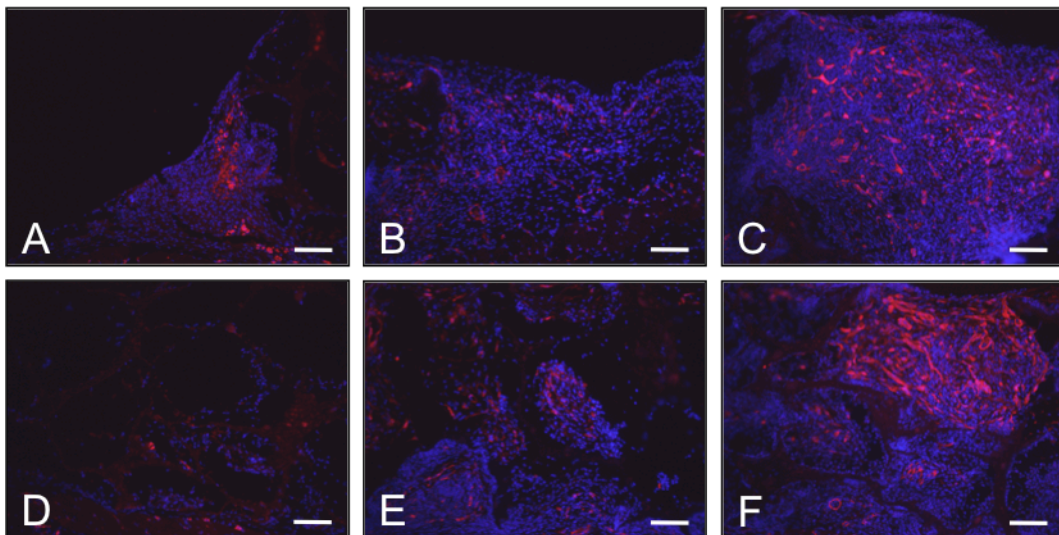


Abbildung 13: A-F: Immunhistochemische Detektion von CD31-positiven Gefäßen (rot) im Randbereich (A-C) und im Zentrum (D-F) eines nicht besiedelten Kontroll-Scaffolds (A,D), eines adMSC-Einzelzell-besiedelten Scaffolds (B,E) und eines adMSC-Sphäroid-besiedelten Scaffolds (C,F) an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die histologischen Schnitte wurden zusätzlich mit Hoechst 33342 gefärbt (blau), um die Zellkerne identifizieren zu können. Maßstab: 100µm.

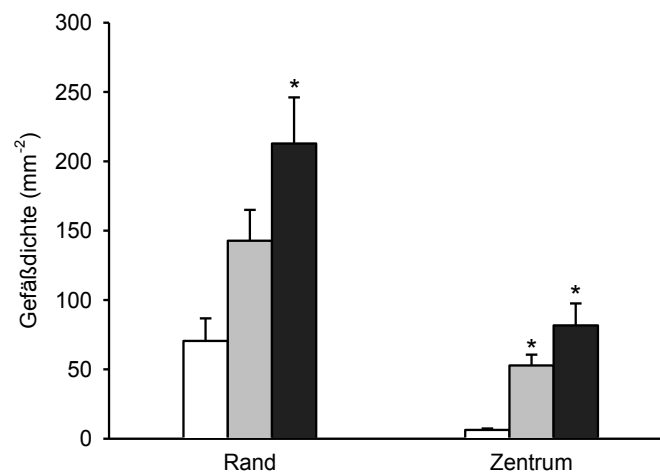


Abbildung 14: Gefäßdichte (mm^{-2}) im Rand und Zentrum von unbesiedelten Kontroll-Scaffolds (weiße Säulen; $n=7$), adMSC-Einzelzell-besiedelten Scaffolds (graue Säulen; $n=7$) und adMSC-Sphäroid-besiedelten Scaffolds (schwarze Säulen; $n=7$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. unbesiedelte Kontroll-Scaffolds.

Da adMSCs die Eigenschaft aufweisen, sich in Gefäßzellen zu differenzieren, wurde in den mit adMSCs besiedelten Scaffolds der Anteil an GFP-positiven Gefäßen analysiert. In beiden Gruppen konnten GFP-positive Gefäße gefunden werden. Sie befanden sich vor allem in zentralen Scaffold-Bereichen. Im Randbereich der Scaffolds waren jedoch auch jeweils ca. 10% aller Gefäße GFP-positiv (Abbildung 16). Das bedeutet, dass sich während des Einwachsens der Scaffolds in das Empfängergewebe sowohl Gefäße außerhalb als auch innerhalb der besiedelten

Implantate aus GFP-positiven adMSCs entwickelten. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass sich die GFP-positiven Gefäße mit GFP-negativen Gefäßen verbanden. Dadurch bildete sich ein gemeinsames Netzwerk aus Gefäßen des Empfängergewebes und aus Gefäßen, welche durch die implantierten adMSCs gebildet wurden (Abbildung 15A-C).

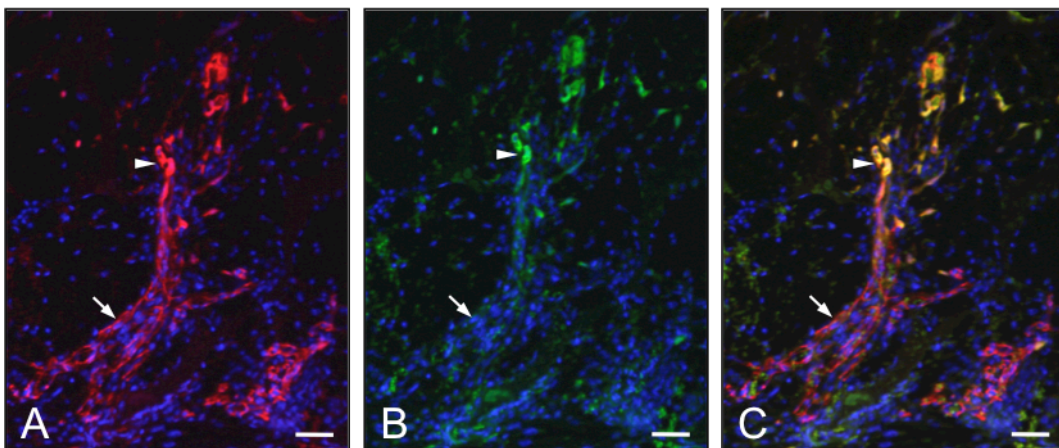


Abbildung 15: A-C: Immunhistochemische Charakterisierung von Gefäßen im Zentrum eines adMSC-Sphäroid-besiedelten Polyurethan-Scaffolds an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die histologischen Schnitte wurden mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (A-C blau), mit einem CD31-Antikörper für die Detektion von Endothelzellen (A,C rot) und einem GFP-Antikörper (B,C grün) gefärbt. C zeigt die überlagerte Darstellung der Bilder A und B. GFP-negative Gefäße (Pfeile) wachsen in die Scaffold-Poren, wo sie Gefäßanschlüsse zu GFP-positiven Gefäßen ausbilden (Pfeilspitzen), die aus den adMSC-Sphäroiden stammen. Maßstab: 50µm

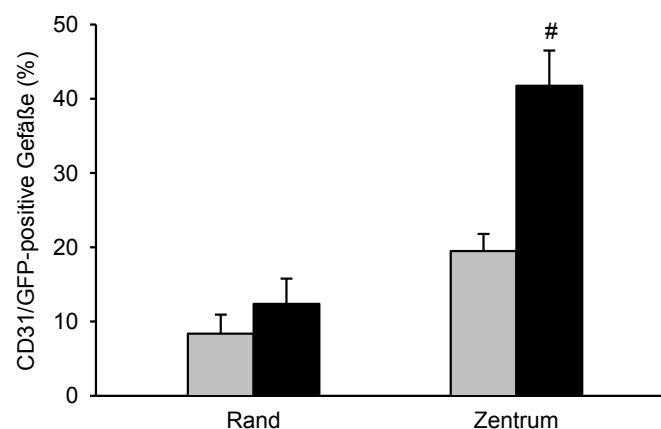


Abbildung 16: CD31/GFP-positiv Gefäße (%) im Randbereich und Zentrum von adMSC-Einzelzell-besiedelten (graue Säulen; n=7) und adMSC-Sphäroid-besiedelten Scaffolds (schwarze Säulen; n=7) an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Mittelwerte \pm SEM. [#]P<0,05 vs. adMSC-Einzelzell-besiedelte Scaffolds.

Als weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass sich ein signifikant höherer Anteil an GFP-positiven Gefäßen im Zentrum der Sphäroid-besiedelten Scaffolds ausbildeten. So betrug der Anteil GFP-positiver Gefäße in der Sphäroid-besiedelten Gruppe im Zentrum 40% im Vergleich zu ca. 20% bei den Einzelzell-besiedelten Scaffolds (*Abbildung 16*). Dieses Ergebnis zeigt, dass die in dreidimensionaler Form auf dem Scaffold vorliegenden adMSC-Sphäroide ein verbessertes Differenzierungspotential als die Einzelzellen aufweisen.

6.3. Vaskularisierung der Scaffolds in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades der adMSC-Sphäroide

6.3.1. Herstellung undifferenzierter und differenzierter adMSC-Sphäroide

Für die Herstellung undifferenzierter Sphäroide wurden isolierte adMSCs für 11 Tage in EC-Medium inkubiert. Anschließend aggregierten sie mit Hilfe der Liquid-Overlay-Technik zu rundlichen, dreidimensionalen Sphäroiden (*Abbildung 17A*). Im Gegensatz dazu wurden differenzierte adMSC-Sphäroide über 25 Tage in osteogenem Medium inkubiert. Im Anschluss aggregierten sie ebenfalls mittels der Liquid-Overlay-Technik zu Sphäroiden. Mit Hilfe der von Kossa-Färbung und mit zusätzlichen μ CT-Analysen konnte die erfolgreiche osteogene Differenzierung der Sphäroide mit Ablagerungen mineralisierter Matrix nachgewiesen werden (*Abbildung 17B und D*). Im Unterschied zu den undifferenzierten adMSC-Sphäroiden konnte bei den differenzierten adMSC-Sphäroiden eine inhomogene Form sowie eine Größenzunahme festgestellt werden. Interessanterweise enthielten beide Sphäroid-Typen CD31-positive Endothelzellen (*Abbildung 17E und F*), die sich allerdings durch ihre Anordnung unterschieden. Bei den undifferenzierten adMSC-Sphäroiden waren sie gleichmäßig verteilt (*Abbildung 17E*). Bei den osteogen differenzierten adMSC-Sphäroiden fanden sie sich hingegen vor allem in den Randbereichen (*Abbildung 17F*).

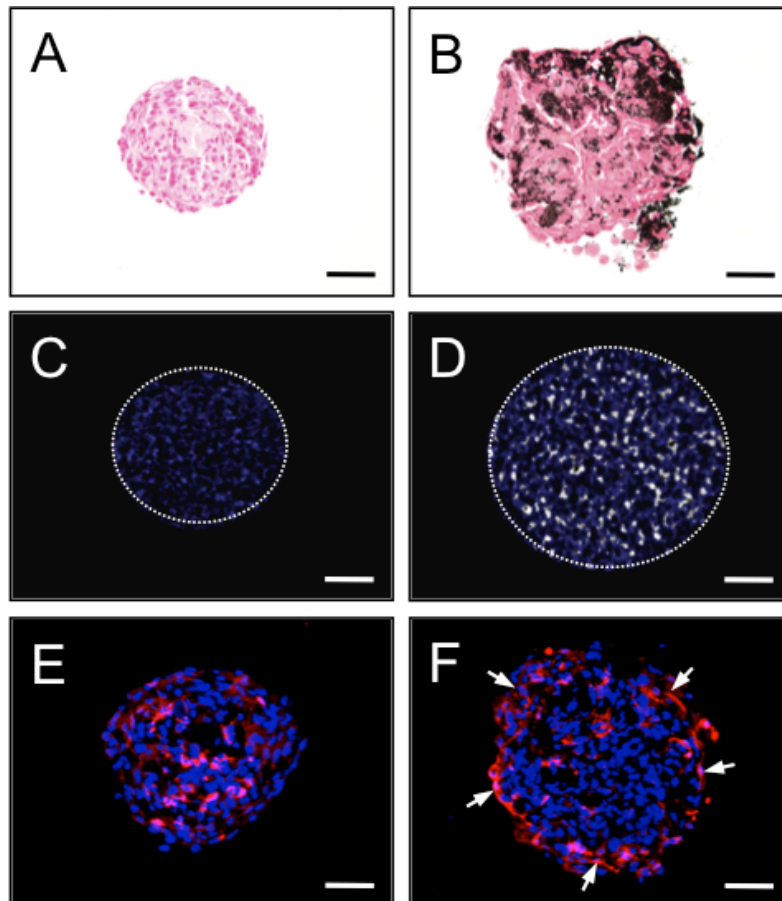


Abbildung 17: A,B: Mikroskopische Aufnahmen von einem mit von Kossa gefärbten undifferenzierten (A) und osteogen differenzierten adMSC-Sphäroid (B). Das differenzierte adMSC-Sphäroid enthält schwarzgefärbte, Phosphateinlagerungen (B). C,D: μ CT-Rekonstruktionen eines undifferenzierten (C) und eines differenzierten adMSC-Sphäroids (D) (die Grenze ist mit einer gepunkteten Linie markiert). Das differenzierte Sphäroid enthält mineralisierte Anteile (D, grau), wohingegen das undifferenzierte Sphäroid nur aus Weichteilgewebe besteht (C, blau). E,F: CD31-Färbung (rot) der Endothelzellen, die in beiden Sphäroid-Typen nachweisbar sind. Der Großteil der CD31-positiven Zellen im osteogen differenzierten adMSC-Sphäroid findet sich in den äußeren Zellschichten (F, Pfeile). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) angefärbt. Maßstab: 75 μ m.

6.3.2. Besiedlung von Polyurethan-Scaffolds

Die Besiedlung von Polyurethan-Scaffolds mit undifferenzierten adMSC-Sphäroiden erfolgte genauso wie die Besiedlung mit differenzierten adMSC-Sphäroiden mit Hilfe des bereits beschriebenen dynamischen Besiedlungsverfahrens (siehe 6.2.2.). Die Besiedlung wurde durch Unterschiede der Sphäroide beider Gruppen bezüglich Form und Größe nicht beeinflusst. Histologische Untersuchungen der besiedelten Scaffolds beider Gruppen zeigten, dass sowohl undifferenzierte als auch differenzierte Sphäroide zufällig verteilt in den zentralen Poren sowie auf der Oberfläche der Scaffolds zu finden waren.

6.3.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Nachdem die besiedelten Scaffolds in die Rückenhautkammer der Empfängertiere implantiert wurden, konnten die Sphäroide aufgrund ihres GFP-Signals mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie auf der Oberfläche der Implantate detektiert werden (*Abbildung 18A-D*). Wie bereits bei den histologischen Untersuchungen konnte auch mit Hilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass die undifferenzierten Sphäroide eine runde, homogene Form sowie einen einheitlichen Durchmesser von $\sim 270\mu\text{m}$ aufwiesen (*Abbildung 18A und B; Abbildung 19*). Im Unterschied dazu waren die differenzierten Sphäroide durch eine irreguläre Form und einen signifikant größeren Durchmesser von $\sim 340\mu\text{m}$ gekennzeichnet (*Abbildung 18C und D; Abbildung 19*).

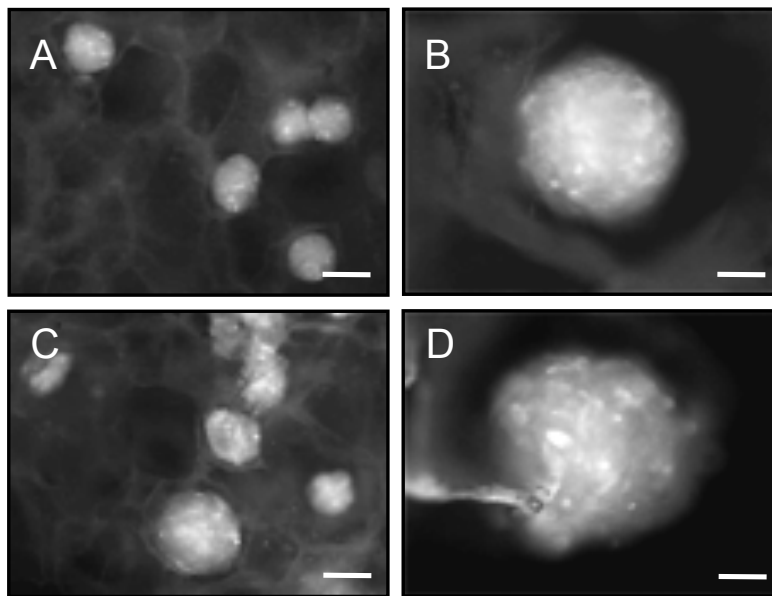


Abbildung 18: *A-D:* Intravitale Fluoreszenzmikroskopie von Scaffolds, die mit undifferenzierten adMSC-Sphäroiden (*A,B*) besiedelt wurden, und Scaffolds, die mit differenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt wurden (*C,D*), direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die Sphäroide können unter Blaulicht-Epi-Illumination aufgrund ihres GFP-positiven Signals gut detektiert werden. Die undifferenzierten Sphäroide haben eine runde Form mit einem einheitlichen Durchmesser von $\sim 270\mu\text{m}$. Die differenzierten Sphäroide haben hingegen ein irreguläre Form sowie einen signifikant größeren Durchmesser von $\sim 340\mu\text{m}$. Maßstab: *A,C:* $230\mu\text{m}$; *B,D:* $85\mu\text{m}$.

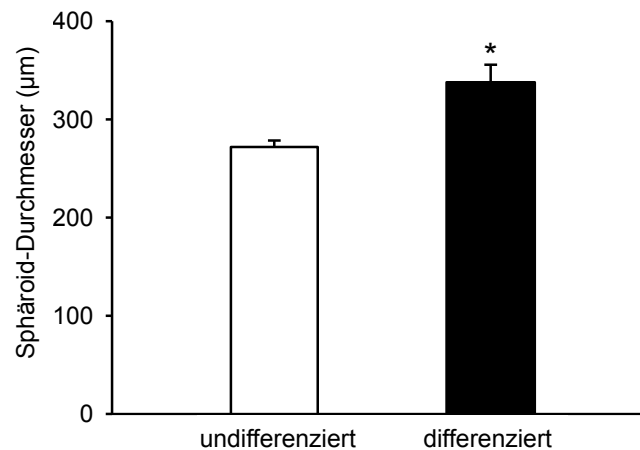


Abbildung 19: Durchmesser (μm) von undifferenzierten (weiße Säule; $n=30$) und differenzierten (schwarze Säule; $n=30$) adMSC-Sphäroiden auf der Oberfläche von Polyurethan-Scaffolds direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die Daten wurden mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie und computerassistierter Bildanalyse ermittelt. Mittelwerte \pm SEM. $P < 0,05$ vs. undifferenzierte adMSC-Sphäroide.

Die intravitalmikroskopischen Analysen beider Gruppen zeigten, dass es zu einer starken Vaskularisierung in den Randbereichen der Implantate kam. Das Ausmaß der Gefäßneubildung war bei beiden Sphäroid-Gruppen identisch. Dies zeigte sich in einer vergleichbaren Anzahl an perfundierten ROIs und einer vergleichbaren funktionellen Kapillardichte in den Randbereichen der Implantate (*Abbildung 21A und C*). Im Gegensatz dazu wurde zu späteren Beobachtungszeitpunkten im Zentrum der differenzierten Sphäroid-Scaffolds eine signifikant niedrigere Anzahl an perfundierten ROIs und eine ebenfalls geringere funktionelle Kapillardichte gemessen (*Abbildung 20A und B; Abbildung 21B und D*). Dies zeigt, dass die Vaskularisierung im Inneren der Scaffolds wesentlich vom Differenzierungsgrad der Sphäroide beeinflusst wurde.

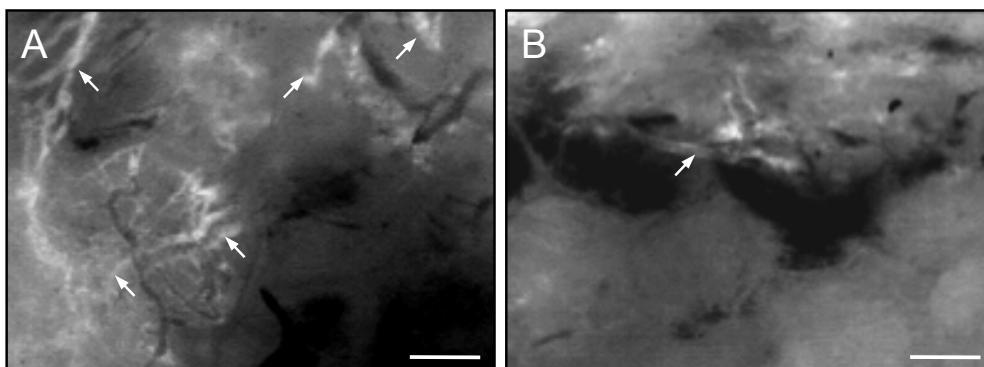


Abbildung 20: A,B: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie aus dem Zentrum implantierter Scaffolds; Kontrastverstärkung mit 5% FITC-Dextran 150.000 in Blaulicht-Epi-Illumination an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Aufnahmen eines Scaffolds, das mit undifferenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt wurde (**A**), und eines Scaffolds, das mit differenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt wurde (**B**). Das mit undifferenzierten Sphäroiden besiedelte Scaffold (**A**) zeigt eine deutlich verbesserte Vaskularisierung auf seiner Oberfläche mit vielen perfundierten Gefäßen (Pfeile) im Vergleich zum Scaffold, das mit differenzierten Sphäroiden besiedelt wurde (**B**). Maßstab: $200\mu\text{m}$.

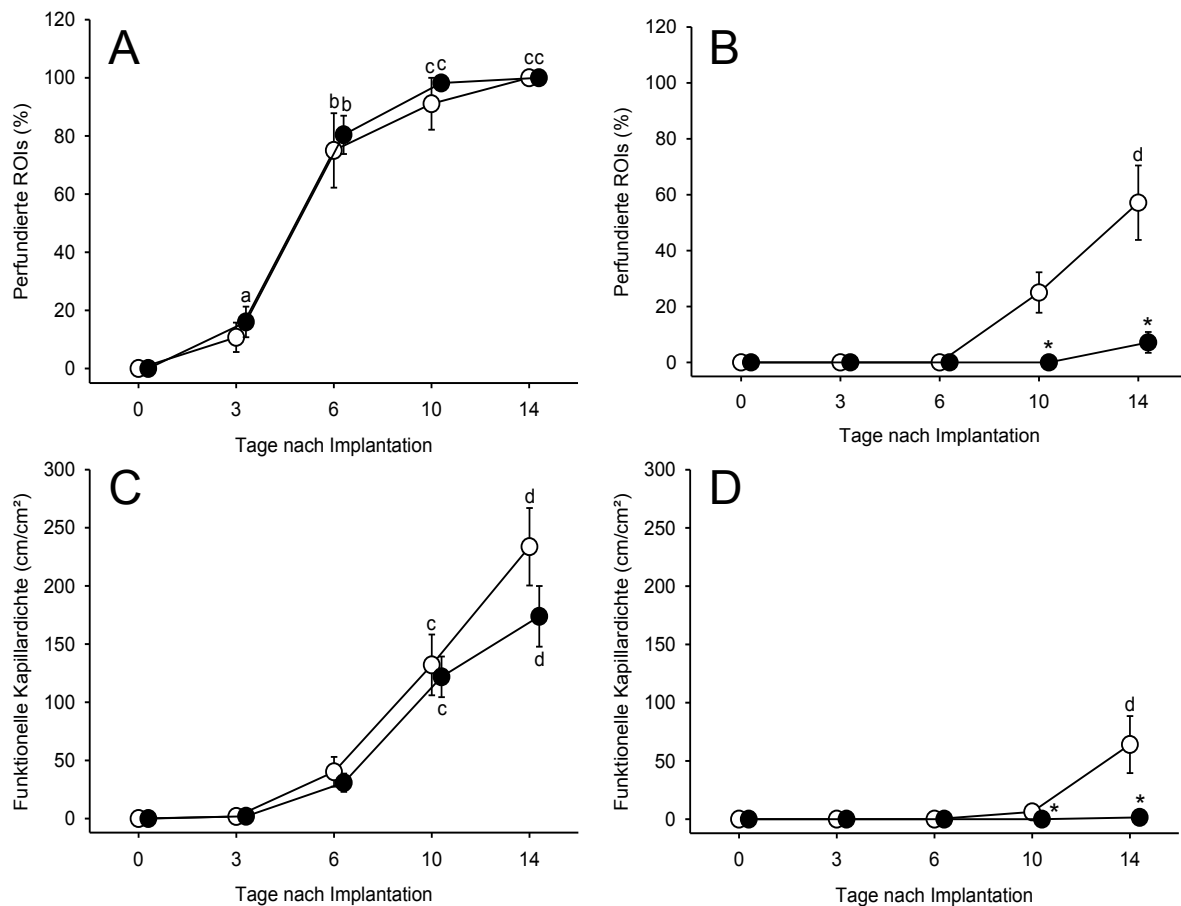


Abbildung 21: A-D: Perfundierte ROIs (%) (A,B) und funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) (C,D) im Randbereich (A,C) und im Zentrum (B,D) von Polyurethan-Scaffolds, die mit undifferenzierten (weiße Kreise; n=7) und differenzierten Sphäroiden (schwarze Kreise; n=7) besiedelt wurden. Die in die Rückenhautkammer implantierten Scaffolds wurden mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie sowie computerassistierter Bildanalyse über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen analysiert. Mittelwerte \pm SEM. ^aP<0,05 vs. Tag 0 innerhalb jeder einzelnen Gruppe; ^bP<0,05 vs. Tag 0 und 3 innerhalb jeder einzelnen Gruppe; ^cP<0,05 vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb jeder einzelnen Gruppe; ^dP<0,05 vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb jeder einzelnen Gruppe; *P<0,05 vs. Scaffolds, die mit undifferenzierten Sphäroiden besiedelt wurden.

6.3.4. Histologische, immunhistochemische und μ CT Analyse implantierter Scaffolds

Nach dem 14-tägigen Beobachtungszeitraum wurden die Scaffolds aus der Rückenhautkammer exzidiert. Anhand histologischer Analysen konnte nachgewiesen werden, dass vaskularisiertes Granulationsgewebe in die Randbereiche der Scaffolds eingewachsen war. Dieses Granulationsgewebe wies in beiden Gruppen eine vergleichbare Morphologie sowie vergleichbare Zelldichten auf (Abbildungen 22A und B). In den zentralen Scaffold-Poren konnte ebenfalls Granulationsgewebe nachgewiesen werden. Allerdings war dessen Dichte in der Gruppe der mit

differenzierten Sphäroiden besiedelten Scaffolds deutlich reduziert. Dies zeigt, dass diese Implantate schlechter in das Empfängergewebe inkorporiert wurden (*Abbildung 22A und B*).

Die Polyurethan-Scaffolds enthielten Hydroxylapatit-Partikel, die mittels von Kossa-Färbung im histologischen Präparat deutlich sichtbar wurden (*Abbildung 22C und D*). Wie Knochenmatrix färbten sie sich schwarz. Somit konnten sie als Positivkontrolle für mögliche Phosphatablagerungen dienen. Als Bestätigung der von Kossa-Färbung wurde mit Hilfe hochauflösender μ CT-Untersuchungen ebenfalls das Vorhandensein von Hydroxylapatit-Partikeln nachgewiesen. Die Scaffold-Poren waren jedoch jeweils frei von mineralisierten Matrixablagerungen und enthielten lediglich Weichteilgewebe (*Abbildung 23A und B*).

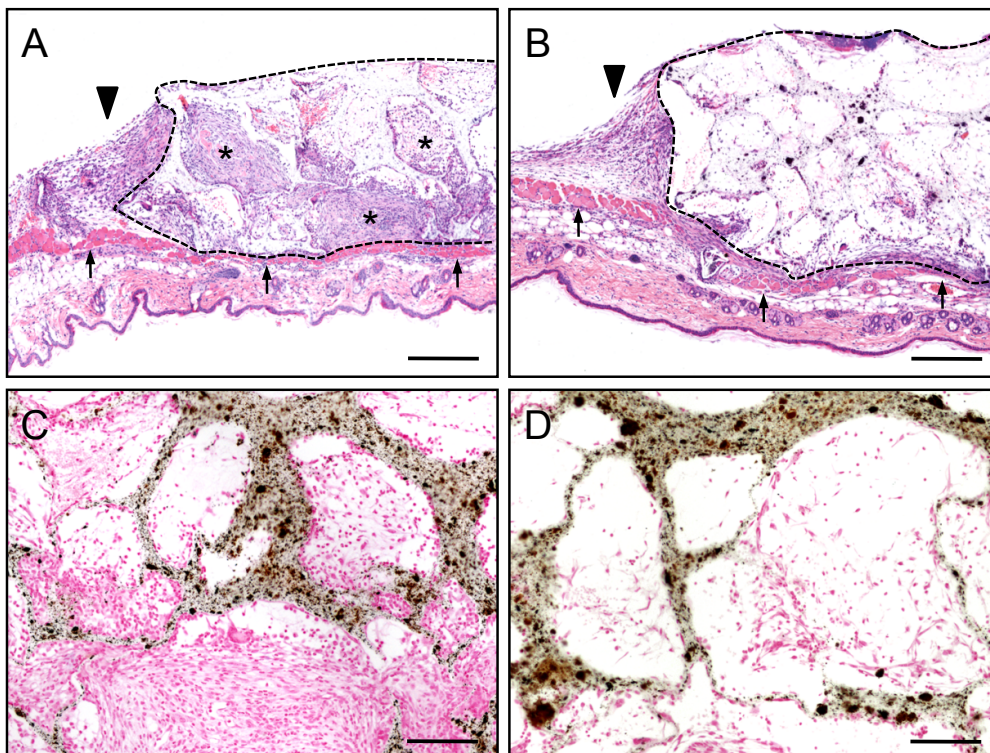


Abbildung 22: HE-gefärbte (A,B) und von Kossa gefärbte (C,D) histologische Schnitte von Scaffolds, die mit undifferenzierten (A,C) und differenzierten Sphäroiden (B,D) besiedelt wurden. Scaffolds an Tag 14 nach Implantation auf die quergestreifte Muskulatur (A,B, Pfeile) der Rückenhautkammer. Das neu entstandene Granulationsgewebe im Randbereich der Implantate (A,B, Pfeilspitzen) zeigt eine vergleichbare Zelldichte in beiden Gruppen. Im Gegensatz dazu sind die Poren der Scaffolds, die mit undifferenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt wurden (A), im Vergleich zu Scaffolds, die mit differenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt wurden (B), mit mehr Gewebe gefüllt (Sterne). In beiden Gruppen sind die von Kossa gefärbten Hydroxylapatit-Partikel der Polyurethan-Scaffolds gut zu erkennen (C,D). Das Gewebe innerhalb der Scaffold-Poren enthält dagegen keine schwarz gefärbten Phosphatablagerungen. Maßstab: A,B: 270 μ m; C,D: 120 μ m.

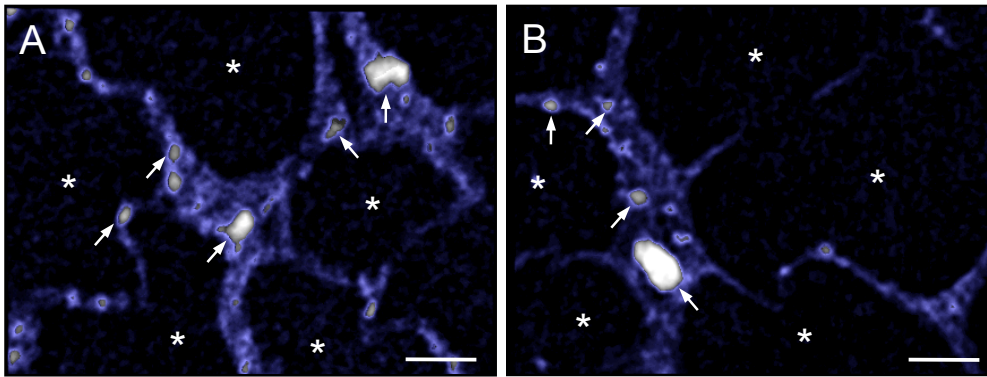


Abbildung 23: A,B: μ CT-Rekonstruktion eines Polyurethan-Scaffolds, das mit undifferenzierten adMSC-Sphäroiden (A) und mit differenzierten adMSC-Sphäroiden (B) besiedelt wurde, an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die Hydroxylapatit-Partikel (grau, Pfeile) der Polyurethan-Scaffolds (blau) sind deutlich sichtbar, wohingegen die Scaffold-Poren (Sterne) komplett frei von mineralisierter Matrix sind. Maßstab: A, B = 80 μ m.

Scaffolds, die mit differenzierten Sphäroiden besiedelt waren, zeigten im Zentrum im Vergleich zu Scaffolds, die mit undifferenzierten Sphäroiden besiedelt waren, eine verminderte Vaskularisierung. Dies konnte durch eine signifikant reduzierte Gefäßdichte innerhalb der zentralen Anteile der Scaffolds mittels immunhistochemischer Analysen belegt werden (Abbildung 24A; Abbildung 25A, D, G und J).

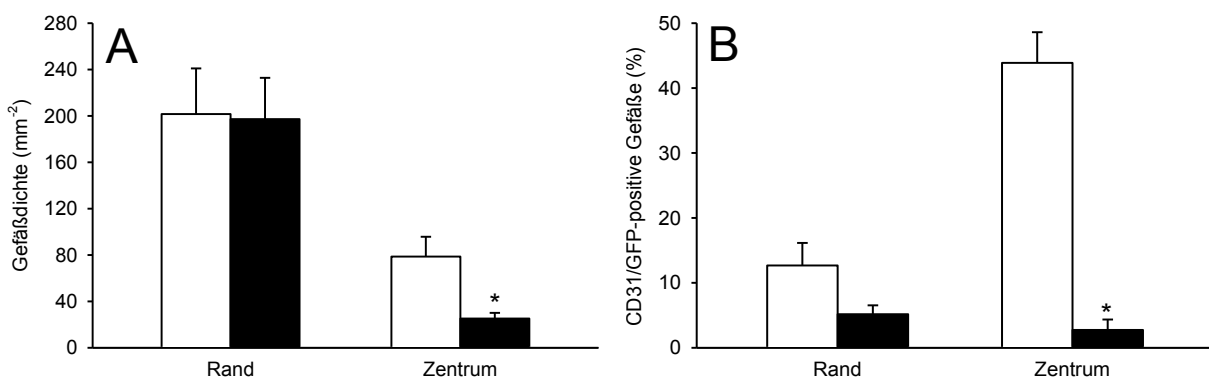


Abbildung 24: A,B: Gefäßdichte (A, mm^{-2}) und CD31/GFP-positive Gefäße (B, %) innerhalb des Randbereiches und des Zentrums von Polyurethan-Scaffolds, die mit undifferenzierten adMSC-Sphäroiden (weiße Säulen; $n=7$) und mit differenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt wurden (schwarze Säulen; $n=7$), an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. * $P<0.05$ vs. mit undifferenzierten Sphäroiden besiedelte Scaffolds.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass sich GFP-positive Gefäße sowohl im Randbereich als auch im Zentrum der Scaffolds beider Gruppen ausbildeten. Dies bedeutet, dass sich adMSCs sowohl innerhalb der Scaffolds als auch innerhalb der

Randbereiche in Gefäße differenzieren konnten. Die adMSCs beteiligten sich somit direkt an der Vaskularisierung (*Abbildung 24B; Abbildung 25A-L*). In der Gruppe der differenzierten Sphäroide waren allerdings nur 3% aller Gefäße im Zentrum GFP-positiv. In den Scaffolds, die mit undifferenzierten Sphäroiden besiedelt wurden, waren hingegen 44% aller Gefäße in zentralen Bereichen GFP-positiv (*Abbildung 24B*).

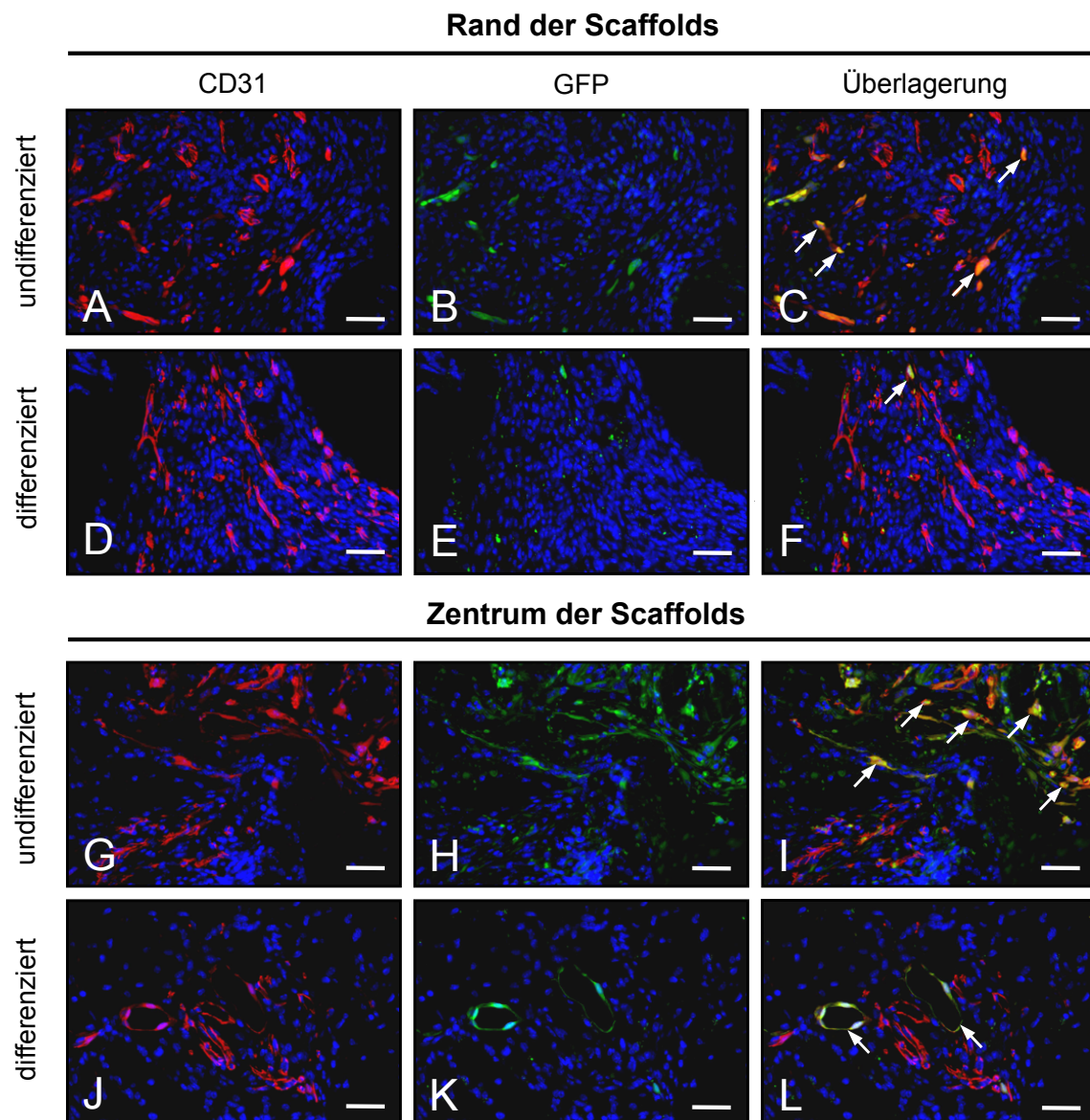


Abbildung 25: A-L: Immunohistochemische Charakterisierung von Gefäßen innerhalb des Randbereichs (A-F) und des Zentrums (G-L) von Polyurethan-Scaffolds, die mit undifferenzierten (A-C, G-I) und differenzierten (D-F, J-L) adMSC-Sphäroiden besiedelt wurden, an Tag 14 nach der Implantation in die Rückenmarkskammer. Die histologischen Schnitte wurden mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (A-L, blau), mit einem CD31-Antikörper für die Markierung von Endothelzellen (A,D,G,J, rot) und einem GFP-Antikörper (B,E,H,K, grün) gefärbt. C,F,I und L zeigen die überlagerte Darstellung der Bilder von (A,B), (D,E), (G,H) und (J,K). Das Polyurethan-Scaffold, das mit undifferenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt wurde (C,I), enthält im Vergleich zu dem Scaffold, das mit differenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt wurde (F,L, Pfeile), eine im Randbereich und im Zentrum deutlich größere Anzahl an Gefäßen (Pfeile), die doppelt positiv für CD31 und GFP sind. Maßstab: 25µm.

Dieses Ergebnis zeigt, dass undifferenzierte adMSC-Sphäroide ein deutlich höheres *in vivo* Vaskularisierungspotential innerhalb poröser Polyurethan-Scaffolds besitzen als differenzierte adMSC-Sphäroide.

6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden experimentellen Arbeit konnten mit Hilfe des Modells der Rückenhautkammer und der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie adMSC-besiedelte Scaffolds über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen untersucht werden. Im Anschluss wurden histologische, immunhistochemische und μ CT-Analysen durchgeführt. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Scaffolds, die mit undifferenzierten adMSCs besiedelt werden, weisen sowohl im Randbereich als auch im Zentrum eine verbesserte Vaskularisierung im Vergleich zu unbesiedelten Scaffolds auf.
2. Scaffolds, die mit undifferenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt werden, weisen im Vergleich zu Scaffolds, die mit adMSC-Einzelzellen besiedelt werden, eine verbesserte Vaskularisierung des Zentrums auf. Die Anzahl perfundierter ROIs sowie die funktionelle Kapillardichte im Randbereich beider Gruppen unterscheidet sich jedoch nicht. Weiterhin zeigt ein deutlich höherer Anteil GFP-positiver Gefäße im Zentrum der Sphäroid-Scaffolds, dass die adMSC-Sphäroide ein größeres Potential aufweisen, sich in Gefäße zu differenzieren und somit zur zentralen Vaskularisierung der Scaffolds beitragen.
3. Scaffolds, die mit osteogen differenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt werden, unterscheiden sich in ihrer Vaskularisierung im Randbereich nicht von Scaffolds, die mit undifferenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt werden. Im Zentrum hingegen findet bei Scaffolds, die mit osteogen differenzierten adMSC-Sphäroiden besiedelt sind, weniger Gefäßneubildung statt. Es bilden sich im Vergleich zu undifferenzierten Sphäroiden sowohl weniger CD31-positive Zellen als auch weniger GFP-positive Gefäße aus.

4. Die zu Beginn der Versuche *in vitro* beobachtete Eigenschaft der osteogen differenzierten adMSC-Sphäroide, Knochenmatrix zu produzieren, geht im Verlauf der *in vivo* Versuche verloren, sodass nach 14 Tagen kein Knochengewebe mehr innerhalb der implantierten Scaffolds nachgewiesen werden kann.

7. Diskussion

7.1. Diskussion von Material und Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vaskularisierung von besiedelten Polyurethan-Scaffolds mit Hilfe des Rückenhautkammermodells untersucht. Die ersten Kammermodelle wurden in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelt. So etablierte SANDISON im Jahr 1928 ein Kammermodell, mit dem Wunden am Ohr von Kaninchen analysiert werden konnten. Im Laufe der Jahre wurde dieses Modell kontinuierlich weiter entwickelt und an verschiedene Spezies angepasst. Entsprechend kann heute das Modell der Rückenhautkammer an Ratten [HOBBS et al., 1976], Hamstern [ENDRICH et al., 1980] und Mäusen [LEHR et al., 1993] angewendet werden.

Das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer bietet die Möglichkeit einer nicht-invasiven und repetitiven Analyse der Mikrozirkulation, ohne das Versuchstier dabei stark zu beeinträchtigen. Somit wurde dieses Modell in der Vergangenheit bereits vielfach dazu verwendet, um die dynamische Entwicklung neuer Gefäßnetzwerke sowie entzündliche Prozesse hochauflösend *in vivo* zu visualisieren [DRUECKE et al., 2004; RÜCKER et al., 2006; LASCHKE et al., 2011; LASCHKE et al., 2012].

Die Rahmen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Rückenhautkammer sind aus Titan. Insofern sind sie schwache Wärmeleiter, haben ein geringes Gewicht und sind biologisch inert [ENDRICH et al., 1980], was von Vorteil für die Tierexperimente ist. Im Vergleich zu Teflon beschichteten Aluminiumrahmen bieten sie außerdem eine höhere Stabilität [MENGER et al., 2002]. Zusammen mit dem Deckglas schützen sie das freigelegte Gewebe im Beobachtungsfenster vor mechanischer Reizung sowie vor dem Austrocknen. Das Deckglas des Beobachtungsfensters kann leicht wieder entfernt werden. Somit besteht zu jeder Zeit ein direkter Zugang zum Gewebe. Entsprechend eignet sich die Rückenhautkammer besonders für die Implantation von Biomaterialien bzw. die Transplantation von Geweben.

Die Präparation der Kammer erfolgt in der Regel 48 Stunden vor Beginn der eigentlichen Analysephase. Auf diese Weise kann sich das präparierte Gewebe vom chirurgischen Trauma erholen und die erfassten Parameter liegen wieder im physiologischen Bereich.

Ein Nachteil des Modells der Rückenhautkammer ist das relativ kleine Beobachtungsfenster, was lediglich einen Durchmesser von 11mm aufweist. Entsprechend müssen die Implantate dieser Größe angepasst werden. Bei der vorliegenden Arbeit wurden daher Scaffolds mit einer Größe von 3 x 3mm und einer Dicke von 1mm verwendet. Weiterhin kann die Rückenhautkammer lediglich über einen Zeitraum von 2-3 Wochen auf den Versuchstieren verbleiben, da die abnehmende Spannung der Rückenhautfalte während des Versuchszeitraums zu einem Abkippen der Kammer und infolgedessen zu einer reduzierten Kammerperfusion führen kann. Entsprechend wird mit der Rückenhautkammer vor allem die frühe Reaktion des Empfängergewebes auf Trans- bzw. Implantate untersucht. Mehrere Studien konnten jedoch zeigen, dass vor allem diese anfängliche Phase von wesentlicher Bedeutung für die Inkorporation von Biomaterialien in das Empfängergewebe ist [SCLAFANI et al., 1997; NAIK et al., 2007]. Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden an Mäusen durchgeführt, obwohl die Implantation der Rückenhautkammer bei dieser Spezies im Vergleich zu Hamstern einige Nachteile aufweist. So sind bei Mäusen die einzelnen Gewebeschichten stärker miteinander verwachsen, was die Präparation des quergestreiften Hautmuskels erschwert. Im Vergleich zu Hamstern und Ratten sind Mäuse jedoch bereits genetisch sehr gut charakterisiert. Daher stehen zahlreiche Antikörper für immunhistochemische Färbungen zur Verfügung [MENGER et al., 1993]. Des Weiteren können unter Verwendung von Knock-out-Mäusen oder transgenen Linien komplexe molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden transgene GFP-positive C57BL/6-Mäuse verwendet, um daraus adMSCs zu isolieren. Auf diese Weise konnte unter Verwendung immunhistochemischer Techniken analysiert werden, ob die neu gebildeten Gefäße im Randbereich und im Zentrum der implantierten Scaffolds von den Stammzellen oder dem Empfängergewebe stammten.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. Vaskularisierung der Scaffolds in Abhängigkeit ihrer Besiedlung mit Einzelzellen oder adMSC-Sphäroiden

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Scaffolds, die mit dreidimensionalen adMSC-Sphäroiden besiedelt werden, im Vergleich zu Einzelzell-besiedelten Scaffolds eine verbesserte Vaskularisierung aufweisen.

Für das Überleben von Zellen in implantierten Scaffolds ist es absolut notwendig, dass sich möglichst schnell ein Gefäßnetzwerk ausbildet, welches die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellt. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in früheren Studien bereits unterschiedliche Zelltypen auf Scaffolds gesiedelt, welche die Ausbildung neuer Blutgefäße fördern können [LASCHKE et al., 2006]. Verschiedene Arbeitsgruppen verwendeten hierfür Endothelzellen [LEVENBERG et al., 2005; TREMBLAY et al., 2005; SANTOS et al., 2009]. Diese lassen sich jedoch nur in geringen Mengen aus dem Körper isolieren und ihre Expansionskapazität ist eingeschränkt. Daher sind sie für die Nutzung in der klinischen Praxis ungeeignet [JANECZEK PORTALSKA et al., 2012]. Im Gegensatz hierzu können multipotente MSCs in großer Zahl aus Fettgewebe isoliert werden. Weiterhin weisen diese ein hohes Vaskularisierungspotential auf [BRAMFELDT et al., 2010; NOVOSEL et al., 2011; LASCHKE et al., 2012]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass dieses Vaskularisierungspotential durch die dreidimensionale Anordnung der MSCs in Form von Sphäroiden noch weiter gesteigert werden kann.

Dreidimensionale Zell-Sphäroide wurden bereits in onkologischen und pharmakologischen Studien untersucht [KORFF et al., 2001; ALAJATI et al., 2008, ELLIOTT und YUAN, 2011; ACHILLI et al., 2012]. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass sich die dreidimensionale Anordnung der Zellen innerhalb der Sphäroide wesentlich auf ihre biologischen Eigenschaften auswirkt. Im Vergleich zu herkömmlichen zweidimensionalen Zellkulturen bieten Sphäroide mit ihren vermehrten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten ein physiologischeres Umfeld. Aus diesem Grund werden Sphäroide in neueren Studien auch als biologische Einheiten in Gewebekonstrukten verwendet [KAPUR et al., 2012; ANADA et al., 2012]. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Inneren der Sphäroide ein Sauerstoffmangel herrscht [HORAS et al., 2005]. Diese Sauerstoffminderversorgung sorgt für eine

natürliche Präkonditionierung der Zellen. Nach Transfer in einen Gewebedefekt weisen sie daher eine erhöhte Resistenz gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod auf [BHANG et al., 2012].

In der vorliegenden Arbeit wurde Fettgewebe als Quelle zur Isolierung von MSCs genutzt. Mittels Durchflusszytometrie konnten auf den isolierten Zellen charakteristische MSC-Oberflächenmoleküle (CD13, CD73, CD90.2 und CD117) nachgewiesen werden [MITCHELL et al., 2006; ZIMMERLIN et al., 2010]. Es wurden zusätzlich auch Sca-1/VEGFR-2-positive endotheliale Progenitorzellen gefunden. Es kann daher spekuliert werden, dass diese Zellen ebenfalls zur verstärkten Vaskularisierung der adMSC-besiedelten-Scaffolds beitragen.

In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Herstellung von Sphäroiden beschrieben. Hierzu zählen Methoden wie die Technik des hängenden Tropfens [TUNG et al., 2011], die Karboxyl-Zellulose-Technik [ALAJATI et al., 2008] und die Liquid-Overlay-Technik [METZGER et al., 2011]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Liquid-Overlay-Technik angewendet, da sie eine hohe Reproduzierbarkeit und eine gute Ausbeute gewährleistet [METZGER et al., 2011]. So wiesen die mit Hilfe dieser Methode hergestellten undifferenzierten Sphäroide eine einheitliche Größe von ~270µm auf. Entsprechend konnten sie sehr gut zur dynamischen Besiedlung der Polyurethan-Scaffolds verwendet werden, deren Poren ~200-600µm groß waren. Darüberhinaus konnte BHANG et al. [2012] zeigen, dass MSCs, die sich im Inneren von Sphäroiden mit einem Durchmesser von ~200-400µm befinden, vermehrt den anti-apoptotischen Faktor Bcl-2 exprimieren. Weiterhin produzieren sie vermehrt die Hypoxie-induzierten Faktoren CXCL12 und HIF-1α sowie die angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, hepatocyte growth factor (HGF) und FGF-2 [BHANG et al., 2011, 2012]. Dies könnte zum Überleben und zur hohen angiogenen Aktivität der Sphäroide beigetragen haben.

Die Analyse der Vaskularisierung der implantierten Scaffolds erfolgte sowohl mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie als auch mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen. Mit der CD31-Färbung wurden alle, sowohl perfundierte als auch nicht perfundierte Gefäße, innerhalb eines histologischen Schnittes angefärbt. Im Gegensatz dazu bot die intravitale Fluoreszenzmikroskopie den Vorteil, dass sie nur die perfundierten Gefäße sichtbar machte. Lediglich diese Gefäße trugen zur Sauerstoffversorgung der Zellen in den Scaffolds bei. Mittels der intravitale Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Scaffolds, die mit adMSC-

Sphäroiden beladen wurden, im Vergleich zu Einzelzell-besiedelten Scaffolds ein stärker ausgebildetes Gefäßnetzwerk aufwiesen. Dieses Ergebnis könnte durch eine erhöhte Produktion angiogener Wachstumsfaktoren erklärt werden [BHANG et al., 2011; 2012]. Ein weiterer Grund für die verbesserte Vaskularisierung der Sphäroid-Scaffolds könnte die Differenzierung der Zellen der Sphäroide in neue Blutgefäße über den Prozess der Vaskulogenese sein.

Sämtliche in diesem Versuch benutzten adMSCs entstammten von transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J Spendertieren. Die besiedelten Scaffolds wurden dagegen in die Rückenhautkammern von C57BL/6-Wildtyp-Tieren implantiert. Dieses experimentelle Vorgehen erlaubte es, im Anschluss an die *in vivo* Analysen die Herkunft der neugebildeten Gefäße in den Implantaten mittels GFP-Immunhistochemie zu untersuchen. Dabei waren Gefäße, die aus dem Empfängertier stammten, lediglich positiv für den Endothelzellmarker CD31. Gefäße, die sich aus adMSCs entwickelten, waren hingegen doppelt positiv für GFP und CD31. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass sich ~40% aller Gefäße im Zentrum der mit Sphäroiden besiedelten Scaffolds aus adMSCs entwickelten. Diese GFP-positiven Gefäße bildeten Verbindungen zu GFP-negativen Gefäßen aus, die aus dem Empfängergewebe stammten. Dadurch trugen sie mittels Inoskulation zur raschen Perfusion der Gewebekonstrukte bei [LASCHKE et al., 2009].

Im Unterschied dazu wiesen Scaffolds, die mit adMSC-Einzelzellen besiedelt wurden, nur ~20% GFP-positive Gefäße im Zentrum auf. In einer Arbeit von SCHUMANN et al. [2009], in der aus Knochenmark stammende Einzelzell-MSCs zur Vaskularisierung von Scaffolds benutzt wurden, konnten vergleichbare Beobachtungen gemacht werden. So konnte gezeigt werden, dass die Vaskularisierung der mit Einzelzell-MSCs besiedelten Scaffolds primär durch VEGF stimuliert wurde. Eine vermehrte Differenzierung der MSCs in Blutgefäße konnte dagegen nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte in diesem Studienabschnitt gezeigt werden, dass adMSC-Sphäroide die Vaskularisierung von Scaffolds deutlich verbessern. Sie können daher als potente Vaskularisationseinheiten in Gewebekonstrukten eingesetzt werden. Darüberhinaus sind sie in der Lage, große Mengen angiogener Wachstumsfaktoren zu produzieren und somit an verschiedenen Stellen innerhalb der Implantate die Ausbildung neuer Gefäßnetzwerke über den Prozess der Angiogenese zu stimulieren.

7.2.2. Vaskularisierung der Scaffolds in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades der adMSC-Sphäroide

Zell-Sphäroide, die durch ihre dreidimensionale Anordnung viele Zell-Zell-Kontakte aufweisen, sind vielversprechende Gewebereinheiten für die Generierung von Gewebekonstrukten [WALSER et al., 2013]. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass sich adMSC-Sphäroide in neue Blutgefäße differenzieren können und auf diese Weise die Vaskularisierung von implantierten Scaffolds deutlich verbessern. KROEZE et al. [2011] konnten weiterhin zeigen, dass sich adMSCs unter osteogenen Kulturbedingungen in Zellen differenzieren lassen, welche mineralisierte Knochenmatrix ausbilden. Aufgrund dieser Ergebnisse werden adMSCs als ideale Grundlage für die Herstellung von Sphäroid-basierten Knochenkonstrukten mit einem hohen Vaskularisierungspotential angesehen [HUTTON et al., 2013]. Die Ergebnisse des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass osteogen differenzierte adMSC-Sphäroide ein im Vergleich zu undifferenzierten Sphäroiden reduziertes Vaskularisierungspotenzial aufweisen.

Wie im ersten Studienabschnitt wurden in diesem Teil der Arbeit undifferenzierte und osteogen differenzierte Sphäroide mit Hilfe der Liquid-Overlay-Technik hergestellt. Im Vergleich zu undifferenzierten Sphäroiden zeichneten sich die differenzierten Sphäroide durch eine größere und inhomogenere Form aus. Da die Zellzahl der Sphäroide beider Gruppen auf 5.000 Zellen eingestellt wurde, sind diese Beobachtungen wahrscheinlich auf die Einlagerung von mineralisierter Matrix innerhalb der differenzierten Sphäroide zurückzuführen.

Mittels immunhistochemischer Färbungen konnten in beiden Sphäroid-Typen CD31-positive Endothelzellen nachgewiesen werden. In undifferenzierten Sphäroiden waren diese homogen verteilt. In den osteogen differenzierten Sphäroiden waren sie hingegen hauptsächlich in den äußeren Zellschichten lokalisiert. Diese unterschiedliche Verteilung konnte bereits in anderen Studien in multizellulären Sphäroiden nachgewiesen werden, die aus verschiedenen Kombinationen von Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten und Astrozyten bestanden [NAPOLITANO et al., 2007; URICH et al., 2013]. Dies zeigt, dass Sphäroide nicht nur inaktive Zellaggregate sind. Vielmehr unterliegen sie einem umfangreichen, dynamischen sowie zeitabhängigen Differenzierungsprozess, der stark von ihrer Zellzusammensetzung und dem Differenzierungsstadium der Zellen abhängig ist. So findet man z.B.

Endothelzellen, die einen polarisierten Phänotyp aufweisen, typischerweise in äußeren Zellschichten. Auf diese Weise können sie an ihrer abluminalen Seite Kontakt zu tieferen Zellschichten ausbilden, während sie sich mit ihrer luminalen Seite in Richtung der Sphäroid-Oberfläche ausrichten.

Die hier verwendeten, porösen Polyurethan-Scaffolds enthielten zur Verbesserung ihrer osteokonduktiven Eigenschaften Hydroxylapatit-Nanopartikel. Aufgrund ihrer elastischen Eigenschaften waren sie leicht zu schneiden und in Form zu bringen. Außerdem konnte in früheren Studien bereits gezeigt werden, dass diese Scaffolds *in vivo* eine hervorragende Biokompatibilität aufweisen [LASCHKE et al., 2010]. Da sie miteinander vernetzte Poren mit einem Durchmesser von ~200-600µm enthalten, konnten sowohl die undifferenzierten Sphäroide als auch die größeren osteogen differenzierten Sphäroide ohne Probleme auf die Scaffolds gesiedelt werden.

Nach der Implantation in die Rückenhautkammer von Empfängertieren induzierten die Sphäroid-besiedelten Scaffolds beider Gruppen eine angiogene Gewebereaktion. Diese war durch die Ausbildung von Kapillarsprossen in den Randzonen der Implantate gekennzeichnet. Im Zeitverlauf verbanden sich diese Sprossen miteinander und entwickelten sich schließlich zu Blut-perfundierten Gefäßnetzwerken. Zu Beginn des Versuches waren die Sphäroide in zentralen Bereichen der Scaffolds zunächst avaskulär und somit hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Daher wurde die initiale angiogene Reaktion des Empfängergewebes wahrscheinlich durch die parakrine Stimulation mit Hypoxie-induzierten Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, induziert, welche von den Sphäroiden ausgeschüttet wurden. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an Tag 14 gestützt. Sie zeigen, dass die meisten Blutgefäße im Randbereich der Implantate GFP-negative Gefäße des Empfängergewebes waren.

Zu späteren Versuchszeitpunkten waren auch perfundierte Gefäße im Zentrum der Implantate zu finden. Im Vergleich zu Scaffolds, die mit undifferenzierten Sphäroiden besiedelt wurden, war die funktionelle Gefäßdichte von Scaffolds, die mit differenzierten Sphäroiden besiedelt wurden, jedoch stark vermindert. Diese Beobachtung lässt auf eine unterschiedliche Art der Vaskularisierung im Zentrum der Implantate schließen. Wie im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben, bilden undifferenzierte Sphäroide GFP-positive Gefäßnetzwerke innerhalb der Scaffolds aus, die sich dann durch Inoskulation mit den umgebenden GFP-negativen Gefäßen

verbinden können [LASCHKE et al., 2009; CHENG et al., 2011]. Die differenzierten Sphäroide verloren hingegen offensichtlich diese Fähigkeit, was durch die signifikant reduzierte Anzahl GFP-positiver Gefäße in zentralen Bereichen der Scaffolds zu erkennen war. Somit ging die osteogene Differenzierung der adMSCs mit einem gleichzeitigen Verlust ihres Vaskularisierungspotentials einher. Dies sollte bei der Verwendung von adMSCs als Zellquelle für zukünftige Anwendungen im Bereich des Knochen-Tissue Engineering beachtet werden.

Die Scaffolds, die mit differenzierten Sphäroiden besiedelt waren, wiesen nicht nur eine verschlechterte Vaskularisierung, sondern auch eine reduzierte Inkorporation in das umgebende Empfängergewebe auf. Dies war durch ein vermindertes Einwachsen von Granulationsgewebe in die Poren der Scaffolds gekennzeichnet. Weiterhin waren nach 14 Tagen keine Phosphatablagerungen mehr innerhalb der Scaffolds nachweisbar, die zuvor mit osteogen differenzierten Sphäroiden besiedelt wurden. Von Kossa-positive Signale reichen nicht aus, um mineralisierte Ablagerungen nachzuweisen [BONEWALD et al., 2003]. Deshalb wurden im Anschluss an die von Kossa-Färbungen zusätzlich μ CT-Analysen durchgeführt. Auch diese erbrachten jedoch keinen Nachweis für eine Mineralisation innerhalb der differenzierten Sphäroide. Dies lässt auf eine Dedifferenzierung der adMSCs nach Implantation in die Rückenhautkammer schließen. Dies könnte daraus resultieren, dass das Empfängergewebe in der Rückenhautkammer lediglich aus quergestreiftem Muskelgewebe, Subkutangewebe und Haut besteht. Es weist daher sicherlich deutliche Unterschiede im Vergleich zum Milieu innerhalb eines Knochendefektes auf [SCOTT et al., 2012]. Osteogene Wachstumsfaktoren sowie interagierende Zellen, die bei der normalen Knochenheilung stets vorhanden sind, konnten anscheinend auch durch die osteoinduktive Hydroxylapatit-Oberfläche der Scaffolds nicht simuliert werden. Entsprechend fehlten hier wahrscheinlich wichtige osteogene Stimulationsfaktoren, die zu einer Dedifferenzierung führten. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden, dass die ektopische Knochenbildung durch adMSCs stark von einer kontinuierlichen Stimulation von osteogenen Wachstumsfaktoren wie BMP-2 abhängig ist [BROCHER et al., 2013; SHEN et al., 2013]. In zukünftigen Studien wird es aus diesen Gründen notwendig sein, die Knochenbildung aus Sphäroiden in orthotopen Knochendefektmodellen zu analysieren. In diesen Modellen können über einen längeren Zeitraum günstigere

Umgebungsbedingungen für die osteogene Differenzierung von adMSCs sichergestellt werden.

Zusammenfassend konnte in diesem zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die osteogene *in vitro* Differenzierung von adMSC-Sphäroiden ihre Fähigkeit zur *in vivo* Vaskularisierung innerhalb implantierter Polyurethan-Scaffolds deutlich reduziert. Es könnte daher von Vorteil sein, zur Besiedlung von Scaffolds Sphäroide unterschiedlicher Differenzierungsstadien zu verwenden, um einerseits die Vaskularisierung und andererseits die Knochenneubildung innerhalb der implantierten Gewebekonstrukte zu fördern.

7.3. Schlussfolgerungen

Das aktuell größte Problem beim Tissue Engineering ist es, eine ausreichende Versorgung implantierter Gewebekonstrukte mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten. Aufgrund der Fähigkeit von Stammzellen, sich unter bestimmten Umgebungsbedingungen in Gefäßzellen zu differenzieren, kann durch sie eine schnelle Vaskularisierung von Scaffolds erzielt werden. Sphäroide sind spontan aggregierende dreidimensionale Zellkonstrukte, die durch ihre vielen Zell-Zell-Kontakte physiologische Zellverbände imitieren und als biologische Einheiten in Gewebekonstrukten Verwendung finden.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mit Hilfe von adMSC-Sphäroiden die Ausbildung von Gefäßnetzwerken innerhalb von Scaffolds deutlich verbessert werden kann. Insofern stellen adMSC-Sphäroide vielversprechende Vaskularisierungseinheiten für zukünftige Ansätze im Bereich des Tissue Engineering dar.

In einem zweiten Abschnitt konnte gezeigt werden, dass osteogen differenzierte adMSC-Sphäroide nicht in der Lage sind, die Vaskularisierung von Scaffolds zu verbessern. Gleichzeitig verlieren sie unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ihre Fähigkeit zur Produktion von Knochenmatrix. Somit eignen sie sich nicht zur gleichzeitigen *in vivo* Vaskularisierung und Produktion von Knochenmatrix im Rahmen des Knochen-Tissue Engineering.

8. Literaturverzeichnis

1. **ACHILLI TM, MEYER J, MORGAN JR.** Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther* 12:1347-60, 2012.
2. **ALAJATI A, LAIB AM, WEBER H, BOOS AM, BARTOL A, IKENBERG K, KORFF T, ZENTGRAF H, OBODOZIE C, GRAESER R, CHRISTIAN S, FINKENZELLER G, STARK GB, HÉROULT M, AUGUSTIN HG.** Spheroid-based engineering of a human vasculature in mice. *Nat Methods* 5:439-45, 2008.
3. **ANADA T, FUKUDA J, SAI Y, SUZUKI O.** An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials* 33:8430-41, 2012.
4. **BECKER ST, WARNKE PH, BEHRENS E, WILTFANG J.** Morbidity after iliac crest bone graft harvesting over an anterior versus posterior approach. *J Oral Maxillofac Surg* 69:48-53, 2011.
5. **BHANG SH, CHO SW, LA WG, LEE TJ, YANG HS, SUN AY, BAEK SH, RHIE JW, KIM BS.** Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 32:2734-47, 2011.
6. **BHANG SH, LEE S, SHIN JY, LEE TJ, KIM BS.** Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization. *Tissue Eng Part A* 18:2138-47, 2012.
7. **BONEWALD LF, HARRIS SE, ROSSER J, DALLAS MR, DALLAS SL, CAMACHO NP, BOYAN B, BOSKEY A.** von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int* 72:537-47, 2003.
8. **BRAMFELDT H, SABRA G, CENTIS V, VERMETTE P.** Scaffold vascularization: a challenge for three-dimensional tissue engineering. *Curr Med Chem* 17:3944-67, 2010.
9. **BROCHER J, JANICKI P, VOLTZ P, SEEBACH E, NEUMANN E, MUELLER-LADNER U, RICHTER W.** Inferior ectopic bone formation of mesenchymal stromal cells from adipose tissue compared to bone marrow: rescue by chondrogenic pre-induction. *Stem Cell Res* 11:1393-406, 2013.
10. **BOISSARD CI, BOURBAN PE, TAMI AE, ALINI M, EGLIN D.** Nanohydroxyapatite/poly(ester urethane) scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 5:3316-27, 2009.

11. **BONORA-CENTELLES A, JOVER R, MIRABET V, LAHOZ A, CARBONELL F, CASTELL JV, GÓMEZ-LECHÓN MJ.** Sequential hepatogenic transdifferentiation of adipose tissue-derived stem cells: relevance of different extracellular signaling molecules, transcription factors involved, and expression of new key marker genes. *Cell Transplant* 18:1319-40, 2009.
12. **BORGES J, TEGTMEIER FT, TORIO-PADRON N, MUELLER MC, STARK GB.** [Angiogenesis investigations in tissue engineering. The cylinder model on the chorioallantois membrane]. *Chirurg* 75:284-90, 2004.
13. **BOSEMARK P, ISAKSSON H, McDONALD MM, LITTLE DG, TÄGIL M.** Augmentation of autologous bone graft by a combination of bone morphogenic protein and bisphosphonate increased both callus volume and strength. *Acta Orthop* 84:106-11, 2013.
14. **CHENG G, LIAO S, KIT WONG H, LACORRE DA, DI TOMASO E, AU P, FUKUMURA D, JAIN RK, MUNN LL.** Engineered blood vessel networks connect to host vasculature via wrapping-and-tapping anastomosis. *Blood* 118:4740-9, 2011.
15. **CHENG NC, WANG S, YOUNG TH.** The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials* 33:1748-58, 2012.
16. **COLTON CK.** Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant* 14:415-36, 1995.
17. **CARREON LY, GLASSMAN SD, BROCK DC, DIMAR JR, PUNO RM, CAMPBELL MJ.** Adverse events in patients re-exposed to bone morphogenetic protein for spine surgery. *Spine (Phila Pa 1976)* 33:391-3, 2008.
18. **DEASY BM, LI Y, HUARD J.** Tissue engineering with muscle-derived stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 15:419-23, 2004.
19. **DENNIS JE, CHARBORD P.** Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 20:205-14, 2002.
20. **DIMITRIOU R, MATALIOTAKIS GI, ANGOULES AG, KANAKARIS NK, GIANNOUDIS PV.** Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury* 2:S3-15, 2011.
21. **DRUECKE D, LANGER S, LAMME E, PIEPER J, UGARKOVIC M, STEINAU HU, HOMANN HH.** Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A* 68:10-8, 2004.
22. **ELLIOTT NT, YUAN F.** A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Sci* 100:59-74, 2011.
23. **ENDRICH B, ASAISHI K, GÖTZ A, MESSMER K.** Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177:125-34, 1980.

24. **ENNETT AB, KAIGLER D, MOONEY DJ.** Temporally regulated delivery of VEGF in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* 79:176-84, 2006.
25. **EPSTEIN NE.** Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery: The evidence continues to mount. *Surg Neurol Int* 4:S343-52, 2013.
26. **ESTES BT, DIEKMAN BO, GIMBLE JM, GUILAK F.** Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc* 5:1294-311, 2010.
27. **EUROTRANSPLANT.** (2015). Active waiting list (at year-end) in Germany, by year, by organ. Zugriff am 25. April 2015 unter:
http://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=waiting+list&search_organ=&search_region=Germany&search_period=2014&search_characteristic=&search_text=
28. **EUROTRANSPLANT.** (2015). Transplants in Germany, by year, by donor type, by organ combination. Zugriff am 25. April 2015 unter:
http://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=transplants&search_organ=&search_region=Germany&search_period=2014&search_characteristic=&search_text=
29. **FOLKMAN J, HOCHBERG M.** Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 138:745-53, 1973.
30. **FRASER JK, WULUR I, ALFONSO Z, HEDRICK MH.** Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24:150-4, 2006.
31. **GORNA K, GOGOLEWSKI S.** Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *J Biomed Mater Res A* 79:128-38, 2006.
32. **HAYCOCK JW.** 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol* 695:1-15, 2011.
33. **HOBBS JB, CHUSILP S, HUA A, KINCAID-SMITH P, McIVER MA.** The pathogenesis of hypertensive vascular changes in the rat: microscopic and ultrastructural correlation in vivo. *Clin Sci Mol Med Suppl* 3:73s-75s, 1976.
34. **HORAS JA, OLGUIN OR, RIZZOTTO MG.** On the surviving fraction in irradiated multicellular tumour spheroids: calculation of overall radiosensitivity parameters, influence of hypoxia and volume effects. *Phys Med Biol* 50:1689-701, 2005.
35. **HUTTON DL, MOORE EM, GIMBLE JM, GRAYSON WL.** Platelet-derived growth factor and spatiotemporal cues induce development of vascularized bone tissue by adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 19:2076-86, 2013.
36. **JANECZEK PORTALSKA K, LEFERINK A, GROEN N, FERNANDES H, MORONI L, VAN BLITTERSWIJK C, DE BOER J.** Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One* 7:e46842, 2012.

37. **JONES MK, WANG H, PESKAR BM, LEVIN E, ITANI RM, SARFEH IJ, TARNAWSKI AS.** Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 5:1418-23, 1999.
38. **JIANG J, KOJIMA N, GUO L, NARUSE K, MAKUUCHI M, MIYAJIMA A, YAN W, SAKAI Y.** Efficacy of engineered liver tissue based on poly-L-lactic acid scaffolds and fetal mouse liver cells cultured with oncostatin M, nicotinamide, and dimethyl sulfoxide. *Tissue Eng* 10:1577-86, 2004.
39. **KAPUR SK, WANG X, SHANG H, YUN S, LI X, FENG G, KHURGEL M, KATZ AJ.** Human adipose stem cells maintain proliferative, synthetic and multipotential properties when suspension cultured as self-assembling spheroids. *Biofabrication* 4:025004, 2012.
40. **KORFF T, KIMMINA S, MARTINY-BARON G, AUGUSTIN HG.** Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J* 15:447-57, 2001.
41. **KREMER M, LANG E, BERGER AC.** Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra artificial skin). *Br J Plast Surg* 53:459-65, 2000.
42. **KROEZE RJ, KNIPPENBERG M, HELDER MN.** Osteogenic differentiation strategies for adipose-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol* 702:233-48, 2011.
43. **LANGER R, VACANTI JP.** Tissue engineering. *Science* 260:920-6, 1993.
44. **LASCHKE MW, HARDER Y, AMON M, MARTIN I, FARHADI J, RING A, TORIO-PADRON N, SCHRAMM R, RÜCKER M, JUNKER D, HÄUFEL JM, CARVALHO C, HEBERER M, GERMANN G, VOLLMAR B, MENGER MD.** Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12:2093-104, 2006.
45. **LASCHKE MW, VOLLMAR B, MENGER MD.** Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Eng Part B Rev* 15:455-65, 2009.
46. **LASCHKE MW, STROHE A, MENGER MD, ALINI M, EGLIN D.** In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 6:2020-7, 2010.
47. **LASCHKE MW, MUSSAWY H, SCHULER S, KAZAKOV A, RÜCKER M, EGLIN D, ALINI M, MENGER MD.** Short-term cultivation of in situ prevascularized tissue constructs accelerates inosculation of their preformed microvascular networks after implantation into the host tissue. *Tissue Eng Part A* 17:841-53, 2011.
48. **LASCHKE MW, KLEER S, SCHEUER C, SCHULER S, GARCIA P, EGLIN D, ALINI M, MENGER MD.** Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 24:266-77, 2012.

49. **LEES JG, LIM SA, CROLL T, WILLIAMS G, LUI S, COOPER-WHITE J, MCQUADE LR, MATHIYALAGAN B, TUCH BE.** Transplantation of 3D scaffolds seeded with human embryonic stem cells: biological features of surrogate tissue and teratoma-forming potential. *Regen Med* 2:289-300, 2007.
50. **LEHR HA, LEUNIG M, MENGER MD, NOLTE D, MESSMER K.** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143:1055-62, 1993.
51. **LEVENBERG S, ROUWKEMA J, MACDONALD M, GARFEIN ES, KOHANE DS, DARLAND DC, MARINI R, VAN BLITTERSWIJK CA, MULLIGAN RC, D'AMORE PA, LANGER R.** Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 23:879-84, 2005.
52. **LIN RZ, MORENO-LUNA R, ZHOU B, PU WT, MELERO-MARTIN JM.** Equal modulation of endothelial cell function by four distinct tissue-specific mesenchymal stem cells. *Angiogenesis* 15:443-55, 2012.
53. **LUNDBORG G.** Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 36:1-7, 2004.
54. **MENGER MD, LEHR HA.** Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14:519-22, 1993.
55. **MENGER MD, LASCHKE MW, VOLLMAR B.** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34:83-91, 2002.
56. **METZGER W, SOSSONG D, BÄCHLE A, PÜTZ N, WENNEMUTH G, POHLEMANN T, OBERRINGER M.** The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy* 13:1000-12, 2011.
57. **MITCHELL JB, MCINTOSH K, ZVONIC S, GARRETT S, FLOYD ZE, KLOSTER A, DI HALVORSEN Y, STORMS RW, GOH B, KILROY G, WU X, GIMBLE JM.** Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24:376-85, 2006.
58. **NAIK MN, MURTHY RK, HONAVAR SG.** Comparison of vascularization of Medpor and Medpor-Plus orbital implants: a prospective, randomized study. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 23:463-7, 2007.
59. **NAPOLITANO AP, CHAI P, DEAN DM, MORGAN JR.** Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. *Tissue Eng* 13:2087-94, 2007.
60. **NILLESEN ST, GEUTJES PJ, WISMANS R, SCHALKWIJK J, DAAMEN WF, VAN KUPPEVELT TH.** Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials* 28:1123-31, 2007.

61. **NORRBY K.** Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 105:417-37, 1997.
62. **NOVOSEL EC, KLEINHANS C, KLUGER PJ.** Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 63:300-11, 2011.
63. **OHASHI K, WAUGH JM, DAKE MD, YOKOYAMA T, KUGE H, NAKAJIMA Y, YAMANOUCHI M, NAKA H, YOSHIOKA A, KAY MA.** Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* 41:132-40, 2005.
64. **OKABE M, IKAWA M, KOMINAMI K, NAKANISHI T, NISHIMUNE Y.** 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-9, 1997.
65. **ORR AW, ELZIE CA, KUCIK DF, MURPHY-ULLRICH JE.** Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 116:2917-27, 2003.
66. **OSWALD J, BOXBERGER S, JØRGENSEN B, FELDMANN S, EHNINGER G, BORNHÄUSER M, WERNER C.** Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22:377-84, 2004.
67. **PATAN S.** Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 117:3-32, 2004.
68. **PERETS A, BARUCH Y, WEISBUCH F, SHOSHANY G, NEUFELD G, COHEN S.** Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A* 65:489-97, 2003.
69. **POLVERINI PJ, COTRAN PS, GIMBRONE MA JR, UNANUE ER.** Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269:804-6, 1977.
70. **QURESHI AT, CHEN C, SHAH F, THOMAS-PORCH C, GIMBLE JM, HAYES DJ.** Human adipose-derived stromal/stem cell isolation, culture, and osteogenic differentiation. *Methods Enzymol* 538:67-88, 2014.
71. **RAO RR, STEGEMANN JP.** Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy* 15:1309-22, 2013.
72. **RÜCKER M, LASCHKE MW, JUNKER D, CARVALHO C, SCHRAMM A, MÜLHAUPT R, GELLRICH NC, MENGER MD.** Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 27:5027-38, 2006.
73. **SALGADO AJ, COUTINHO OP, REIS RL.** Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 4:743-65, 2004.
74. **SANDISON JC.** The transparent chamber of the rabbit's ear, giving a complete description of improved technic of construction and introduction, and general account of growth and behavior of living cells and tissues as seen with the microscope. *Am J Anat* 41:447-472, 1928.

75. **SÁNDOR GK, NUMMINEN J, WOLFF J, THESLEFF T, MIETTINEN A, TUOVINEN VJ, MANNERSTRÖM B, PATRIKOSKI M, SEPPÄNEN R, MIETTINEN S, RAUTIAINEN M, OHMAN J.** Adipose Stem Cells Used to Reconstruct 13 Cases With Cranio-Maxillofacial Hard-Tissue Defects. *Stem Cells Transl Med* 3:530-40, 2014.
76. **SANTOS MI, UNGER RE, SOUSA RA, REIS RL, KIRKPATRICK CJ.** Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials* 30:4407-15, 2009.
77. **SCHUMANN P, TAVASSOL F, LINDHORST D, STUEHMER C, BORMANN KH, KAMPMANN A, MÜLHAUPT R, LASCHKE MW, MENDER MD, GELLRICH NC, RÜCKER M.** Consequences of seeded cell type on vascularization of tissue engineering constructs in vivo. *Microvasc Res* 78:180-90, 2009.
78. **SCLAFANI AP, THOMAS JR, COX AJ, COOPER MH.** Clinical and histologic response of subcutaneous expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex) and porous high-density polyethylene (Medpor) implants to acute and early infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 123:328-36, 1997.
79. **SCOTT MA, LEVI B, ASKARINAM A, NGUYEN A, RACKOHN T, TING K, SOO C, JAMES AW.** Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells Dev* 21:655-67, 2012.
80. **SEGAR CE, OGLE ME, BOTCHWEY EA.** Regulation of angiogenesis and bone regeneration with natural and synthetic small molecules. *Curr Pharm Des* 19:3403-19, 2013.
81. **SHAHLAIE K, KIM KD.** Occipitocervical fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2: adverse effects due to tissue swelling and seroma. *Spine (Phila Pa 1976)* 33:2361-6, 2008.
82. **SHEN FH, WERNER BC, LIANG H, SHANG H, YANG N, LI X, SHIMER AL, BALIAN G, KATZ AJ.** Implications of adipose-derived stromal cells in a 3D culture system for osteogenic differentiation: an in vitro and in vivo investigation. *Spine J* 13:32-43, 2013.
83. **SHEPHERD BR, ENIS DR, WANG F, SUAREZ Y, POBER JS, SCHECHNER JS.** Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell-derived endothelial cells. *FASEB J* 20:1739-41, 2006.
84. **SHI Y, NIEDZINSKI JR, SAMANIEGO A, BOGDANSKY S, ATKINSON BL.** Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration. *Tissue Eng Part A* 18:1313-21, 2012.
85. **SMILER D, SOLTAN M, LEE JW.** A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dent* 16:42-53, 2007.
86. **SUNG HJ, MEREDITH C, JOHNSON C, GALIS ZS.** The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 25:5735-42, 2004.

87. **TREMBLAY PL, HUDON V, BERTHOD F, GERMAIN L, AUGER FA.** Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* 5:1002-10, 2005.
88. **TUNG YC, HSIAO AY, ALLEN SG, TORISAWA YS, HO M, TAKAYAMA S.** High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 136:473-8, 2011.
89. **URICH E, PATSCH C, AIGNER S, GRAF M, IACONE R, FRESKÅRD PO.** Multicellular self-assembled spheroidal model of the blood brain barrier. *Sci Rep* 3:1500, 2013.
90. **VACANTI CA, UPTON J.** Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg.* 21:445-62, 1994.
91. **WALSER R, METZGER W, GÖRG A, POHLEMANN T, MENGER MD, LASCHKE MW.** Generation of co-culture spheroids as vascularisation units for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater* 26:222-33, 2013.
92. **YARLAGADDA PK, CHANDRASEKHARAN M, SHYAN JY.** Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed Mater Eng* 15:159-77, 2005.
93. **YING C, HU W, CHENG B, ZHENG X, LI S.** Neural differentiation of rat adipose-derived stem cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 32:1255-63, 2012.
94. **YOON HH, BHANG SH, SHIN JY, SHIN J, KIM BS.** Enhanced cartilage formation via three-dimensional cell engineering of human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 18:1949-56, 2012.
95. **ZAREM HA.** The microcirculatory events within full-thickness skin allografts (homografts) in mice. *Surgery* 66:392-7, 1969.
96. **ZIMMERLIN L, DONNENBERG VS, PFEIFER ME, MEYER EM, PÉAULT B, RUBIN JP, DONNENBERG AD.** Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A* 77:22-30, 2010.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Dissertation stets begleitet und mich mit ihrer Expertise fachkundig und entgegenkommend unterstützt haben.

Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Homburg/Saar, tätig sein zu dürfen.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Professor Dr. med. Matthias W. Laschke für die Überlassung des Themas, seine konstruktive Kritik und Unterstützung, die sich durch seine allzeit bereite Ansprechbarkeit äußerte. Seine persönliche Anleitung und seine fachliche Kompetenz haben das Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beeinflusst.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. rer. med. Claudia Scheuer, Frau Julia Parakenings, Frau Sandra Schuler, Frau Ruth Nickels sowie Frau Janine Becker, die sich sowohl bei labortechnischen Arbeiten als auch bei der Erstellung histologischer Präparate immer kompetent und hilfsbereit zeigten. Sie waren ein entscheidender Faktor für den Erfolg dieser Arbeit.

Außerdem danke ich allen, die mich durch interessierte Diskussionen sowie persönliche Anteilnahme bei dieser Arbeit unterstützt haben.

10. Publikationen

Originalarbeiten

LASCHKE MW, **SCHANK TE**, SCHEUER C, KLEER S, SCHULER S, METZGER W, EGLIN D, ALINI M, MENDER MD. Three-dimensional spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells are potent initiators of blood vessel formation in porous polyurethane scaffolds. *Acta Biomater* 9:6876-84, 2013.

LASCHKE MW, **SCHANK TE**, SCHEUER C, KLEER S, SHADMANOV T, EGLIN D, ALINI M, MENDER MD. In vitro osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids impairs their in vivo vascularization capacity inside implanted porous polyurethane scaffolds. *Acta Biomater* 10:4226-35, 2014.