

Intrinsische Vaskularisation von MSC beladenen Alginate-Gelatine-Kapseln im AV-Loop Modell der Ratte

Aus der Plastisch- und Handchirurgischen Klinik
der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. R. E. Horch

Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med.
vorgelegt von
Lara F. Lingens

**Als Dissertation genehmigt von der Medizinischen
Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr. Markus F. Neurath

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Arkudas

Gutachter: Prof. Dr. Andrea Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 2020

Die Ergebnisse und Abbildungen dieser Doktorarbeit wurden bei Mary Ann Liebert, Inc., New Rochelle, NY unter dem Titel „Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells Improves Vascularization of Alginate-Based Scaffolds“ publiziert.

(Steiner, D.; Lingens, L.; Fischer, L.; Köhn, K.; Detsch, R.; Boccaccini, A. R. Fey, T., Greil, P., Weiß, C., Beier, J. P., Horch, R. E., Arkudas, A. (2018): Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells Improves Vascularization of Alginate-Based Scaffolds.

In: *Tissue Engineering Part A* 24 (17-18), S. 1320–1331.)

Inhalt

1. Zusammenfassung	6
1.1. Hintergrund und Ziele der Studie	6
1.2. Methoden.....	7
1.3. Ergebnisse und Schlussfolgerung	8
2. Summary.....	9
2.1. Background and aim of the study	9
2.2. Methods.....	9
2.3. Results and conclusion.....	10
3. Einleitung	10
3.1. Tissue Engineering	10
3.2. Zellen.....	12
3.2.1. Mesenchymale Stammzellen.....	12
3.3. Trägermaterialien.....	14
3.3.1. Allgemeine Anforderungen	14
3.3.2. Trägermaterialien für Tissue Engineering von Knochengewebe .	15
3.3.3. Alginat-Gelatine	17
3.4. Vaskularisierung	18
3.4.1. Die Vaskularisierung und das Tissue Engineering	18
3.4.2. Extrinsische Vaskularisierung.....	19
3.4.3. Intrinsische Vaskularisierung.....	21
3.4.4. AV-Loop-Modell.....	22
4. Ziele der Studie.....	24
5. Material und Methoden	25
5.1. Versuchsdesign	25
5.2. Zellkultur	25
5.2.1. Zellisolierung	25

5.2.2. Passagieren von MSC.....	26
5.2.3. Einfrieren von MSCs.....	27
5.2.4. Auftauen von MSC	27
5.2.5. Fluoreszenzlabeling.....	28
5.3. ADA-GEL Mikrokapseln.....	28
5.3.1. Produktion von ADA-GEL.....	28
5.3.2. Herstellung der Mikrokapseln	29
5.3.3. Verkapselung der MSCs.....	29
5.4. Teflonkammer.....	29
5.5. Tiere	30
5.6. Chirurgische Eingriffe	31
5.6.1. Implantation.....	31
5.6.2. Explantation.....	32
5.7. Mikro-Computertomographie	33
5.8. Histologie.....	34
5.8.1. Histologische Präparate	34
5.8.2. Histologische Färbung.....	36
5.9. Statistik	52
6. Ergebnisse.....	52
6.1. Operationsergebnisse und Makroskopische Inspektion.....	52
6.2. Histologische Analyse.....	53
6.2.1. HE-Färbung.....	53
6.2.2. Masson-Goldner-Trichrom Färbung	55
6.2.3. ED1 Immunhistochemische Färbung.....	56
6.2.4. Hif-1 α Immunhistochemische Färbung.....	57
6.2.5 Lektin und ASMA Immunhistochemische Färbung.....	58
6.2.6. DAPI und Dil.....	59
6.2.7. Qualitative und quantitative Auswertung der Vaskularisation	61

6.3. μ CT Analyse	62
7. Diskussion.....	63
7.1. Beurteilung des Vaskularisierungsmodells	63
7.2. Mesenchymale Stammzellen	67
7.3. ADA-GEL Mikrokapseln.....	69
8. Schlussfolgerung	71
9. Ausblick	72
10. Literaturverzeichnis.....	75
11. Danksagung.....	87

1. Zusammenfassung

1.1. Hintergrund und Ziele der Studie

Die Rekonstruktion großer Gewebedefekte ist eine enorme Herausforderung für die regenerative Medizin. In der heutigen Zeit ist der Goldstandard zur Behandlung solcher Defekte die Transplantation von vaskularisierten autologen Gewebelappen. Dies geht jedoch mit einer starken Belastung der Patienten durch die Hebmorbidity einher. Eine Lösung dieses Problems bietet die Herstellung bioartifizialen Gewebes nach den Prinzipien des Tissue Engineerings.

Für das Tissue Engineering von Knochengewebe werden Trägermaterialien, auch Scaffolds genannt, benutzt und diese mit Zellen besiedelt und so als Gewebekonstrukt implantiert. Entscheidend für den Erfolg ist die rasche Vaskularisierung dieser Konstrukte, damit die Vitalität und Funktionalität des artifiziell hergestellten Gewebes in den Konstrukten gewährleistet werden kann. Eine erfolgreiche Methode, um prävaskularisierte Gewebekonstrukte herzustellen, ist das arteriovenöse Gefäßschleifenmodell (AV-Loop) in einer Isolationskammer. Als geeignetes Biomaterial bieten sich Hydrogele an, da sie durch ihren hohen Wasseranteil eine gewebsähnliche Umgebung für die Zellen formen und die extrazelluläre Matrix simulieren, bis sich die Zellen ausreichend proliferiert haben, um ihre eigene extrazelluläre Matrix zu bilden. Das Hydrogel aus Alginatdialdehyd und Gelatine (ADA-GEL) ist ein Biomaterial, das sich als Trägermaterial für das Tissue Engineering von Knochengewebe als geeignet präsentiert hat. In ADA-GEL verkapselte mesenchymale Stammzellen (MSCs), die ebenso viele günstige Eigenschaften für das Tissue Engineering von Knochengewebe mitbringen, erscheinen in Kombination mit dem AV-Loop Modell als vielversprechendes Konstrukt für das Generieren von vaskularisiertem Knochengewebe.

1.2. Methoden

Bei insgesamt 18 syngenem männlichen Lewis Ratten wurde zwischen der linken A. femoralis und der linken V. femoralis ein Veneninterponat der kontralateralen Seite mikrochirurgisch eingesetzt und so ein AV-Loop

geschaffen. Dieser wurde in eine Teflon-Isolationskammer gebettet, die Kammer wurde mit der ADA-GEL-Matrix gefüllt, verschlossen und an der Adduktorenmuskelfaszie befestigt. In Gruppe A bestand die Matrix aus reinen ADA-GEL Mikrokapseln und in Gruppe B aus ADA-GEL Mikrokapseln, in denen 2×10^6 Dil-markierte MSCs/mL verkapselt wurden. Nach vier Wochen wurden die Tiere mit Microfil® perfundiert und die Konstrukte anschließend en-bloc explantiert. Daraufhin wurden die Präparate für die Mikrocomputer Tomographie (μ CT), die Histomorphometrie und die Immunhistologie aufgearbeitet und hinsichtlich der Angiogenese, Biodegradation, Immunantwort und Gewebeneubildung analysiert.

1.3. Ergebnisse und Schlussfolgerung

Wir konnten erstmalig zeigen, dass ADA-GEL Mikrokapseln intrinsisch mittels AV-Loop vaskularisiert werden konnten. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Verkapselung von MSCs in ADA-GEL die Gefäßanzahl und die vaskularisierte Fläche im Vergleich zu ADA-GEL Mikrokapseln ohne MSCs signifikant steigert. Die Biodegradation wird durch MSCs in den Mikrokapseln gesteigert, was durch die signifikant verringerte Konstruktgröße der Gruppe mit MSCs verdeutlicht wurde. Die neu gebildeten Gefäße waren funktionsfähig und intakt. Es trat kein Microfil® aus und in den histologischen Färbungen fanden sich Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen.

In beiden Gruppen zeigte sich eine gute Biokompatibilität des ADA-GELs. Wir haben keinen immunmodulierenden Effekt von MSCs auf die Biokompatibilität beobachten können.

Das AV-Loop Modell in Kombination mit ADA-GEL Mikrokapseln und MSCs eignet sich für Tissue Engineering Anwendungen. Da es die Möglichkeit eröffnet, großvolumige Defekte mit einer marginalen Hebermorbidität zu rekonstruieren. Weitere Forschungsbemühungen werden notwendig sein, um die Knochenbildung und die Degradation von ADA-GEL zu beschleunigen, um das Modell auf den Menschen übertragen zu können.

2. Summary

2.1. Background and aim of the study

The reconstruction of large-scale tissue defects is an enormous challenge in the field of regenerative medicine. Today the gold standard to treat this kind of defects is the transplantation of vascularized autologous tissue. However, this puts the patient under great strain due to the donor site morbidity. Generating bioartificial tissues based on the principles of tissue engineering is a way to solve these problems.

For bone tissue engineering a scaffold is seeded with cells and then implanted as a construct for newly formed tissue. To ensure the viability and functionality of the artificially generated tissue it is essential to have a rapid vascularization of the construct. An effective method for prevascularization is the AV-Loop model combined with an isolation chamber. Due to their high content of water hydrogels form a tissue-like environment for cells and simulate the extracellular matrix until the cells have proliferated sufficiently to produce their own extracellular matrix. The hydrogel ADA-GEL is a biomaterial that has shown to be a promising scaffold for bone tissue engineering. To encapsulate MSCs, which have many favorable features for bone tissue engineering, in ADA-GEL and combine those with the AV-Loop, appears to be a very promising model for tissue engineering of vascularized bone tissue.

2.2. Methods

In a total of 18 syngenic male Lewis rats an AV-Loop was generated by connecting the left A. femoralis with the left V. femoralis by microsurgical interposing of the V. femoralis of the contralateral leg. The Loop was put in the teflon isolation chamber, the chamber was then filled with the matrix, closed and attached to the muscle fascia of the adductors. In group A the matrix contained pure ADA-GEL microcapsules and in group B the matrix contained 2×10^6 Dil-labeled MSCs/mL encapsulated in the ADA-GEL microcapsules. After four weeks each specimen was perfused with Microfil® and subsequently

the en-bloc explantation of the constructs was performed. Afterwards, the constructs were prepared for μ CT, histomorphometry and immunohistology and analyzed in terms of angiogenesis, biodegradation, immunoreaction and de-novo tissue formation.

2.3. Results and conclusion

In both groups we proved that intrinsic vascularization of ADA-GEL, by means of the AV-Loop, was successful. Furthermore, we were able to show, that in ADA-GEL encapsulated MSCs significantly enhance the total vessel count and vessel area in comparison to ADA-GEL microcapsules without MSCs. The biodegradation is enhanced by MSCs in microcapsules, which is indicated by the significant smaller construct size in the group with MSCs. The newly formed vessels were functional and intact. There was no leakage of Microfil®. In the histological staining we could observe endothelial cells as well as smooth muscle cells.

The immunoreaction of both groups was diminutive. We could not see an immunomodulating effect of MSCs.

The AV-Loop model in combination with ADA-GEL microcapsules and encapsulated MSCs is suitable for tissue engineering. It offers the potential to reconstruct large scale tissue defects with only a minimal donor site morbidity. Further research will be necessary to accelerate bone formation and biodegradation of ADA-GEL, to transfer the model to an application in humans.

3. Einleitung

3.1. Tissue Engineering

Tissue Engineering wurde anfänglich wie folgt definiert: "... an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function" (Langer und Vacanti 1993). Beim Tissue Engineering geht es um das

Züchten von künstlichen Ersatzgeweben durch eine Kombination von Zellkultivierung, einer geeigneten Matrix und Wachstum stimulierenden Signalmolekülen, um funktionelle Konstrukte herzustellen, die defekte Gewebe im Menschen ersetzen. Die Forschung im Bereich Tissue Engineering ist multidisziplinär angelegt und basiert auf Forschungsfeldern der klinischen Medizin, der Biomaterialforschung, der Ingenieurwissenschaft und den Naturwissenschaften. (Langer und Vacanti 1993; O'Brien 2011)

Schon früh entstand der Wunsch, geschädigte Gewebe im Menschen wiederherzustellen. Schon Gaspare Tagliacozzi beschrieb in seinem Werk „De Curtorum Chirurgia per infitionem“ im Jahr 1597 wie er Hautdefekte mittels autogener Gewebe rekonstruierte. Weiter bekannte Möglichkeiten um geschädigtes Gewebe zu ersetzen sind zurzeit allogene und xenogene Transplantate. Diese drei Methoden haben jedoch gemeinsam, dass sie limitiert sind. Gründe für die Limitation sind die anatomischen Gegebenheiten des Menschen, die Hebmorbidität an der Entnahmestelle und die Abwehrreaktion des Empfängers (O'Brien 2011). Es wurde nach einer neuen Lösung gesucht, um geschädigtes Gewebe zu ersetzen, und die Idee entstand, künstliches Gewebe heranzuzüchten.

Erstmalig wurde der Begriff Tissue Engineering von Y.C. Fung beschrieben, als er 1985 erfolglos seine wissenschaftlichen Arbeiten unter dem Namen „Center for the Engineering of Living Tissues“ bei der National Science Foundation (NSF) einreichte. Erst in 1988 wurde der Begriff von der National Science Foundation offiziell eingeführt. (Bhavya Lal, Jessica Viola, Oren Grad, Diana Hicks 2003)

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft kann man davon ausgehen, dass in der Zukunft jedes Gewebe artifiziell hergestellt werden kann. (Minuth et al. 2012; Langer und Vacanti 1993) Die Voraussetzung hierfür ist abhängig von den Anforderungen des Gewebes (Langer und Vacanti 1993). Grundsätzlich lässt sich aber festhalten, dass Zellen mit hoher Proliferationsrate, ein geeignetes Trägermaterial und eine ausreichende Vaskularisierung für den Erfolg des Tissue Engineering entscheidend sind.

Beim Tissue Engineering werden meist adulte Stammzellen entnommen und durch Wachstumssignale zur Proliferation angeregt. Dadurch entsteht primär

eine zweidimensionale Zellschicht. Erst beim Erreichen der benötigten Zellzahl, werden diese auf oder in ein dreidimensionales Trägermaterial gegeben, welches die gewünschte Form vorgibt und in einigen Fällen auch Signale abgibt, die die Zelldifferenzierung anregen können (Amini et al. 2012). Andernfalls müssen auch diese Signalmoleküle dazu gegeben werden. Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist die Gefäßversorgung. Da dies oft der limitierende Faktor ist, gibt es eine Reihe von Modellen, die die Vaskularisierung gewährleisten sollen. Sie werden unterschieden in die extrinsische Vaskularisierung und die intrinsische Vaskularisierung.

3.2. Zellen

Der menschliche Körper besteht aus ungefähr 100 Billionen Zellen und mehr als 260 verschiedenen Zelltypen, die sich zu den verschiedenen Organen und Geweben des Menschen verbinden. Sie alle haben ihren Ursprung in einer Zelle. Diese Ursprungszelle und die aus ihr entstehenden embryonalen Stammzellen sind im adulten Menschen nicht mehr zu finden. Allerdings gibt es, als Überbleibsel dieser Ursprungszellen, die adulte Stammzelle (Wade 2001). Charakteristisch für diese ist, dass sie nicht gewebespezifisch sind, sich aber durch ein passendes Signal zu mindestens einer spezifischen Zelle differenzieren können. Ihre Funktion ist es, abgestorbene Zellen zu ersetzen und so geschädigte Gewebe zu erneuern. Für das Tissue Engineering sind sie vor allem durch ihr hohes Differenzierungs- und Proliferationspotential interessant (Barry und Murphy 2004), da durch die Entnahme weniger Zellen nur ein geringer Hebedefekt gesetzt wird, jedoch *in vitro* genügend Zellen herangezüchtet werden können, um ausreichend Gewebe zur Verfügung zu haben.

3.2.1. Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) wurden erstmals durch Friedenstein et al. beschrieben. Er konnte zeigen, dass Fibroblasten, die aus Knochenmark von Meerschweinchen entnommen wurden, spontan Knochengewebe bilden

können (Friedenstein et al. 1970). Sie sind multipotent und können sich in eine Reihe von Geweben mesenchymalen Ursprungs differenzieren, dazu gehört Knochen, Knorpel, Fettgewebe, Muskelgewebe, Knochenmarkstroma und Sehnen (Pittenger et al. 1999).

Ein großer Vorteil von MSCs für die klinische Anwendung ist die geringe Hebmorbidity, die auf ihrer Entnahme aus dem Knochenmark beruht, da durch ein kleines Knochenmarkspirat *ex vivo* viele Milliarden Zellen asserviert werden können (Mauney et al. 2005). MSCs können aus weiteren adulten und fötalen Geweben isoliert werden. Dazu gehören Fettgewebe (Zuk et al. 2001), Synovialgewebe (Bari et al. 2001), Fruchtwasser (Tsai et al. 2004), Nabelschnurblut (Erices et al. 2000) und Plazenta (Patel et al. 2014). Diese sind der Entnahme aus Knochenmark in der klinischen Anwendung jedoch unterlegen (Le Blanc und Ringdén 2006).

Für das Knochen Tissue Engineering liegt der Wert von MSCs vor allem in ihrer potentiellen osteogenen Differenzierung. Bisher ist der Goldstandard zur Behandlung von Knochendefekten die Transplantation von autologem Knochen, da dies sowohl die Struktur, als auch die Funktion wiederherstellt. Die Risiken hierbei sind die Hebmorbidity, der Verlust der Transplantatfunktion und Infektionen. Eine Alternative ist das allogene Transplantat, doch auch hier gibt es erhebliche Risiken, wie die Gefahr Krankheiten zu übertragen und Abstoßungsreaktionen. Um die Limitationen der genannten Behandlungsverfahren zu überwinden, wurde eine Reihe von Biomaterialien eingeführt (siehe Kapitel Trägermaterialien). Dabei spielt die Besiedlung mit MSCs eine wichtige Rolle, da gezeigt werden konnte, dass sie die Osseointegration und Knochenentstehung *in vivo* erhöht (Mauney et al. 2005).

Durch ihre Multipotenz und weitere günstige Eigenschaften wie ihre immunmodulatorische Wirkung ist ihr Potential zur Anwendung nicht nur auf das Tissue Engineering beschränkt. Ein weiteres Anwendungsgebiet sind degenerative Knochenerkrankungen. So konnte Horwitz et al. zeigen, dass Osteogenesis imperfecta einen signifikant besseren Krankheitsverlauf hat, wenn man MSCs *in vivo* appliziert, während Ischioka et al. zeigte, dass das

Fortschreiten einer Osteoporose in Mäusen durch Implantation von allogenen MSCs ins Knochenmark gehemmt wird (Horwitz et al. 1999) (Ichioka et al. 2002).

Andere Möglichkeiten der Anwendung von MSCs wurden in verschiedenen Tiermodellen untersucht. Hier wurde gezeigt, dass MSCs das Potenzial haben bei der Therapie vom Myokardinfarkt, Lungenfibrose durch Bleomycin, Sehndefekten, Meniskusschäden und Muskuläre Dystrophie eingesetzt zu werden. Hierfür wurden die Zellen entweder lokal oder systemisch appliziert. Das Potential der MSCs in diesen Anwendungen basiert auch in diesen Ansätzen auf den regenerativen Eigenschaften der MSCs und ihrer Fähigkeit sich multipotent zu differenzieren (Barry und Murphy 2004).

MSCs haben einen regulierenden Einfluss auf das Immunsystem. So konnte Majumdar et al. zeigen, dass MSCs eine niedrige Expression von Co-Stimulationsmolekülen aufweisen und HLA-2 Rezeptoren gar nicht exprimieren (Majumdar et al. 1998). Darüber hinaus erkannten Le Blanc et al., dass differenzierte MSCs immunmodulatorische, antiproliferative und antientzündliche Fähigkeiten haben (Le Blanc et al. 2003). Die Immunreaktion spielt zwar bei der Verwendung von autologen Zellen eine untergeordnete Rolle, in Verbindung mit artifiziellen Biomaterialien ist die hemmende Wirkung der MSCs auf die Immunreaktion jedoch sehr nützlich. Des Weiteren werden die immunmodulatorische Eigenschaften von MSCs auch therapeutisch angewandt, zum Beispiel um die steroidrefraktäre Graft-versus-Host-Reaktion zu behandeln (Singer und Caplan 2011).

3.3. Trägermaterialien

3.3.1. Allgemeine Anforderungen

Im menschlichen Körper, also in der natürlichen Umgebung von Zellen, bilden diese ihr Trägermaterial, auch extrazelluläre Matrix oder Interzellularraum genannt, selbst. Die extrazelluläre Matrix besteht aus Makromolekülen, Wasser und Elektrolyten und ist an der Weiterleitung von Signalmolekülen beteiligt. Zur Herstellung artifizieller Trägermaterialien ist es folglich wichtig,

die Interaktionen zwischen den einzelnen Zellen und mit der extrazellulären Matrix zu verstehen (Putnam und Mooney 1996).

Ein geeignetes Trägermaterial muss den dreidimensionalen Aufbau des Zellgerüsts evozieren und Zellinteraktionen und Ernährung sowie den Abtransport der Abbauprodukte zulassen, folglich porös sein (Cassell et al. 2002). Eine ebenso wichtige Eigenschaft des Materials ist die Biokompatibilität. Das bedeutet, dass die Zellen sich in Verbindung mit dem Material normal verhalten und adhären. Das Trägermaterial sollte nach Implantation des Konstruktes keine ausgeprägte Entzündungsreaktion induzieren (O'Brien 2011).

Da das Trägermaterial nicht als dauerhaftes Implantat gedacht ist, sondern als Platzhalter bis die Zellen ihre eigene extrazelluläre Matrix aufgebaut haben, muss es vom Körper abbaubar sein. Dafür ist eine kontrollierte Immunreaktion zwar nötig, diese sollte jedoch nicht in eine der Heilung schädliche Entzündung übergehen. Es versteht sich von selbst, dass die Abbauprodukte nicht toxisch für den Menschen sein dürfen. Nach dem Grundsatz der rekonstruktiven Chirurgie, Gleiches mit Gleichem zu ersetzen, ist es von Vorteil, wenn das Material möglichst ähnliche Eigenschaften aufweist, wie das zu rekonstruierende Gewebe (O'Brien 2011).

3.3.2. Trägermaterialien für Tissue Engineering von Knochengewebe

Man kann die Trägermaterialien für Knochengewebe in drei Gruppen unterteilen:

1. Osteoinduktive Materialien
2. Hybridmaterialien
3. Hydrogele

(Amini et al. 2012)

Osteoinduktive Materialien fördern die Knochenbildung und können zum Teil sogar ektopische Knochenbildung induzieren, indem sie die *in vivo* Verhältnisse von Knochengewebe nachahmen. Hierzu gehören natürliche und synthetische Keramik und Kalziumphosphat Verbindungen (Amini et al. 2012).

Da für das Tissue Engineering von Knochengewebe die Anforderungen an das Trägermaterial von einer Substanz kaum zu erfüllen ist, ist man dazu übergegangen Materialien zu kombinieren. So gibt es Co-Polymere, die aus der Verbindung von zwei oder mehr Monomeren gewonnen werden, um beispielsweise zu lange Degradationszeiten zu vermindern. Weiterhin gibt es Polymer-Mischungen mit zwei oder mehr Polymeren, was die Toxizität der Einzelsubstanz neutralisieren kann. Polymer-Keramik Verbindungen haben den Vorteil sich von beiden beziehungsweise jedem Stofftypen des Gemisches die förderlichen Eigenschaften zu Nutze machen (Amini et al. 2012). Zu den Hydrogelen zählen die natürlichen Polymere, wie Gelatine oder Kollagen und die synthetischen, wie Polyethylenglycol oder Polyvinylalkohol. Weiterhin gehören selbstassemblierende aus Peptiden bestehende Hydrogele in diese Gruppe. Der Vorteil von Hydrogelen ist, neben der sehr guten Biokompatibilität, ihre Möglichkeit, die extrazelluläre Matrix des Knochengewebes nachzuahmen und im Fall von selbstassemblierenden Gelen, die Eigenschaft die physikalische Geometrie eines Defektes anzunehmen (Amini et al. 2012). Außerdem sind Hydrogele sehr porös, dadurch können Sauerstoff, Nährstoffe und Metabolite zu den im Hydrogel integrierten Zellen. Gleichzeitig werden sie durch das Hydrogel vor der Immunreaktion des Körpers und mechanischen Einflüssen geschützt, was Hydrogele zur bevorzugten Gruppe für die Herstellung von Mikrokapseln macht (Sarker et al. 2014a).

Es wird weiterhin versucht, den immunmodulierenden Effekt dieser Materialien zu beeinflussen und zu kontrollieren. Auch hierfür gibt es verschiedene Ansätze. Beispiele sind die Wahl der Substanz, die Oberflächenbeschaffenheit, und die Integration von bioaktiven Molekülen (Amini et al. 2012), wie beispielsweise Hydroxyapatit (HA) Nanopartikel und Osteopontin in Verbindung mit einer Poly-D-L-Laktat Matrix (Jensen et al.

2011) und Dexamethason in Verbindung mit Polylactid-co-Glycolid (Wang et al. 2012).

3.3.3. Alginat-Gelatine

Alginat ist ein Polysaccharid bestehend aus (1-4)- β -D-Mannuronsäure und α -L-Guluronsäure,, die sich in Blöcken von Polymannuronat und Polyguluronat anordnen (Bouhadir et al. 1999). Es ist strukturgebend und kommt natürlicherweise in der Zellwand von einigen Arten der Braunalge, wie *Laminaria* sp., *Macrocystis* sp. und *Lessonia* sp. vor. Die Gelmatrix, die es ausbildet, verhilft der Alge zur Festigkeit bei gleichzeitiger Flexibilität. Außerdem wird es von einigen Bakterien gebildet beispielsweise *Azotobacter* sp. Die Vorteile von Alginat sind die günstige Herstellung, die gute Biokompatibilität und die einfache Modulierbarkeit (Andersen et al. 2012; Bouhadir et al. 1999). Nachteilig hingegen ist, dass es keine Zellinteraktionen fördert (Bouhadir et al. 1999), eine niedrige Viskosität aufweist, was das genaue dreidimensionale (3D) Formen erschwert (Duan et al. 2013) und statt zu degradieren, sich in seiner Umgebung auflöst, was den Abbauprozess unvorhersehbar macht (Rowley et al. 1999). Um diese für das Tissue Engineering limitierenden und nachteiligen Faktoren zu umgehen, ist man dazu übergegangen, neue Biomaterialien aus einer Mischung von Alginat und anderen Stoffen herzustellen. Hierfür bietet es sich an, das Protein Gelatine durch kovalente Bindungen mit Alginat-Dialdehyd (ADA), einem teilweise oxidierten Derivat von Alginat, das den Vorteil hat, durch die freien Aminosäuren Lysin oder Hydroxylysin Schiff'sche Basen auszubilden, zu verknüpfen (Balakrishnan und Jayakrishnan 2005). Gelatine (GEL) wird aus der Hydrolyse von Kollagen hergestellt, wobei die Tripelhelix zufällig in Coils aufgebrochen wird (Boanini und Bigi 2011). Wenn es durch Abkühlen von dem Zustand der Sole zum Gel übergeht, bilden einige Spulen wieder eine Tripelhelix aus (Bigi et al. 2004; Boanini und Bigi 2011). Es hat eine Reihe an vorteilhaften Eigenschaften, weshalb auch wir es zur Kombination mit Alginat ausgewählt haben. Es ist biologisch abbaubar und biokompatibel (Ponticciello et al. 2000). Außerdem fördert es sowohl die Zelladhäsion, als auch die Angiogenese (Dreesmann et al. 2007; Balakrishnan und Jayakrishnan 2005).

Dem gegenüber stehen die schlechten mechanischen Eigenschaften von Gelatine, die viele Anwendungsmöglichkeiten für das Tissue Engineering verhindern (Sarker et al. 2014a). Auch dies wird durch die kovalente Verbindung von ADA und Gelatine signifikant verbessert und macht ADA-GEL zu einem vielversprechenden Biomaterial für die Anwendung im Tissue Engineering (Boanini und Bigi 2011).

Balakrishnan und Jayakrishnan haben erstmalig gezeigt, dass oxidiertes Alginat kovalente Bindungen mit Gelatine eingeht, wenn Borax hinzugefügt wird. Diese Verbindung bildet ein Hydrogel, das für das Tissue Engineering generell geeignet ist.

Sarker et. al. haben ein Verfahren entwickelt, mit dem man mit pneumatischem Druck Mikrokapseln aus ADA-GEL herstellen und Zellen darin einschließen kann. Außerdem hat die Arbeitsgruppe die mechanischen Eigenschaften bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von ADA und Gelatine untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass ein hoher ADA Anteil die Gelierzeit erhöht, während ein hoher Gelatine Anteil die Degradation fördert. Sie verwendeten statt Borax Phosphat gepufferte Saline Lösung (PBS), um die Gelierzeit zu erhöhen und so das Herstellen von Mikrokapseln zu ermöglichen (Sarker et al. 2014a).

3.4. Vaskularisierung

3.4.1. Die Vaskularisierung und das Tissue Engineering

Die größte Limitation beim Tissue Engineering besteht in der Versorgung der Zellen im Gewebe mit im Blut transportierten Nährstoffen und Sauerstoff. Da die Diffusion von Sauerstoff, Nährstoffen und Metaboliten nur über Strecken von 150-200 Mikrometer möglich ist (Folkman, J. und Hochberg, M. 1973; Colton et al. 1995; Colton 1995), ist die Dicke des Gewebeimplantats stark limitiert, welches durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden kann. Die Gewebeart kann auch auf bradytrophes Gewebe (z.B. Knorpel) beschränkt sein, welches länger ohne eine Versorgung von Sauerstoff und Nährstoffe überleben kann. Um größere und komplexere dreidimensionale Gewebeblöcke verwenden zu können, was essentiell für die

klinische Anwendung des Tissue Engineerings ist (Griffith und Swartz 2006), muss das Gewebe vaskularisiert werden.

Es bestehen zwei grundlegende Konzepte zur Vaskularisierung von gezüchteten Geweben. Das eine wird als extrinsische Vaskularisierung und das andere intrinsische Vaskularisation bezeichnet. Für beide Konzepte spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle. Angiogenese beschreibt das Aussprossen von neuen Gefäßen aus einem bereits bestehenden Blutgefäßsystem. Dies kann induziert werden durch Signalmoleküle wie Hypoxia Induced Factor (HIF). Dieser bewirkt die Ausschüttung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet Derived Growth Faktor (PDGF), oder einer Kombination dieser. Vermehrt freigesetzt werden solche Wachstumssignale durch Hypoxie im Gewebe. Zur Hypoxie kommt es beispielsweise im Zentrum von soliden Tumoren, da auch Zellen von soliden Tumorzellen nur bis zu 200 Mikrometer durch Diffusion mit Sauerstoff versorgt werden können und ansonsten absterben (Almog 2010). Bekannt ist auch, dass Hypoxie in sich entwickelnden Geweben im Embryo auftritt. Außerdem tritt sie bei der Wundheilung und in entzündeten Geweben auf. Vaskulogenese ist eine andere Form der Gefäßneubildung, bei der die Gefäße, im Gegensatz zur Angiogenese, nicht aus einem bereits vorhandenen Gefäß auswachsen, sondern aus Endothelzellen oder deren Vorgängerzellen entstehen. Diese Form der Gefäßneubildung findet man natürlicherweise in der Embryonalentwicklung (Risau 1997).

3.4.2. Extrinsische Vaskularisierung

Der Begriff extrinsische Vaskularisierung wurde erstmals 2002 von Cassell beschrieben. Es handelt sich hierbei um Gefäße, die von außen aus dem umliegenden Gewebe in das gezüchtete Gewebetransplantat einwandern. Es ist eine häufig angewandte Vaskularisierungsmethode im Tissue Engineering (Cassell et al. 2002). Hierfür ist es vor allem wichtig, dass das Gewebekonstrukt *in vivo* in einer stark vaskularisierten Umgebung platziert wird. Es gibt eine Auswahl an Geweben, die gut durchblutet sind und bei denen bereits eine Implantation von Konstrukten zum Züchten von neuem Gewebe

erfolgreich durchgeführt wurde. Beispiele dafür sind subkutanes Gewebe (Kneser et al. 2005), muskuläres Gewebe (Beier et al. 2004) oder intraabdominales Fettgewebe (Kneser et al. 1999). Die Angiogenese wird bei dieser Methode durch das Setzen eines Gewebedefekts und die daraus resultierende Entzündungsreaktion angeregt, welches beides zur Hypoxie führt. Zusammen mit dem hypoxischen konstruierten Gewebeimplantat kommt es zur Freisetzung von endogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF, welches durch die Freisetzung von HIF-1 α (Shweiki et al. 1992; Eckert et al. 2012) stimuliert und reguliert wird. VEGF stimuliert unter anderem Endothelzellen zur Proliferation und damit die Bildung von neuen Gefäßen. Für diesen Prozess ist VEGF essentiell. HIF-1 α spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellantwort auf Sauerstoffmangel, da es unter hypoxischen Gegebenheiten die Freisetzung von VEGF und auch Erythropoetin induziert (Forsythe et al. 1996). Die Vaskularisierung kann noch verbessert werden durch das Einbeziehen von diesen oder anderen angiogenetischen exogenen Wachstumsfaktoren in den Versuchsaufbau. Arkudas et al. untersuchten den Einfluss von VEGF und bFGF (basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor) in einer Fibrin-Matrix im Subkutan-Modell der Ratte und konnten zeigen, dass VEGF und bFGF die Angiogenese stimulieren (Arkudas et al. 2009).

Weiterhin fördern angiogenetisch wirksame Zellen, wie beispielsweise MSCs, und Biomaterialien, die u.a. durch ihre Porosität das Einwachsen der Gefäße erleichtern, eine schnelle Vaskularisierung (Cassell et al. 2002).

Trotz aller Fortschritte in den vergangenen Jahren ist die extrinsische Vaskularisierung mit einigen Nachteilen verbunden. Hauptsächlich problematisch ist das Fehlen eines axialen Anschlussgefäßes, sodass das Gewebekonstrukt nicht mikrochirurgisch transplantiert werden kann. Hinzu kommt, dass die Zellen vor der Implantation in das Konstrukt integriert werden, sodass sie anfangs durch Diffusion ernährt werden, was wiederum größenlimitierend für das Konstrukt ist (Cassell et al. 2002). Außerdem kommt es im Rahmen der natürlichen Wundheilung zur Narbenbildung durch den fibrösen Umbau des Gewebes. Das Narbengewebe kann die zur Förderung der Angiogenese beigefügten Zellen daran hindern zu migrieren und die gewebespezifischen Zellen überwuchern. Damit kann es den Platz für das eigentlich gewünschte Gewebe einnehmen (Wake et al. 1994; Cassell et al.

2002). Bei der klinischen Anwendung kommt limitierend dazu, dass das Defektgebiet meistens schlecht durchblutet ist, beispielsweise durch eine vorangegangene Bestrahlung, Trauma oder Nekrosen (Lokmic und Mitchell 2008).

Um die häufig großen Defekte zu rekonstruieren ist diese Methode daher nicht geeignet. Man benötigt vielmehr ein axiales Gefäß, das vorzugsweise vor der Implantation bereits ein mikrovaskuläres Gefäßnetzwerk in dem konstruierten Gewebe ausgebildet hat.

3.4.3. Intrinsische Vaskularisierung

Bei der Methode intrinsischen Vaskularisierung wird genau das berücksichtigt, indem das durch das Tissue Engineering hergestellte Gewebe mit einem axialen Gefäßsystem versetzt wird (Cassell et al. 2002). Wie der Begriff „intrinsische Vaskularisierung“ bereits suggeriert, entstehen hier die neuen Gefäße aus einem bereits im Konstrukt liegenden axialen Gefäß. Anfänglich wurden ganze Organe *in vitro* in einem geschlossenen Perfusionssystem gezüchtet, in dem durch Durchfluss von Medium die Zellen ernährt und durch die Zusammensetzung des Mediums und mechanische Kräfte die Zellen beeinflusst wurden (Langer und Vacanti 1993). Man geht davon aus, dass man in Zukunft diese Organkonstrukte mit einem axialen Gefäßsystem *in vitro* herstellen kann (Cassell et al. 2002; L'Heureux et al. 1998).

Eine andere Möglichkeit ist es, ein axiales autologes Gefäß chirurgisch durch das Konstrukt zu legen. Es gibt allerdings auch schon Modelle, in denen künstliche oder artifizielle gezüchtete Gefäße benutzt werden. Dies geschieht *in vivo*. Ein Modell ist das AV-Bündel (arteriovenöses Gefäßbündel). Dieses Modell besteht aus einer Arterie mit zugehöriger Vene, welche in eine Matrix gelegt und am distalen Ende ligiert werden, so dass ein Konstrukt mit axialem Gefäßstil fabriziert wird (Ismail et al. 2017). Das vielversprechendste Modell hinsichtlich des Volumens der neu-formierten Gefäße und des Volumens des bioartifiziellen Gewebes ist die arteriovenöse Gefäßschleife (AV-Loop) (Tanaka et al. 2003). Die oben genannten Modelle basieren alle auf dem mikrochirurgischen Anastomosieren von dem axialen Gefäßstiel des Konstruktes und den Empfängergefäßen, welches den Vorteil hat, dass das

Konstrukt mikrochirurgisch transplantiert werden kann. Dies ermöglicht das Generieren des Gewebes an einer defektfernen Körperstelle.

3.4.4. AV-Loop-Modell

Das AV-Loop Modell wurde erstmals 1979 von Erol und Spira beschrieben (Erol und Spira 1979). Sie haben die A. femoralis mit der V. femoralis in der Leiste von Ratten auf vier verschiedene Arten anastomosiert und so arteriovenöse Schleifen geschaffen. Daraufhin haben sie ein Hauttransplantat auf die Gefäßschleife gelegt und konnten zeigen, dass von dem AV-Loop Gefäße ausgesprossen und in das darüber liegende Hauttransplantat eingewachsen sind. Weiterhin haben sie beobachtet, dass sich um die Schleife und die Gefäße eine bindegewebige Kapsel gebildet hat, so dass ein vaskularisierter eigenständiger Gewebsblock entstand, der einem Insellappen gleicht (Erol und Spira 1979).

Tanaka et al. haben das AV-Loop Modell dann weiterentwickelt. Sie erstellen den AV-Loop zwischen der A. femoralis und V. femoralis in männlichen Sprague Dawley Ratten mittels eines Veneninterponats der V. femoralis der Gegenseite und vergrößerten die Schleife dadurch. Außerdem zeigten sie in ihrem Versuch, dass auch artifizielle Haut vaskularisiert werden konnte und bahnten so den Weg, das Modell in weiteren Versuchen zur Erforschung von Biomaterialien anzuwenden. Sie waren auch die Ersten, die eine Kammer in den Versuchsaufbau integrierten, diese war zylindrisch und aus Polyesterkarbonat hergestellt. Dadurch entstand ein abgeschlossenes System, in dem der AV-Loop unabhängig von extrinsischen Einflüssen beobachtet werden konnte (Tanaka et al. 2000).

Mian et al. konnten am Modell des AV-Loops in einer Plastikkammer zeigen, dass sich ohne weitere Bestandteile in der Kammer vaskularisiertes Gewebe aus den Loop-Gefäßen und deren Adventitia nach 12 Wochen bildete (Mian et al. 2000).

Cassel et al. untersuchten 2001, wie sich die Gefäßbildung im AV-Loop Modell in Verbindung mit verschiedenen Biomaterialien auswirkt. Sie benutzen Polylactid-D,L-co-Glycolid Säure (PLGA), Matrigel und Fibrin und konnten zeigen, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe, deren Kammer nur die AV-Fistel enthielt, sich in den mit Biomaterial gefüllten Kammern signifikant mehr Gefäße und Bindegewebe gebildet hatten. PLGA und Matrigel erwiesen sich in dieser Studie als besser geeignet im Vergleich zu Fibrin (Cassell et al. 2001).

Hofer et al. konnten 2003 zeigen, dass sich durch größere mit PLGA gefüllte Kammern mehr Gewebe bildete. Dadurch eröffneten sie, dass das AV-Loop Modell das Potential für die Herstellung von großen vaskularisierten Gewebeblöcken hat, die für das Decken von großen Defekten nötig sind und das Konstrukt nur durch das Volumen der Kammer limitiert wird (Hofer et al. 2003).

Kneser et al. ist es dann 2006 gelungen, vaskularisiertes Knochengewebe im AV-Loop Modell herzustellen, in dem sie durch bovine Knochenspongiosa (Processed bovine cancellous bone, PBCB) einen AV-Loop legten. Sie haben gezeigt, dass es möglich ist, eine poröse Hartmatrix im AV-Loop Modell zu vaskularisieren. Dies bot eine vielversprechende Möglichkeit, vaskularisiertes Knochengewebe passend für individuelle Defekte herzustellen (Kneser et al. 2006b). Im selben Jahr haben Polykandriotis et al. subkutane Vaskularisierungsmodelle mit dem AV-Loop Modell in Bezug auf die immunologische Reaktion verglichen. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Immunantwort und Fibrosierung im AV-Loop Modell im Vergleich zu Subkutanmodellen signifikant geringer ausfällt (Polykandriotis et al. 2007b).

Arkudas et al. zeigten 2007, dass das Überleben von Osteoblasten im AV-Loop Modell im Vergleich zu subkutan implantierten Kammern signifikant erhöht ist. Vereinzelt wurde hier sogar Knochenbildung beobachtet. Auch hier wurde das Biomaterial PBCB verwendet. In dieser Studie kam es allerdings im Vergleich zu der oben genannten Studie von Kneser et al. (Kneser et al. 2006b) zu einer vermehrten Fremdkörperreaktion (Arkudas et al. 2007a).

All diese Studien zeigen, dass das AV-Loop Modell für das Tissue Engineering geeignet ist. Das AV-Loop Modell hat sich hinsichtlich der Kapillar- und Gewebekonstruktion, dem AV Gefäßbündel als überlegen erwiesen (Tanaka et al. 2003). Das AV-Loop Modell zeigte eine gute klinische Anwendbarkeit aufgrund der geringen Hebmorbidity (Horch et al. 2014) und der Möglichkeit das Konstrukt mikrochirurgisch zu transplantieren.

4. Ziele der Studie

Um artifiziell generierten Knochen herzustellen, wird eine optimale Zusammensetzung von Biomaterial, Zellen und Vaskularisierungsmodell benötigt. Sowohl ADA-GEL, als auch MSCs und das Modell der arteriovenösen Gefäßschleife haben sich in vorangegangenen Studien als vielversprechend erwiesen. Die Kombination aller drei Faktoren hinsichtlich des Angiogenesepotentials wurde bisher noch nicht untersucht.

Nun soll die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen beantworten:

- Können MSCs die Aussprossung neuer Blutgefäße im Modell der arteriovenösen Gefäßschleife in der Ratte stimulieren?
- Wie wirken sich die in Mikrokapseln eingeschlossenen MSCs auf die Biodegradation von ADA-GEL im Modell der arteriovenösen Gefäßschleife aus?
- Haben MSCs in Kombination mit ADA-GEL eine immunmodulatorische Wirkung?
- Kann die Entstehung von de-novo Knochengewebe nach vier Wochen in diesem Modell beobachtet werden?

5. Material und Methoden

5.1. Versuchsdesign

Für das Experiment wurden insgesamt 18 syngene männliche Lewis Ratten (Charles River Labor, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Bei allen Ratten wurden von derselben Chirurgin (L. Fischer) in den linken Leisten die arteriovenösen Gefäßschleifen (AV Loop) angelegt. Hierfür wurde zwischen der linken A. femoralis und der linken V. femoralis ein venöses Interponat aus der kontralateralen V. femoralis mikrochirurgisch eingesetzt.

In der Gruppe A (n = 8 Tiere) wurde der AV Loop dann in eine mit ADA-GEL Mikrokapseln gefüllte Teflon-Kammer gelegt, auf die Oberschenkelmuskulatur genäht und die Haut mit einer Hautnaht verschlossen.

In Gruppe B (n = 10 Tiere) wurde der AV Loop ebenfalls in eine Teflon-Kammer gelegt, allerdings waren hier in den ADA-GEL Mikrokapseln 2×10^6 MSCs/mL eingeschlossen (Tabelle 1).

Der Explantationszeitpunkt war bei allen Tieren vier Wochen nach der Implantation.

Nach Perfusion mit Microfil® (Flow Tech Inc., Carver, USA) wurden die Konstrukte en-bloc explantiert, gewogen, in Formalin fixiert und komplett im μ CT (Skyscan, Kontich, Belgien) gescannt und analysiert. Anschließend erfolgte eine histologische Auswertung.

Versuchsaufbau	Explantationzeitpunkt nach 4 Wochen
Gruppe A	ADA-GEL ohne MSCs
Gruppe B	ADA-GEL mit MSCs

Tabelle 1: Versuchsaufbau

5.2. Zellkultur

5.2.1. Zellisolierung

Die Zellisolationen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Es wurden männliche syngene Lewis Ratten als Spendertiere verwendet, um aus dem Knochenmark

des Femurs mesenchymale Stammzellen zu isolieren. Das Leben der Ratten wurde in tiefer Narkose durch die Injektion von T61 beendet. Anschließend wurde ein Hautschnitt in der Leistenregion gesetzt und das Femur aufgesucht. Dann wurde der Knochen mit einer Schere am Schenkelhals und proximal des Kniegelenkes durchtrennt. Das nun sichtbare Knochenmark wurde mit einer Spritze und einer Kanüle mit PBS und Fötalem Kälberserum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) aus dem Markraum gespült und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium = DMEM; Gibco Invitrogen, Paisley, Scotland) 20% FCS (Fetales Kälberserum, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) + 1% Penicillin-Streptomycin = Pen-Strept; Gibco Invitrogen, Paisley, Scotland + 1% L-Glutamin; Sigma-Aldrich, Schnelldorf) resuspendiert. Nach der Filtration mit einem 100 µm Zellsieb (BD™, Heidelberg, Germany) wurde die monozytäre Zellphase durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque® (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) separiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 150 cm² Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 2,0 x 10⁶ pro cm² ausgesiedelt. Die Kulturflaschen wurden daraufhin bei +37 °C und 5% CO₂ in einem Zellkultur-Brutschrank gelagert. Nach 48 Stunden wurde das Nährmedium zum ersten Mal gewechselt und die Zellen, die nicht adhären waren, ausgewaschen. Um hämatopoetische Zellen und Erythrozyten zu entfernen, wurden die Zellkulturflaschen mit PBS gespült. Danach wurde das Medium alle drei Tage gewechselt, so dass nur die gewünschten MSCs in den Kulturflaschen blieben. Die MSCs vermehrten sich innerhalb von vier Wochen stark und wurden ab ca. 80% Konfluenz passagiert (siehe auch „Passagieren von mesenchymalen Stammzellen“). Dann wurden die Zellen in weitere Kulturflaschen aufgeteilt. Nach dem Passagieren der Zellen wurden weitere 48 Stunden bis zum nächsten Wechsel des Nährmediums gewartet. Dann erfolgte der Wechsel wieder alle 72 Stunden. Der Vorgang wurde bis zur fünften Passage wiederholt. Die mesenchymalen Stammzellen zeigten stets die typische Morphologie.

5.2.2. Passagieren von MSC

Als die Konfluenz der Zellen ca. 80% betrug, erfolgte das Splitten der Zellen. Hierbei wurde das Nährmedium vollständig entfernt und die Zellkulturflasche wurde mit je 10 ml PBS zweimal gespült. Nach dem zweiten Spüldurchgang wurde die PBS-Lösung entfernt und die MSCs mit 5 ml Accutase® (PromoCell, Heidelberg, Deutschland), bestehend aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen, vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Die Zellkulturflaschen haben zum Einwirken 5 Minuten in dem Zellinkubator verbracht. Dann wurde die Accutase® mit der dreifachen Menge an Nährmedium geblockt, um die Enzymreaktion zum Stillstand zu bringen. Danach wurden die gelösten Zellen für 10 Minuten bei 1200 U/min und +4 °C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 5 ml Nährmedium resuspendiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl mit Trypan-Blau-Färbung (Trypan-Blau 0,5%, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) in der Neubauer-Zählkammer wurden die MSCs zu je $1,3 \times 10^6$ in 225 cm³ Kulturflaschen ausgesiedelt, mit Nährmedium versorgt und im Brutschrank bei +37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

5.2.3. Einfrieren von MSCs

Beim Erreichen einer 80%igen Konfluenz in der fünften Passage wurden die MSCs abgelöst und bei 1200 U/min bei +4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in FBS mit 10% DMSO resuspendiert. Ein Milliliter dieser Suspension wurde in ein Kryoröhrchen gefüllt und langsam mithilfe eines Mr. Frosty (Nalgene®, Langenselbold, Deutschland) bis zu -80 °C eingefroren.

5.2.4. Auftauen von MSC

Fünf Tage bevor die Zellen für die Implantation benötigt wurden, wurde ein Kryoröhrchen im Wasserbad bei ca. +37 °C aufgetaut und die enthaltenen MSCs im Anschluss auf das Nährmedium ausgesät. Dabei wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens auf sechs Zellkulturflaschen aufgeteilt.

5.2.5. Fluoreszenzlabeling

Die aufgetauten Zellen wurden unmittelbar vor der Implantation mit Dil (Cell Tracker TM CM-Dil, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) markiert. Dazu wurden ca. 5×10^6 MSCs in 5 ml Nährmedium aufgenommen und mit 5 μ l Dil-Lösung versetzt. Diese Mischung wurde für 15 Minuten bei +37 °C inkubiert und anschließend bei 1200 Umdrehungen pro Minute und +4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der ersten Zentrifugation wurde das Zellpellet zwei Mal mit PBS gewaschen. Das Medium wurde dafür abgesaugt, bis das Zellpellet sauber war, mit 10 ml PBS resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 1200 U/min und +4 °C zentrifugiert.

5.3. ADA-GEL Mikrokapseln

5.3.1. Produktion von ADA-GEL

Sarker et al. haben das Protokoll für die Herstellung von ADA-GEL und der Mikrokapseln beschrieben (Sarker et al. 2014a). 5 g Natriumalginat (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) mit einem von Molekulargewicht 100 000 – 200 000 g/mol und einem Glukuronsäureanteil von 65–70% wurden in 25 ml Ethanol (VWR international, Belgien) aufgelöst und 1,605 g Natriummetaperiodat (VWR international, Belgien) wurden in 25 ml deionisiertem Wasser aufgelöst, um eine 7,5 mmol Periodat Lösung zu erhalten. Die Periodat Dispersion wurde langsam in Dunkelheit und bei Raumtemperatur und unter ständigem Rühren zu der Natriumalginat-Dispersion hinzugegeben. Nach sechs Stunden wurde die Reaktion beendet durch die Zugabe von 5 ml Ethylenglykol mit einer relativen Dichte von 1,115 (VWR international, Belgien). Die Suspension wurde gegen doppelt destilliertes Wasser (Direct-Q®, Merck Millipore, Deutschland) für sieben Tage dialysiert unter Verwendung einer Dialysemembran (MWCO: 6000–8000 Da, Spectrum Lab, USA) bis das Dialysat frei von Periodat war. Dies wurde mittels 0,5 ml Aliquot und 1% w/v Silbernitratlösung (Alfa Aesar, Ward Hill, USA) überprüft. Daraufhin wurde die ADA-Lösung eingefroren und lipophil gemacht.

5% w/v ADA Lösung wurden in PBS und doppelt destillierten Wasser aufgelöst. Ebenso wurden 5% Gelatine (Bloom 300, Type A, Schweinehaut, Sigma-Aldrich, Deutschland) in PBS und ultrapurem Wasser aufgelöst. Dies wurde langsam und unter ständigem Rühren der ADA-Lösung hinzugefügt. Das Verhältnis von Gewicht von ADA zu Gelatine war 1:1 (Sarker et al. 2014a).

5.3.2. Herstellung der Mikrokapseln

Die Mikrokapseln wurden durch pneumatische Extrusion hergestellt. Dazu wurde das Hydrogel in eine Extrusionskartusche (Nordson EFD, Westlake, USA) gefüllt und mit dem hochpräzisen Flüssigkeitsspender Ultimus V (Nordson EFD, Westlake, USA) verbunden. Dann wurden unterschiedliche Luftdrücke erzeugt (0,55 bar bis 2,5 bar) und die Mikrokapseln in einem mit Kalziumchlorid Lösung (0,1 M, VWR international, Belgien) gefülltem Becherglas gesammelt. Es wurde 10 Minuten gewartet, damit ionisches Gelieren stattfinden konnte. Anschließend wurde die Oberfläche der Mikrokapseln von der Kalziumchlorid-Lösung gereinigt. Dazu wurden sie dreimal mit ultrapurem Wasser gesiebt und gewaschen.

5.3.3. Verkapselung der MSCs

Für die Herstellung der Mikrokapseln der Gruppe B (mit MSCs) wurden die MSCs vor der pneumatischen Extrusion zum ADA-GEL hinzugegeben. Es wurden $2,0 \times 10^6$ Dil-markierte MSCs pro Milliliter ADA-GEL verwendet. Die Verkapselung und Herstellung der Mikrokapseln fanden unmittelbar vor der Implantation statt.

5.4. Teflonkammer

Die Teflonkammern wurden von Prof. Greil und Herrn Reinhardt (Department der Werkstoffwissenschaften, Institut für Glass und Keramik, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, Deutschland) hergestellt. Die Kammer war von zylindrischer Form und im Inneren hohl mit einer Höhe von

10 mm und einem Innendurchmesser von 10 mm. Der Boden war kreisförmig und hatte einen Durchmesser von 14 mm. Außerdem befanden sich an ihm zwei periphere Löcher, um die Teflonkammer an der Oberschenkelmuskelfaszie fest nähen zu können. Die Kammer wurde mit einem Deckel mit einem Innendurchmesser von 12 mm verschlossen, der nach Befüllen der Kammer mit ADA-GEL aufgesetzt wurde. Er war abgerundet und kuppelförmig, um die Haut zu schonen und eine Perforation dieser zu vermeiden. Die Kammer hatte eine 6 mm breite Öffnung, die die proximale Seite markierte und für den Durchtritt der AV-Loop Gefäße fungierte. Um eine Dislokation des AV-Loops zu vermeiden, befanden sich im Inneren der Kammer zentral gelegen vier grüne Plastikstäbe. Nach Verschließen des Deckels stellte die Öffnung an der proximalen Seite der Kammer die einzige Verbindung des Konstruktes zu dem umgebenden Gewebe dar, ansonsten war der Inhalt der Kammer von der jeweiligen Ratte isoliert.

5.5. Tiere

Alle Versuche wurden von der Ethikkommission der Universität Erlangen-Nürnberg und der Regierung von Mittelfranken, Deutschland (AZ 54-2532.1-24/09, AZ 54-2532.1-9/13-2) genehmigt.

Für die Studie wurden insgesamt 18 männliche syngene Lewis Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet mit einem Ausgangsgewicht zwischen 320 g und 470 g. Die Haltung der Tiere erfolgte in Käfigen (Eurostandard Typ III) unter standardisierten Bedingungen im Franz-Penzoldt-Zentrum der Universität Erlangen-Nürnberg.

Die Tiere hatten zu jeder Zeit Zugang zu Wasser und Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), welches mindestens zweimal pro Woche zusammen mit den Käfigen gewechselt wurde. Über den Zeitraum der Studie wurde die Luftfeuchtigkeit bei $50\% \pm 10\%$, und die Raumtemperatur bei $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Tiere waren einem zwölf Stunden Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt.

5.6. Chirurgische Eingriffe

5.6.1. Implantation

Die Anästhesie für die Implantation wurde mit einer Gasnarkose mit Isofluran (Baxter, Wien, Österreich) durchgeführt. Zuerst wurde die jeweilige Ratte für die Operation vorbereitet. Dies bestand hauptsächlich aus der Enthaarung des Operationsfeldes und Desinfektion desselbigen. Dann wurde der Hautschnitt von etwa 3 cm Länge in der medialen Femoralregion beider Beine gesetzt. Für die mikrochirurgischen Operationsschritte wurde ein Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Auf der rechten Körperseite wurde die V. femoralis frei präpariert, die Adventitia entfernt und ein etwa 1,5 cm langes Veneninterponat entnommen. Links wurden die V. und A. femoralis aufgesucht, die Gefäße proximal mit einer Mikrogefäßklemme abgeklemmt und distal durchtrennt, mit einer Heparin-Lösung (100 I.E./ml 0,9% NaCl) gespült und der distale Stumpf koaguliert. Das Veneninterponat der kontralateralen Seite wurde ebenfalls mit dieser Heparin-Lösung gespült und in retrograder Richtung angelegt. Die Gefäßlumina der Arterie und des Veneninterponats wurden dann mit einem Mikrodilatator aufgedehnt und mit einem 11-0 Nylonfaden (Ethilon, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) durch Einzelknopfnähte anastomosiert. Das dann noch freiliegende Ende des Veneninterponats wurde an die V. femoralis der linken Körperseite ebenfalls mit einem 11-0 Nylonfaden (Ethilon, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) anastomosiert, so dass eine arteriovenöse Schleife zwischen A. und V. femoralis links entstand (Abb. 1 A). Die Durchgängigkeit der Gefäßschleife und die Dichtigkeit der Anastomosen wurde dann durch Öffnen der Mikrogefäßklemme für fünf Minuten überprüft. In der Zeit wurde parallel die Teflonkammer zur Hälfte mit ADA-GEL Mikrokapseln gefüllt und auf die Muskelfaszie der Adduktoren des linken Beines gelegt (Abb. 1 B). Der AV-Loop wurde auf die Mikrokapseln gelegt und die Kammer nun vollständig gefüllt, der Deckel aufgelegt und mit nichtresorbierbarem Faden (Prolene[®], Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) verschlossen und an der Adduktorenfaszie befestigt (Abb. 1 C, D). Zuletzt wurde beidseitig die Haut mit resorbierbarem Polyglactin (Vicryl Plus[®], Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) fortlaufend in zwei Schichten genäht. Die

Subkutannaht erfolgte mit einem 4-0 Vicryl-Plus Faden, die Hautnaht erfolgte mit einer 3-0 Reverdannaht (Vicryl Plus®, Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland). Nach der Operation erhielten die Ratten gewichtsadaptiert (10 mg/kg, s.c.) Enoxaparin für zwei Tage.

5.6.2. Explantation

Nach vier Wochen wurden die Konstrukte en-bloc explantiert. Die Operationen wurden abermals in einer Isofluran Gasnarkose durchgeführt. Das Operationsgebiet wurde rasiert und desinfiziert. Daraufhin wurde ein medianer Bauchschnitt vom Processus xiphoideus bis zur Symphysis pubica gesetzt, der Bauchraum auf der gesamten Länge geöffnet und die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior auf ganzer Länge dargestellt. Um die Aorta abdominalis und um die Vena cava inferior, kaudal der prospektiven Punktionsstelle für die spätere Perfusion, wurden Ligaturen gelegt. Dann wurde eine Venenverweilkanüle (24 G, Introcane® Safety-W, Braun, Melsungen, Deutschland) in die Aorta gelegt und mittels Ligatur verschlossen. Nun wurde die Vena cava inferior kaudal der Ligatur eröffnet. Anschließend erfolgte die Spülung über die Venenverweilkanüle mit mindestens 100 ml einer auf +39°C erwärmter Ringer-Heparin-Lösung (100 IE/ml) bis klare Flüssigkeit aus der Perforationsstelle der Vena cava inferior austrat.

Zur Perfusion mit Microfil® wurden 20 ml des reinen Kontrastmittels (Microfil®, Flow Tech Inc., Carver, USA) mit 0,6 ml des zugehörigen Härters gemischt und über die Venenverweilkanüle perfundiert.

Um danach das Auslaufen des Microfils® zu verhindern, wurden die vorgelegten kaudalen Ligaturen zugezogen und die A. und V. femoralis in der Leiste ligiert. Das Tier verstarb während der Operation am Blutverlust. Bis zur Aushärtung des Kontrastmittels wurde die Ratte über Nacht bei +4 °C gelagert. Schließlich wurden die Konstrukte explantiert, in Formalin eingelegt und für die Mikrocomputer Tomographie (µCT) und die Histologie aufgearbeitet.

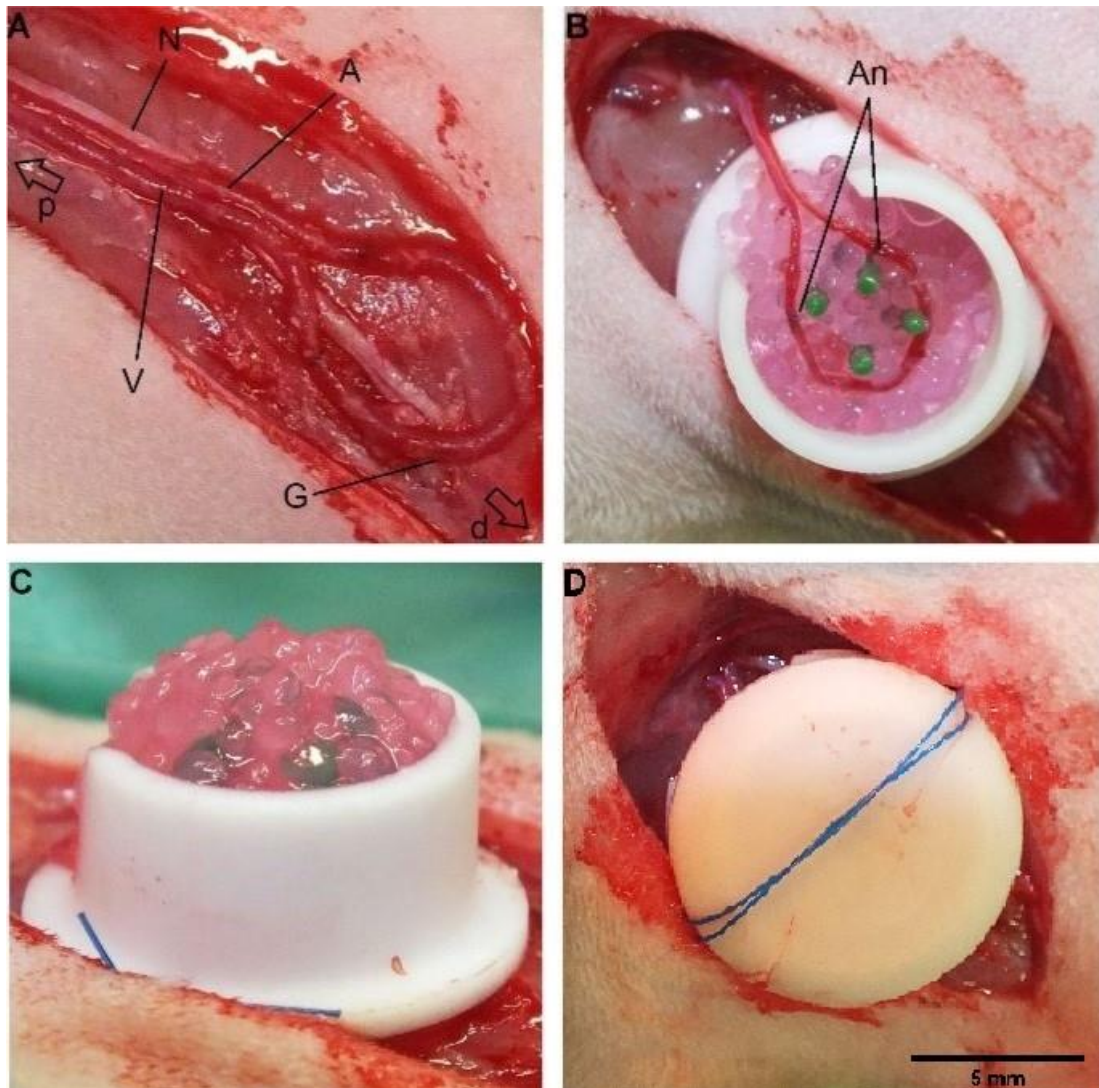


Abb. 1: Implantation der Teflon-Kammer

A: Anlage des AV-Loops an der linken A. und V. femoralis (p = proximal, d = distal; A = Arteria femoralis (ca. 0,5 mm Durchmesser); V = Vena femoralis; N = Nervus saphenus G = Veneninterponat der kontralateralen Seite) B: Implantation des AV-Loop auf ADA-GEL Mikro kapseln in der Teflonkammer (An = Anastomosen). C: Teflon-Kammer komplett mit ADA-GEL Mikro kapseln gefüllt. D: Am Ende der Implantation wird die Teflonkammer mit einem Deckel verschlossen und mit einer Naht an der Adduktorenfaszie befestigt.

5.7. Mikro-Computertomographie

Nach der Formalin-Fixierung wurde jedes AV-Loop Konstrukt am Lehrstuhl für Glas und Keramik des Departments Werkstoffwissenschaften der Universität Erlangen-Nürnberg (FAU) in einem Skyscan 1172 μ CT (Skyscan, Kontrich,

Belgien) mit einem 11 Megapixel Detektor gescannt. An der Röntgenröhre wurde eine Spannung von 80 kV angelegt und eine Stromstärke von 100 μ A. Zusätzlich wurde ein 0,5 mm Filter aus Aluminium verwendet, um die Streustrahlung von niedriger Energie (meist unter 40 kV) zu absorbieren und so Störbilder zu vermeiden. Die Rotationsstufe betrug 0,4° über 360° und die Zeit, die jede Schnittebene der Strahlung exponiert war, lag bei 445 ms. Die zufällige Bewegung lag bei 10 und die Auflösung war 8,00 μ m/Pixel.

Die Rekonstruktion der Rohdaten (Sinogramme) wurde mittels der Tomographie Software Nrecon Client und Server (Version 1.6.9. Skyscan, Kontich, Belgien) mit GPU Grafikkartenunterstützung durchgeführt. Mit der Software Amira 5.6 (FEI, Berlin, Deutschland) wurde die Separierung zwischen Material und Pore (Segmentierung) durchgeführt. Die Segmentierung erfolgte über einen globalen Schwellenwert. Um alleinig das Gefäßnetz dazustellen und die Segmente zu definieren, wurde der 3D-Bildstapel in ein Label-Image Field überführt. Das Porennetzwerk wurde über einen Skeletonisierungsalgorithmus detektiert. Dabei werden die Poren in Segmente unterteilt. Dies erfolgte durch Erstellen einer lokalen euklidischen Distanz Übersicht, indem die Struktur auf die Ideallinie geschrumpft wurde. Auf dieser Distanz Übersicht basierend konnte der Segmentdurchmesser bestimmt werden, indem er schrittweise erweitert wurde, bis der Gefäßumriss erreicht wurde.

Durch die generierten Daten der Segmente, bestehend aus Länge, Durchmesser und Volumen, von mehreren AV-Loop Konstrukten wurde eine kumulative Gefäßdurchmesser-Verteilung mit einer bestimmten Histogramm-Größe berechnet.

5.8. Histologie

5.8.1. Histologische Präparate

5.8.1.1. Formalin-Fixierung

Unmittelbar nach Explantation wurden die Konstrukte gewogen und dann in 3,5% w/v gepufferte Formalin-Lösung (aus Formalin 35% Stammlösung, Carl

Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 24 Stunden gelagert. Die Herstellung der Formalin-Lösung erfolgte mit 900 ml Aqua dest. und 100 ml Formalin 35% Stammlösung. Der pH wurde bei 7,4 eingestellt.

5.8.1.2. Dehydratation

Um die Konstrukthälften in Paraffin einbetten zu können, müssen sie vorher entwässert werden. Die Dehydratation der Konstrukte wurde mit Hypercenter XP® (Shandon, Frankfurt am Main, Deutschland) in aufsteigender Alkoholreihe durchgeführt. Der Alkohol wurde dem Konstrukt anschließend mit Xylol wieder entzogen, so dass Paraffin die freien Räume füllen konnte. Dies geschah wie folgt:

Formalin 10%	180 min	37 °C
Ethanol 70%	30 min	37 °C
Ethanol 96%	60 min	37 °C
Ethanol 100%	60 min	37 °C
Ethanol 100%	60 min	37 °C
Isopropanol 100%	60 min	37 °C
Isopropanol 100%	60 min	37 °C
Xylol 100%	60 min	37 °C
Xylol 100%	60 min	37 °C
Xylol 100%	60 min	37 °C
Paraffin	60 min	60 °C
Paraffin	60 min	60 °C

Tabelle 2: Protokoll zur Dehydratation der Konstrukte

Alle der oben aufgeführten Schritte wurden im Vakuum durchgeführt. Nach jedem Schritt fand eine zweiminütige Abtropfphase statt.

5.8.1.3. Einbetten in Paraffin

Nachdem die Konstrukthälften mit 60 °C Paraffin durchtränkt wurden, erfolgte die Einbettung mit dem Paraffin-Einbettssystem Histocenter 2[®] (Shandon, Frankfurt am Main, Deutschland), indem sie halbautomatisch in Paraffinblöcke eingebracht wurden. Dazu wurde eine Standard-Ausgießform zur Hälfte mit geschmolzenen 60 °C heißem Paraffin gefüllt und die Konstrukthälfte wurde so daraufgelegt, dass die Schnittfläche in Richtung des Bodens der Ausgießform zeigte. Dann wurde die restliche Ausgießform mit Paraffin mit einer Temperatur von ebenfalls 60 °C aufgefüllt. Schlussendlich wurden die Paraffinblöcke bei -14 °C gelagert um auszuhärten.

5.8.1.4. Histologische Schnitte

Zum Anfertigen der Schnitte wurden die Paraffin-Blöcke zuerst auf -20 °C gekühlt. Dann wurde ein Mikrotom (Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland) verwendet und auf 3 µm Dicke eingestellt. Alle Schnitte standen senkrecht zur longitudinalen Achse des Konstruktes und wurden je nach dem von welcher Hälfte sie stammten mit proximal (p) oder distal (d) gekennzeichnet. Die entstandenen Schnitte wurden mittels eines Heißwasserbades von ca. +45 °C gestreckt und mit einem Pinsel auf einen Adhäsiv-Objektträger (StarFrost[®] Adhäsiv, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und getrocknet. Die Schnittebene wurde senkrecht zur Gefäßschleife angelegt. Das Konstrukt wurde in zwei Hälften geteilt, so dass auch zwei Schnittebenen entstanden, eine proximale und eine distale. Als die proximale Hälfte wurde diejenige definiert, welche die Einmündung des AV-Loops in die Teflonkammer beinhaltete. Sie wurde mit „p“ abgekürzt. Die andere Hälfte wurde dementsprechend als distal definiert und mit „d“ abgekürzt.

5.8.2. Histologische Färbung

Von jeder Konstrukthälfte wurden sechs Schnitte auf die oben beschriebene Weise angefertigt und anschließend gefärbt.

Die Färbungen Hämatoxylin-Eosin und Masson Goldner Trichrom erfolgten nach Standardprotokoll zur morphologischen Beurteilung und histologischen

Gefäßauswertung. Die Fluoreszenzfärbung mit DAPI erfolgte ebenfalls nach Standardprotokoll zur Kontrolle des Zellüberlebens.

Weiterhin wurden immunhistochemische Färbungen mit α -smooth muscle actin (α -SMA) und Lektin zur Darstellung des Endothels durchgeführt. Außerdem wurden immunhistochemische Färbungen mit ED1 (=CD68) zur Darstellung der Immunreaktion und Hif-1 α zur Darstellung der mit Sauerstoff unterversorgten Zellen durchgeführt.

5.8.2.1. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Zur quantitativen und qualitativen Auswertung der Gefäßneubildung wurde an einem Paraffinschnitt für das distale Präparat und einem für das proximale eine Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) durchgeführt. Sie lieferte einen Überblick über den Aufbau des zu untersuchenden Gewebes. Die Färbung besteht aus zwei Komponenten: Hämatoxylin färbt basophile Bestandteile blaviolett. Basophile Bestandteile sind vor allem das Chromatin, welches in der DNS und somit vermehrt in den Zellkernen vorkommt und das endoplasmatische Retikulum. Eosin dagegen stellt azidophile Gewebsbestandteile rötlich da. Zu diesen zählen vor allem die Proteine im Zytoplasma und die meisten Interzellulärsubstanzen. Microfil[®] hingegen ist lichtundurchlässig und erscheint daher unter dem Lichtmikroskop schwarz. Dadurch entstand ein deutlicher Kontrast zwischen dem mit Microfil[®] gefüllten Gefäßlumen und dem umliegenden Gewebe. Entparaffinierung, Rehydratisierung und die nachfolgende HE-Färbung erfolgten vollautomatisiert in einem Färbeautomaten (Autostainer XL[®], Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland). Dazu wurden die Paraffinschnitte wie folgt aufgearbeitet:

Entparaffinierung	Ofen bei 60 °C	10:00 min
	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	4:00 min
	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	2:30 min
	Xylol	2:30 min

	(Merck, Darmstadt, Deutschland)	
	Isopropanolol 100% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	0:30 min
	Isopropanolol 100% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	1:00 min
	Isopropanolol 96% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	0:30 min
	Isopropanolol 96% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	0:30 min
	Isopropanolol 70% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	0:30 min
Rehydratisierung:	Leitungswasser (fließend)	0:30 min
Hämatoxylin:	Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill III (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)	1:30 min
	Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill III (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)	2:00 min
Waschen und Bläuen:	Leitungswasser (fließend)	0:10 min
	destilliertes Wasser + HCl Alkohol (hergestellt aus 24 ml HCl 25% und Isopropanolol 70% auf 1000 ml)	0:10 min
	Leitungswasser (fließend)	2:30 min
Eosin:	Eosin-Gebrauchslösung (Eosin Y Lösung alkoholisch, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 0,3 ml Eisessig 100% (Merck, Darmstadt, Deutschland)	0:20 min
Dehydratation:	Isopropanolol 70% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	0:30 min
	Isopropanolol 96% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	0:30 min
	Isopropanolol 100%	0:30 min

	(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	
	Isopropanolol 100% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	1:00 min
	Isopropanolol 100% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	1:00 min
Entziehen des Alkohols	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	0:30 min
	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	0:30 min
	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	1:00 min

Tabelle 3: Standard Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin Färbung

Danach wurden die Schnitte automatisch mit einem Eindeckgerät (Coveraid®, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) mit Deckgläschen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) abgedeckt.

5.8.2.2. Masson-Goldner-Trichromfärbung

Bei dieser Trichromfärbung werden drei Farbstoffe verwendet. Dies dient dazu die verschiedenen bindegewebigen Strukturen im Gewebe zu unterscheiden, wie beispielsweise Knochen, Muskel, Osteoid und Bindegewebe. Zum Färben der Schnitte wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Entparaffinieren:	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
Rehydrieren:	Ethanol 99% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Ethanol 96% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min

	Ethanol 70% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
Kernfärbung:	Eisenhämatoxylin nach Weigert	
	Spülen mit Aqua dest.	6 min
	Spülen mit 1 % HCL-Alkohol (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	0:30 min
	fließendes Leitungswasser	0:15 min
Färben und Beizen:	Azophloxin-Lösung aus 0,5 g Azophloxin (Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) mit 0,2 ml konzentrierter Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml Aqua dest.	5 min
	Spülen mit Essigsäure 1%	15 min
	Phosphormolybdänsäure-Orange G-Lösung aus 4 g Phosphormolybdänsäure (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) 2 g Orange G (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) in 100 ml Aqua dest.	0:15 min
	Spülen mit Essigsäure 1 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)	3 min
	Lichtgrün-Lösung aus 0,2 g Lichtgrün (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,2 ml konzentrierter Essigsäure, 100 ml Aqua dest.	0:15 min
	Spülen mit Essigsäure 1 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)	4 min
Dehydrieren:	Ethanol 96%	0:15 min

	(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	
	Ethanol 96% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	0:15 min
	Ethanol 100% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	0:15 min
	Ethanol 100% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	0:15 min
Klärung der dehydrierten Schnitte:	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	2 min

Tabelle 4: Standard Protokoll für die Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Danach wurden die Schnitte automatisch mit Hilfe eines Eindeckgeräts (Coveraid®, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) mit Deckgläschen (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versehen.

5.8.2.3. Hif-1 α Immunhistologie

Hypoxie induzierter Faktor-1 α (Hif-1 α) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Zellantwort auf Hypoxie steuert. Die immunhistochemische Darstellung des Faktors wurde mit dem untenstehenden Protokoll erreicht:

Entparaffinieren:	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
Rehydrieren:	Ethanol 99% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Ethanol 96% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min

Antigen-Demaskierung:	Kochen im Dampftopf bei 121 °C	1 min
	Abkühlen	30 min
	Einlegen in TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
Minimierung unspezifischer Bindungen:	Blocking-Solution (AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)	5 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
Minimierung unspezifischer Bindungen:	Blocking-Solution (AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)	5 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 min
	Rodentblock	30 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 min
Primär Antikörper:	Anti-Hif-1α (NB 100-123) (Novus Biologicals AB) Mit Maus-Überstand 1:10.000 verdünnen in Antikörperverdünnung 200 µl	Über Nacht
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	2 x 5 min
	0,1 % Tween® 20 (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	5 min
Signalverstärkung:	PostBlock (AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)	30 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 min
Sekundärantikörper:	AP-Polymer (=Anti-Mouse / Anti-Rabbit Antikörper) (AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)	30 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
	Fast Red® (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA)	20 min
	Wässern	2 min
Gegenfärben:	Hämalaunlösung 1:10	0:35 min

	(Merck, Darmstadt, Deutschland)	
	Leitungswasser (fließend)	10 min
	Spülen mit Aqua dest.	1 min

Tabelle 5 Protokoll zur Anfertigung der Hif-1 α immunhistochemischen Färbung

Zum Schluss wurden die Objektträger mit Aquatex[®] (MERCK, Darmstadt, Deutschland) und Deckgläschen (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

5.8.2.4. ED1 Immunhistologie

ED1 (=CD68) ist ein Glykoprotein, welches in Granula im Zytoplasma von Zellen der Makrophagen-Linie zu finden ist. Dazu gehören neben den Makrophagen auch Monozyten, Riesenzellen, Osteoklasten, Kupffer-Zellen und Histiozyten. Allerdings werden die der Gewebsmakrophagen deutlich stärker angefärbt, als die der Granulozyten im peripheren Blut. Die Färbung diente bei diesem Experiment zur qualitativen Darstellung der Immunantwort auf das Konstrukt und vornehmlich zur Untersuchung der Biokompatibilität der ADA-GEL Matrix. Es wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Entparaffinieren:	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
Rehydrieren	Ethanol 96% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Ethanol 80% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Ethanol 70% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
Antigen-Demaskierung:	Kochen im Dampftopf bei 121 °C	1 min

	Abkühlen	20 min
Minimierung unspezifischer Bindungen:	Blocking-Solution (AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)	5 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
Primärantikörper:	monoklonaler Maus-anti-Ratte CD68-Primärantikörper (Mouse anti-Rat CD68, MorphoSys UK Ltd t/a AbD Serotec, Oxford, England) 1:300 verdünnt mit Albumin bei 4 °C (Albumin from bovine serum, Sigma Chemical Co, Saint Louis, USA)	840 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
Signalverstärkung:	PostBlock (AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)	30 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
Sekundärantikörper:	AP-Polymer (=Anti-Mouse / Anti-Rabbit Antikörper) (AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)	30 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
	Fast Red® (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA)	20 min
	Wässern	2 min
Gegenfärben:	Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)	0:35 min
	Leitungswasser (fließend)	10 min

Tabelle 6 Protokoll zur Anfertigung der ED1 immunhistochemischen Färbung

Danach wurden die Objektträger mit Aquatex® (MERCK, Darmstadt, Deutschland) und Deckgläschen (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

5.8.2.5. Lektinfärbung

Bei Lektinen handelt es sich um Proteine, die Kohlenhydrate binden. Es gibt natürlicherweise eine große Varietät von Lektinen aus unterschiedlichen Zusammensetzungen und mit unterschiedlichsten Funktionen. Bei der in dieser Studie verwendeten Lektinfärbung handelt es sich um ein etabliertes Verfahren, um im Gewebe bestimmte an Proteine gebundene Zucker nachzuweisen und dient dazu die Endothelzellen anzufärben. Es wurde Isolectin B4 Biotin labeled von *Bandeiraea simplicifolia* (Sigma, Saint-Louis, USA) verwendet, welches spezifisch an α -Galactose bindet. Die Schnitte wurde nach dem folgenden Schema bearbeitet:

Entparaffinieren:	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
Rehydrieren:	Ethanol 96% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Ethanol 80% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Ethanol 70% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
Antigen-Demaskierung:	Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) im Dampftopf (Dako) bei 121 °C	1 min
	Abkühlen	20 min
Peroxidase-Block (zur Inhibierung der endogenen Peroxidase):	Wasserstoffperoxid-Lösung, 3%	10 min
Absättigung unspezifischer Bindungsstellen:	Avidin-Lösung (Avidin/Biotin Blocking Kit®, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)	15 min

	Biotin-Lösung (Avidin/Biotin Blocking Kit®, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)	15 min
Serum-Block (Inhibierung stark geladener Kollagen- und Bindegewebelemente):	10 % Goat-Normalserum (Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)	30 min
	Abkippen	0:05 min
Antikörperbindung:	Inkubation mit biotinyliertem Isolectin B4 (BSI-B4) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA) 1:260 verdünnt mit TBS-Puffer (pH 7,4) bei 4 °C	840 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4) und 0,1 % Tween® 20 (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	5 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4) und 0,1 % Tween® 20 (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	5 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4) und 0,1 % Tween® 20 (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	5 min
	StreptABComplex/HRP-Detektionssystem (StreptABComplex/HRP, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland)	30 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
	Substrat-Chromogen-Lösung Liquid DAB+ (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland)	10 min
	Waschen unter Leitungswasser	3 min
Gegenfärben:	Hämalaunlösung	0:35 min

	(Merck, Darmstadt, Deutschland)	
	Leitungswasser (fließend)	10 min

Tabelle 7 Protokoll zur Anfertigung der Lektin immunhistochemischen Färbung

Danach wurden die Objektträger mit Aquatex® (MERCK, Darmstadt, Deutschland) und Deckgläschen (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

5.8.2.6. α -smooth-muscle-actin (ASMA)

Diese immunhistochemische Färbung färbt glattmuskuläres Aktin (α -smooth muscle actin = ASMA) an, welches vor allem in glatten Gefäßmuskelzellen vorkommt. Dadurch dient sie der Lokalisation und Quantifizierung der Gefäße. Für die immunhistochemische Färbung wurde eine indirekte Polymer-Technik angewandt, wobei alle Schritte per Hand mit Hilfe des Enzym-Polymer-Detektionssystems ZytoChem-Plus AP Polymer-Kit® (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland) durchgeführt wurden, wie es in der folgenden Tabelle beschrieben ist:

Entparaffinieren:	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
Rehydrieren:	Ethanol 96% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Ethanol 80% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Ethanol 70% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
Antigen-Demaskierung:	Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) im Dampftopf bei 121 °C	1 min

	Abkühlen	20 min
Minimierung unspezifischer Bindungen:	Blocking-Solution (AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)	5 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
Primärantikörper:	monoklonaler Maus-anti-ASMA-Primärantikörper (Mouse anti-Actin, smooth muscle, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland) 1:300 verdünnt mit Albumin bei 4 °C (Albumin from bovine serum, Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA)	840 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
Signalverstärkung:	PostBlock (AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)	30 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
Sekundärantikörper:	AP-Polymer (Anti Mouse / Anti Rabbit Antikörper) (AP Polymer-Kit®, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)	30 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH 7,4)	5 min
	Fast Red® (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA)	20 min
	Wässern	2 min
Gegenfärben:	Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)	0:35 min
	Leitungswasser (fließend)	10 min

Tabelle 8 Protokoll zur Anfertigung der ASMA immunhistochemischen Färbung

Anschließend wurden die Objektträger mit Aquatex® (MERCK, Darmstadt, Deutschland) und Deckgläschen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

5.8.2.7. DAPI und Dil Fluoreszenz-Färbungen

Die DAPI Fluoreszenz-Färbung wurde bei allen MSC enthaltenden Präparaten (Gruppe B) durchgeführt. Sie markiert die Zellkerne lebender Zellen und lässt die vitalen Zellen dadurch im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge des Lichtes von 360 – 370 nm blau leuchten. Dahingegen leuchten die mit Dil markierten MSCs bei einer Wellenlänge von 530-550 nm rot.

Zur Herstellung des TBS-Puffers wurden 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Merck, Darmstadt, Deutschland), 140 mM Natrium-Chlorid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 1 L Aqua dest. benutzt bei einem pH-Wert von 8,0. Die Aufarbeitung und Färbung dieser Präparate wurden abgedunkelt und wie folgt durchgeführt:

Entparaffinieren:	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
	Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 min
Rehydrieren:	Ethanol 96% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Ethanol 80% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Ethanol 70% (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)	3 min
	Spülen mit TBS-Puffer (pH: 8)	0:05 min
Kernfärbung:	DAPI (=Diamidine-phenylindole-dihydrochloride) (Applied Science/Roche, Indianapolis, USA) 1:1000 in Aqua bidest. (Millipore)	5 min
	Waschen mit Aqua bidest. (Millipore)	0:15 min

Tabelle 9 Protokoll zur Anfertigung der DAPI immunfluoreszenz Färbung

Zuletzt wurden Objektträger mit Fluoprep® (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) und Deckgläschen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt. Sie wurden weiterhin im Dunkeln gelagert.

5.8.3. Histologische Auswertung

5.8.3.1. Lichtmikroskopie

Die histologischen Präparate der HE-Färbung wurden alle mit einem Olympus IX81 Mikroskop (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) in 40-facher und 100-facher Vergrößerung untersucht. Dazu wurde die Kamera Olympus SC30 und das zum Mikroskop gehörende Software Programm CellSense Dimension (beides Mikroskop (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) benutzt. Anschließend wurden damit noch Einzelbilder erstellt und die in 40-facher Vergrößerung von der Software zu Übersichtsaufnahmen zusammengesetzt. Von den Präparaten der Gruppe B wurden ebenfalls Übersichtsaufnahmen in 40-facher Vergrößerung der Hif-1 α -Färbung erstellt. Außerdem wurden mit diesem Mikroskop in 100-facher Vergrößerung Detailaufnahmen der HE-, Masson-Goldner-Trichrom-, ED1-, Lektin- und ASMA-Färbung angefertigt.

5.8.3.2. Fluoreszenzmikroskopie

Um die MSCs zu untersuchen, wurde von allen DAPI Präparaten (Gruppe B) mit einem Leitz DMRBE Mikroskop mit einer Leica DFC420 Kamera und dem Softwareprogramm Leica Application Suite V3 (alle: Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) Fluoreszenzbilder gemacht. Dies waren pro Gesichtsfeld zwei Bilder und ein Überlagerungsbild dieser beiden (Overlays) jeweils in 100-facher Vergrößerung. Eines zeigte die blau leuchtenden DAPI gefärbten Zellkerne und wurde bei einer Wellenlänge von 360 – 370 nm aufgenommen und eines zeigte die rot leuchtenden Dil markierten MSCs und wurde bei einer Wellenlänge von 530 – 550 nm aufgenommen. Von der Software wurde dann das Overlay dieser beiden Bilder erstellt.

Bilder wurden überall dort gemacht, wo MSCs im Gesichtsfeld zu sehen waren und in peripher und zentral unterteilt. Mit Hilfe von ImageJ wurde verglichen, ob die MSCs sich eher zentral um die AV-Loop-Gefäße sammelten oder in der Peripherie angesiedelt waren. Dazu wurden die Zellen semiautomatisch ausgezählt.

5.8.3.3. Morphologische Auswertung

Die morphologische Auswertung fand mit Hilfe von ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) statt. Hierfür wurde der Umfang der Konstrukte in den Übersichtsaufnahmen der HE-Färbung ausgemessen. Dazu wurde ein Maßstab festgelegt und das Präparat manuell umrissen. Das Programm hat dann die Fläche in μm^2 des umrissenen Bereichs in μm berechnet.

5.8.3.4. Quantifizierung der Gefäße

Zur semiautomatischen Gefäßauszählung wurde in MATLAB ein Verfahren entwickelt. Dieses Verfahren konvertiert Mikroskop-Aufnahmen der mit HE gefärbten Schnitte vom RGB Farbraum in den CIELAB Farbraum. Grundlage für die Klassifizierung „Gefäße vs. Nicht-Gefäße“ ist ein Modell positiver und negativer Experten.

Nun wurde das Expertenmodell mit Informationen angereichert. Es wurde festgelegt, was der Hintergrund und was das Präparat war, dieses wurde noch umrissen. Daraufhin wurde manuell festgelegt, welche Pixelbereiche negative Werte waren, beispielsweise Zellkerne und welches die Gefäße waren und damit positive Werte enthielten. Die Ergebnisse wurden in einer binären Karte gespeichert, welche die Pixel unterteilte in Gefäß enthaltend und nicht Gefäß enthaltend. Anschließend wurden die Loop-Gefäße markiert, dies geschah automatisch und wurde manuell überprüft. Jedes Gefäß wurde dem ihm am nächsten liegenden Loop-Gefäß zugeteilt. Dabei wurden die Gefäße von der Bilddomäne in eine auf Vektoren basierende geometrische zweidimensionale Darstellung überführt. Diese bestand nur aus dem Gefäßzentrum und seinem Radius.

5.8.3.5. Auswertung der Zellen

Die MSCs wurden mit Hilfe von ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) semiautomatisch quantifiziert. Es wurden die Einzelbilder der Fluoreszenzfärbung, welche nur die rot leuchtenden MSCs darstellten, verwendet.

Die Hif-1 α positiven Zellen wurden ebenfalls mittels ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) semiautomatisch quantifiziert. Hierfür wurden die Übersichtsaufnahmen der Hif-1 α immunhistochemischen Färbung verwendet.

5.9. Statistik

Bei allen Ergebnissen wurde sowohl der Mittelwert, als auch die Standardabweichung (=standard deviation, SD) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Es wurde nach Überprüfung der Normalverteilung der ungepaarte Two-sample t-Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde 5% gewählt, was einem p-Wert von $<0,05$ entspricht und die Daten wurden entweder als Mittelwerte +/- der Standard Abweichung (SD) oder als Boxplot Diagramm wiedergegeben.

6. Ergebnisse

6.1. Operationsergebnisse und Makroskopische Inspektion

In Gruppe A haben alle Tiere die Operation zur Implantation der Konstrukte und den postoperativen Verlauf von vier Wochen gut toleriert. In Gruppe B ist ein Tier im postoperativen Verlauf verstorben. Weiterhin wurden zwei Tiere der Gruppe B von der Auswertung ausgeschlossen. Eines davon wurde auf Grund

eines Perfusionsfehlers und das Andere auf Grund der Dislokation der Kammer ausgeschlossen.

Außer diesen Ausnahmen gab es keine postoperativen Komplikationen und zum Explantationszeitpunkt war die Haut über den implantierten Konstrukten reizlos. Wunddehiszenzen, Infektionen oder Hämatome konnten makroskopisch nicht beobachtet werden.

Nach der Perfusion und Explantation der Konstrukte war bereits makroskopisch durch das deutlich gelbliche Microfil® in den Gefäßen eine Vaskularisierung des Kammerinhaltes erkennbar. Mikrokapseln waren auch erkennbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine komplette Degradation dieser stattgefunden hatte. Ein Unterschied zwischen Gruppe A und Gruppe B konnte qualitativ makroskopisch nicht festgestellt werden.

Wenn die Gefäßschleife thrombosiert war, so dass sie bei der Explantation nicht zu perfundieren war, wurden die Konstrukte von der Auswertung ausgeschlossen. Dies war in Gruppe A dreimal und Gruppe B zweimal der Fall, sodass letztendlich 5 Tiere beider Gruppen in der Statistik berücksichtigt wurden.

6.2. Histologische Analyse

6.2.1. HE-Färbung

Die HE-Färbung diente zum Überblick über die Vaskularisierung und der Degradation der Konstrukte (Abb. 2). Qualitativ zeigte sich die Oberfläche der Mikrokapseln in Gruppe B unregelmäßiger im Vergleich zur Gruppe A, was auf eine vermehrte Degradation der Kapseln in Gruppe B hindeutet. Dies wurde durch die Vermessung der Konstruktfläche quantifiziert (siehe 6.2.1.1). In beiden Gruppen lagen Gefäße in dem Gewebe zwischen den Mikrokapseln, jedoch nicht in den Mikrokapseln selbst (Abb. 2).

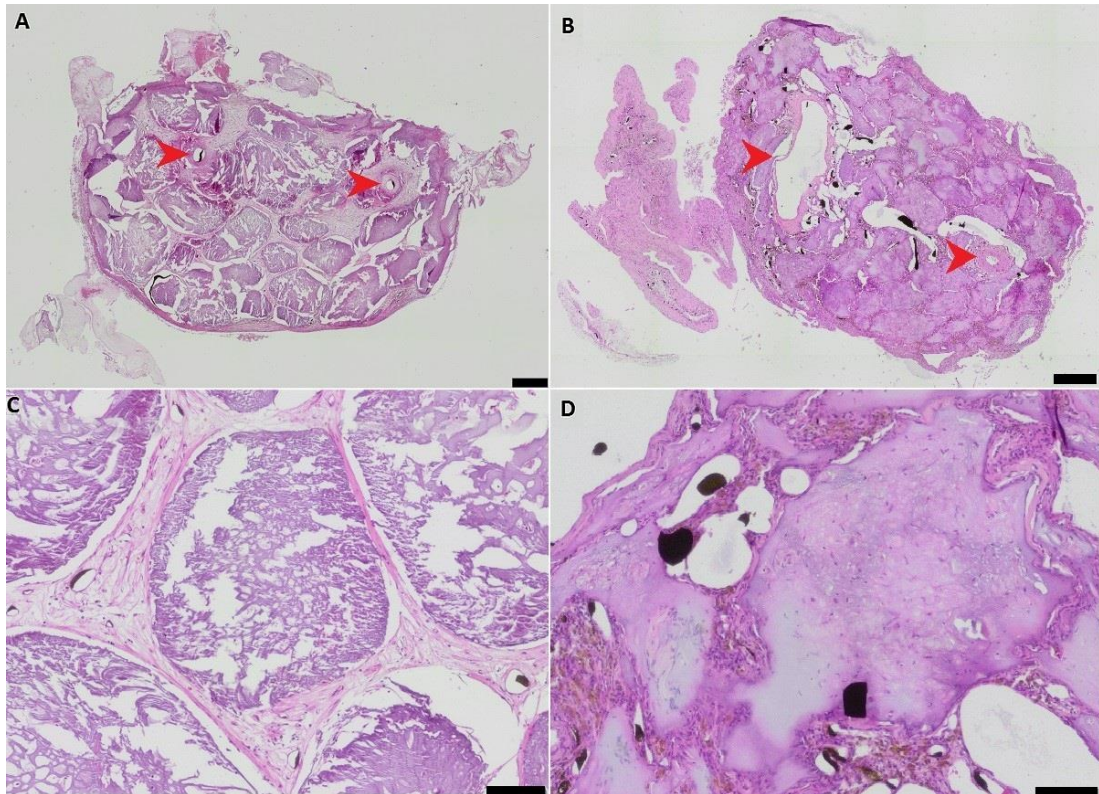


Abb. 2: Hematoxylin-Eosin Färbung mit mit 40-facher Vergrößerung (A und B, Maßstab \triangleq 500 μm) und mit 100-facher Vergrößerung (C und D, Maßstab \triangleq 100 μm).

A, C (Gruppe A, ohne MSCs): zu sehen sind Mikrokapseln mit fibrovaskulärem Bindegewebe, die Mikrokapseln sind größtenteils noch erhalten.

B, D (Gruppe B, mit MSCs): zu sehen sind Mikrokapseln mit fibrovaskulärem Bindegewebe, die eine unregelmäßigeren Aspekt als in A und C am ehesten als Hinweis auf eine vermehrte Degradation aufweisen. Die Degradation der Mikrokapseln war auch hier nicht vollständig.

Die roten Pfeile markieren den AV-Loop.

6.2.1.1. Konstruktfläche

Die mit Hilfe von ImageJ ermittelte Konstruktfläche der Gruppe mit MSCs (Gruppe B) war statistisch signifikant kleiner, als die der Gruppe ohne MSCs (Gruppe A) ($1,15 \pm 0,256 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ vs. $1,46 \pm 0,366 \times 10^7 \mu\text{m}^2$) (Abb. 3).

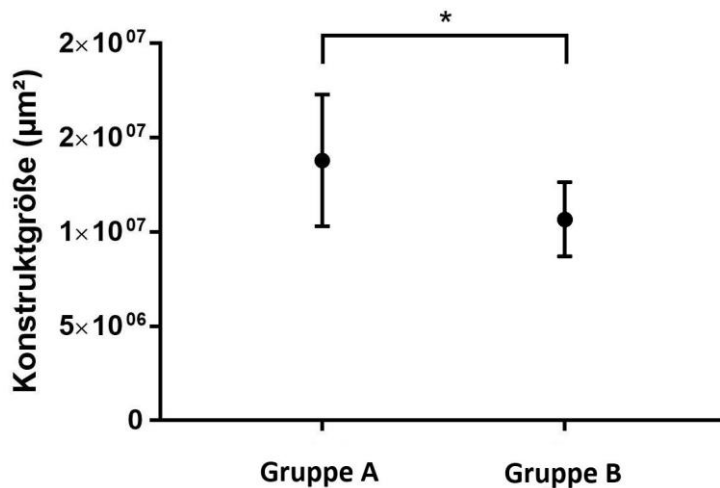


Abb. 3: Quantifizierung der Degradation mittels Querschnittsfläche der Konstrukte (* entspricht $p < 0,05$).

Konstrukte die MSCs enthielten (Gruppe B) hatten eine statistisch signifikant kleinere Querschnittsfläche im Vergleich zu Gruppe A.

6.2.2. Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Auch in der Masson-Goldner-Trichrom Färbung war fibrovaskuläres Bindegewebe zwischen den ADA-GEL Mikrokapseln beider Gruppen zu sehen. Es zeigte sich aber kein Knochengewebe (Abb. 4).

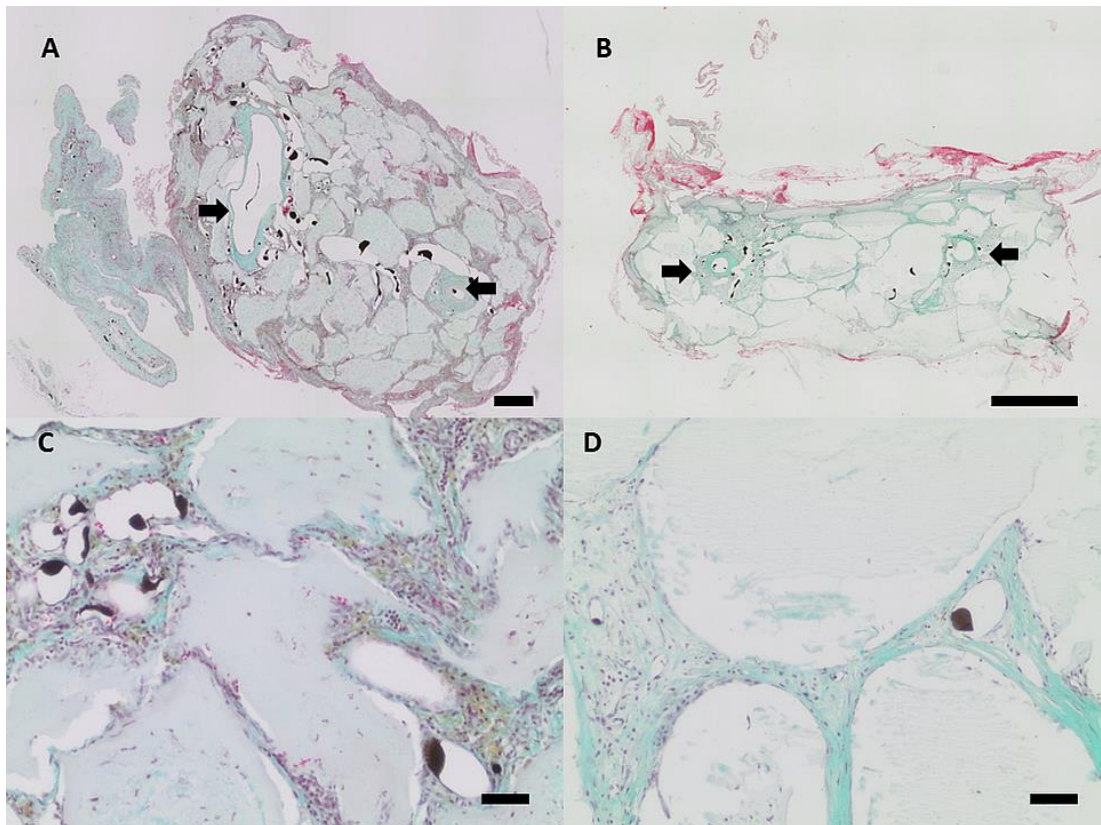


Abb. 4: Masson-Goldner-Trichrom Färbung mit 40-facher Vergrößerung (A, Maßstab \cong 500 μ m; B, Maßstab \cong 1 mm) und 100-facher Vergrößerung (C und D, Maßstab \cong 50 μ m).

A-D: Während sich vaskularisiertes Bindegewebe zwischen den Mikrokapseln nachweisen ließ, konnte kein Knochengewebe detektiert werden. Ansonsten zeigten die Ergebnisse aus der Masson-Goldner-Trichrom Färbung eine hohe Übereinstimmung mit der HE-Färbung (siehe Abb. 2).

(A, C: Gruppe B; B, D: Gruppe A, schwarze Pfeile: AV-Loop)

6.2.3. ED1 Immunhistochemische Färbung

Mittels der ED-1 Färbung konnte eine große Anzahl von Makrophagen (rot angefärbt) sowohl in der Gruppe A, als auch in der Gruppe B nachgewiesen werden, wobei diese insbesondere neu gebildeten gut vaskularisiertem Bindegewebe zwischen den einzelnen Mikrokapseln lokalisiert waren (Abb. 5). In keiner der beiden Gruppen konnten hingegen mehrkernige Riesenzellen nachgewiesen werden. Qualitativ ließ sich kein Unterschied bzgl. der Anzahl der Makrophagen zwischen Gruppe A und Gruppe B nachweisen. Ein

immunmodulatorischer Effekt durch die verkapselten MSCs konnte somit nicht belegt werden.

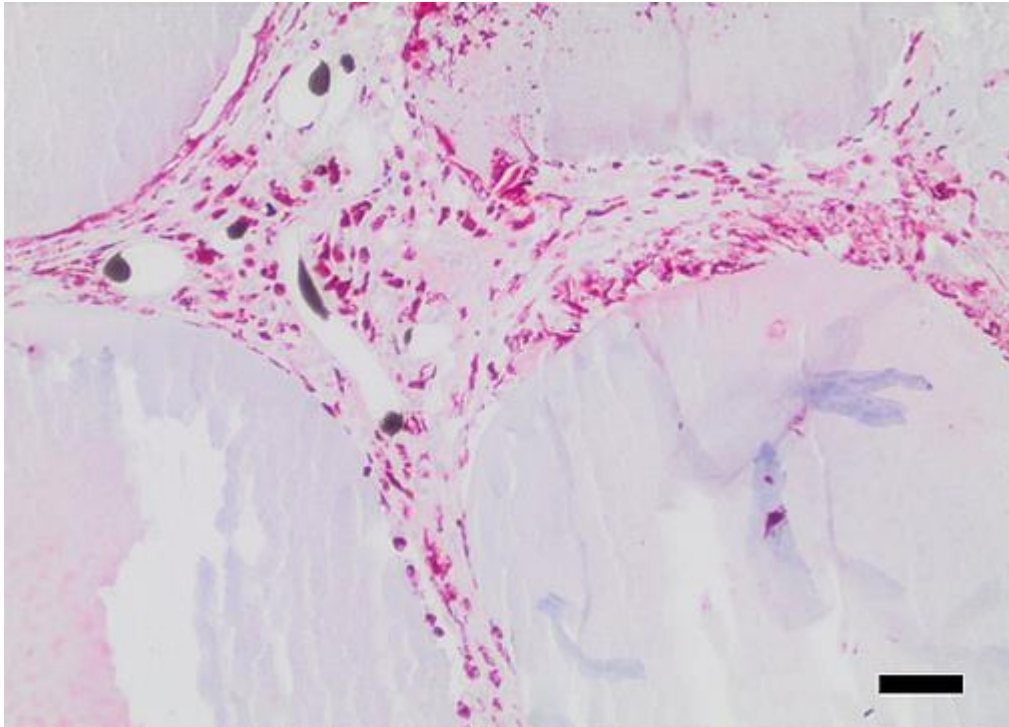


Abb. 5: Immunhistochemische ED1 Färbung (100-fache Vergrößerung; Maßstab \cong 50 μ m; Gruppe A)

Es sind vereinzelt Makrophagen, jedoch keine Riesenzellen zwischen den Kapseln zu erkennen.

6.2.4. Hif-1 α Immunhistochemische Färbung

Es gab eine Tendenz von mehr Hif-1 α positiven Zellen, welche am roten Zytoplasma zu erkennen sind (Abb. 6), in der Gruppe ohne MSCs (Gruppe A) im Vergleich zu der Gruppe mit MSCs (Gruppe B). Diese Tendenz war jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Hif-1 α positiven Zellen waren nicht in den Mikrokapseln, sondern nur im fibrovaskulären Gewebe dazwischen zu finden, dort waren sie jedoch gleichermaßen im Zentrum und in der Peripherie des Konstruktes verteilt.

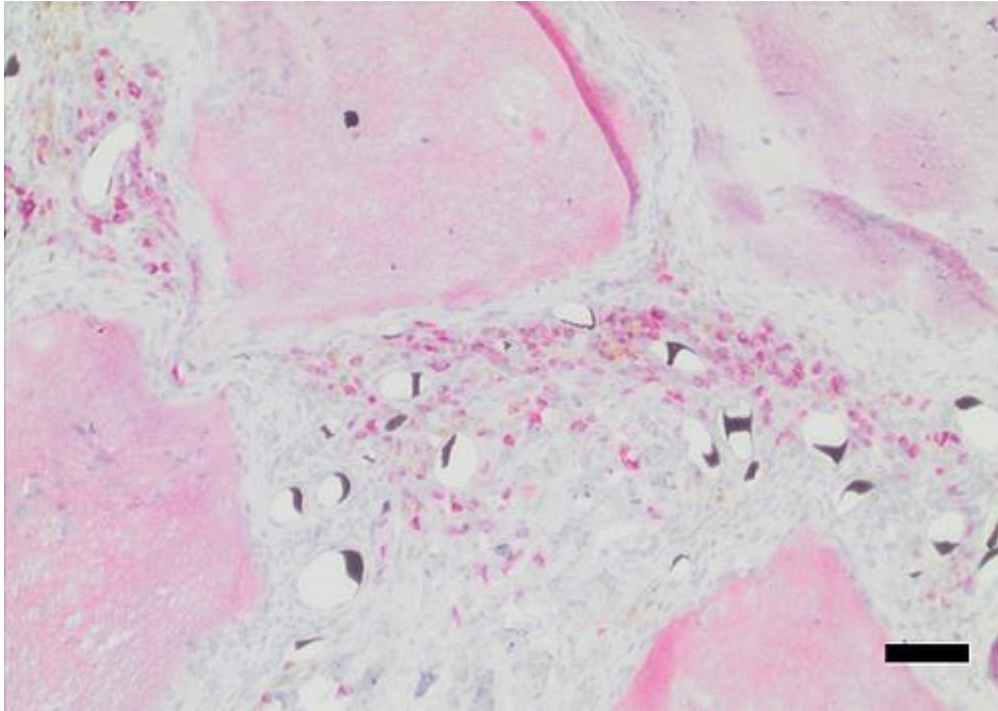


Abb. 6: Hif-1 α Färbung (100-fache Vergrößerung; Maßstab \cong 50 μ m; Gruppe B).

Hypoxie-induzierter-1 α Faktor positive Zellen (rot) sind im vaskularisierten Bindegewebe zwischen Kapseln zu sehen.

6.2.5 Lektin und ASMA Immunhistochemische Färbung

Die neuformierten Gefäße zeigten in der Lektin Färbung in 100-facher Vergrößerung Lektin-positive (bräunlich angefärbte) Endothelzellen (Abb. 7A). Gleichermäßen konnten ASMA-positive (rötlich angefärbte) glatte Gefäßmuskelzellen in den Gefäßwänden der neugebildeten Gefäße in 100-facher Vergrößerung in der ASMA Färbung nachgewiesen werden (Abb. 7B). Diese beiden Beobachtungen und die Tatsache, dass das perfundierte Microfil[®] intravasal verblieben war und nicht austrat, spricht für eine gute Gefäßintegrität dieser neu gebildeten Gefäße.

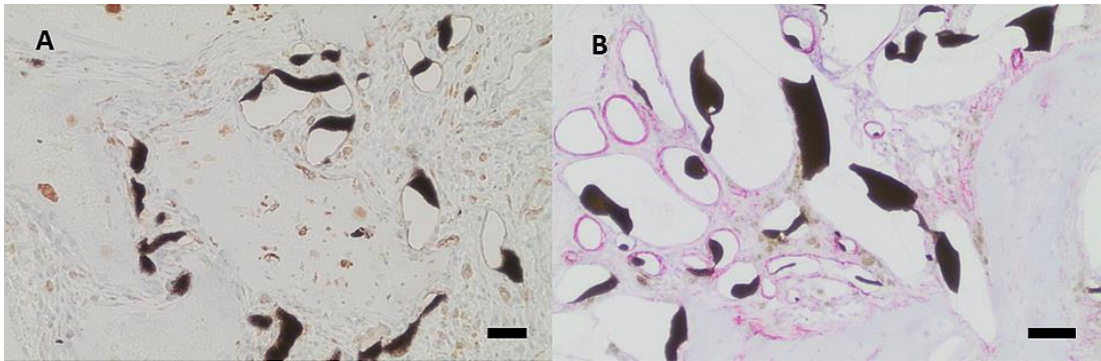


Abb. 7: Lektin (A) und ASMA (B) Färbung (100-fache Vergrößerung; Maßstab $\cong 50 \mu\text{m}$; Gruppe B).

In Abb. 7A sind Lektin positive Endothelzellen in gefäßförmiger Anordnung zu finden und in Abb. 7B sind ASMA positive glatte Gefäßmuskelzellen in Gefäßform zu finden.

6.2.6. DAPI und Dil

Die MSCs wurden vor der Verkapselung und Implantation mit Dil markiert. Diese konnten nach der Explantation nach vier Wochen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Die Dil positiven rot leuchtenden Zellen befanden sich mehrheitlich in den Mikro kapseln eingeschlossen und seltener in dem die Kapseln umschließenden Bindegewebe. In den Mikro kapseln konnten außerdem gezeigt werden, dass die Dil positiven MSCs zum Großteil auch positiv in der DAPI Färbung waren, was für die Vitalität der Zellen spricht. (Abb. 8).

Interessanterweise waren eine statistisch signifikant höhere Anzahl an MSCs in den peripheren Bereichen im Vergleich zu den zentralen Bereichen des Präparats zu finden (Abb. 9).

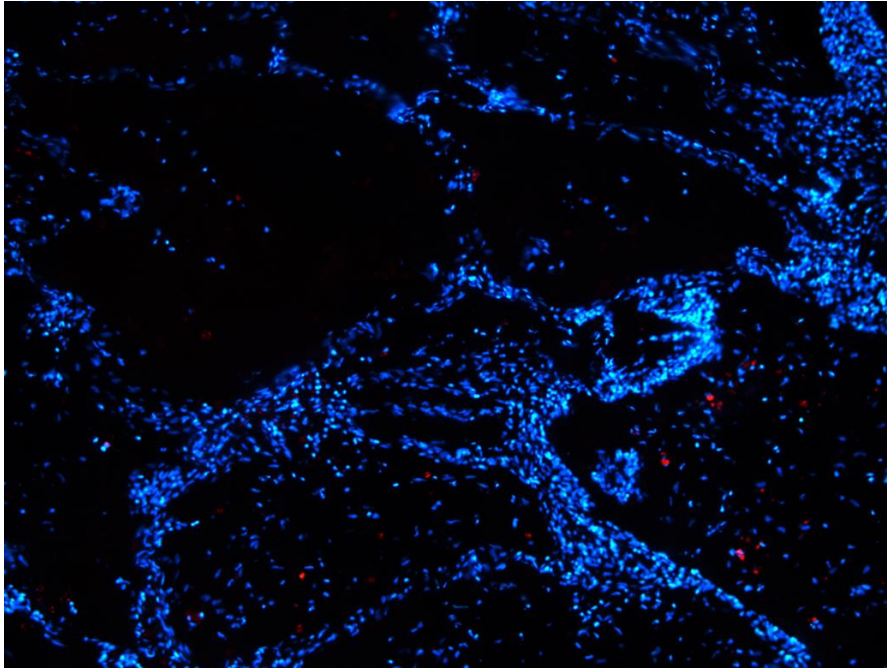


Abb. 8: Dil und DAPI Färbung (100-fache Vergrößerung; Gruppe B). Vitale MSCs sind sowohl blau als auch rot leuchtend und hier in den Kapseln und dem Bindegewebe zwischen den Kapseln zu finden.

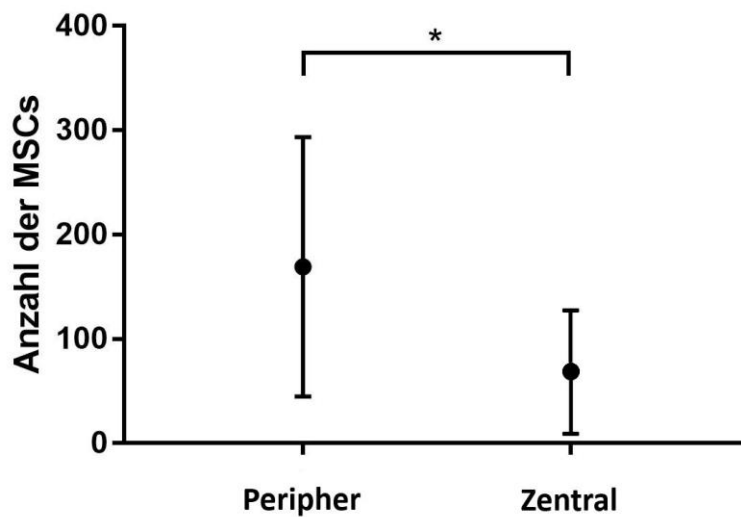


Abb. 9: Analyse der Zellverteilung in der DAPI/Dil Färbung (* entspricht $p < 0,05$).

Nach Explantation befanden sich statistisch signifikant mehr MSCs in dem peripheren Bereich der Konstrukte im Vergleich zu dem zentralen Bereich.

6.2.7. Qualitative und quantitative Auswertung der Vaskularisation

Bei allen Präparaten wurde bei 40-facher Vergrößerung untersucht, ob die Gefäße mit Microfil® gefüllt waren, um zu überprüfen, ob der AV-Loop durchgängig war. In Gruppe A zeigten 5 von 8 Konstrukten einen durchgängigen AV-Loop (Durchgängigkeitsrate 62,5%), während in Gruppe B 5 von 7 AV-Loops durchgängig waren (Durchgängigkeitsrate 71%).

Qualitativ zeigten sich in den histologischen Präparaten die Gefäße im Bindegewebe zwischen den Kapseln, nicht jedoch in den Mikrokapseln selbst. Die automatisch ausgezählte gesamte Fläche der Gruppe B (mit MSCs), die von Gefäßen eingenommen wurde, war pro Schnitt statistisch signifikant größer, als der Gruppe A (ohne MSCs) ($97859 \pm 83581 \mu\text{m}^2$ vs. $13418 \pm 11219 \mu\text{m}^2$; Abb. 10 A). Weiterhin war die Gesamtanzahl der Gefäße pro Schnitt der Gruppe B statistisch signifikant größer, als in der Gruppe A (174 ± 105 Gefäße vs. 31 ± 24 Gefäße; Abb. 10 B).

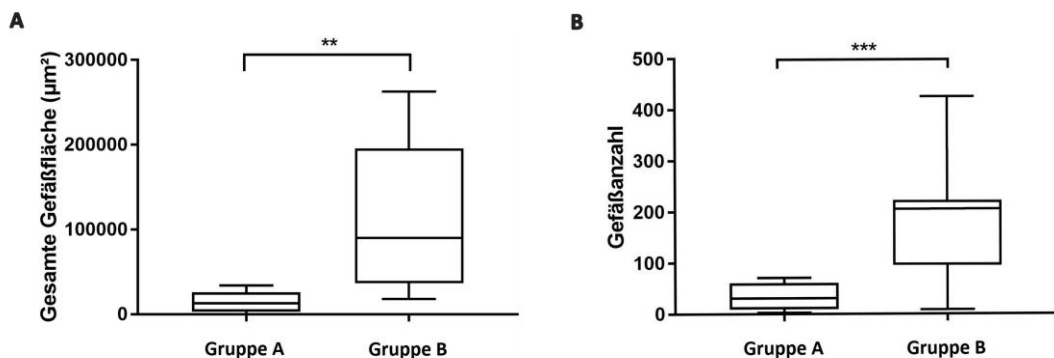


Abb. 10: Automatische Quantifizierung der Vaskularisation (** entspricht $p < 0,01$ und *** entspricht $p < 0,001$).

A: Gruppe B (mit verkapselten MSCs) zeigt eine statistisch signifikant höhere gesamte Gefäßfläche.

B: Gruppe B zeigt eine statistisch signifikant höhere Gefäßanzahl.

Die durchschnittliche Fläche pro Gefäß war in beiden Gruppen nicht statistisch signifikant unterschiedlich. In Gruppe A beträgt der Mittelwert $486,04 \mu\text{m}^2$ und die Standardabweichung $378,62 \mu\text{m}^2$, während in Gruppe B der Mittelwert $630,4 \mu\text{m}^2$ und die Standardabweichung $509,69 \mu\text{m}^2$ beträgt.

6.3. μ CT Analyse

Alle Konstrukte wurden nach der Explantation im μ CT gescannt und anschließend analysiert. Eine objektive Analyse der Gefäße erlaubt die Berechnung der kumulativen Gefäßlänge. Hierbei zeigt sich ebenfalls eine deutlich stärkere Vaskularisation in der ADA-GEL Gruppe mit MSCs ($31886 \pm 8524.5 \mu\text{m}$ vs. $20842.6 \pm 8062.7 \mu\text{m}$) (Abb. 11). Weiterhin konnte die Rate der Durchgängigkeit der AV-Loops, welche bereits in den histologischen Schnitten bestimmt worden war (Gruppe A: 5 von 8 AV-Loops durchgängig; Gruppe B: 5 von 7 AV-Loops durchgängig), bestätigt werden. Es ließ sich bereits bei den dreidimensional aufgearbeiteten Scans eine vermehrte Vaskularisierung der Konstrukte der Gruppe B im Vergleich zur Gruppe A erkennen (Abb. 12).

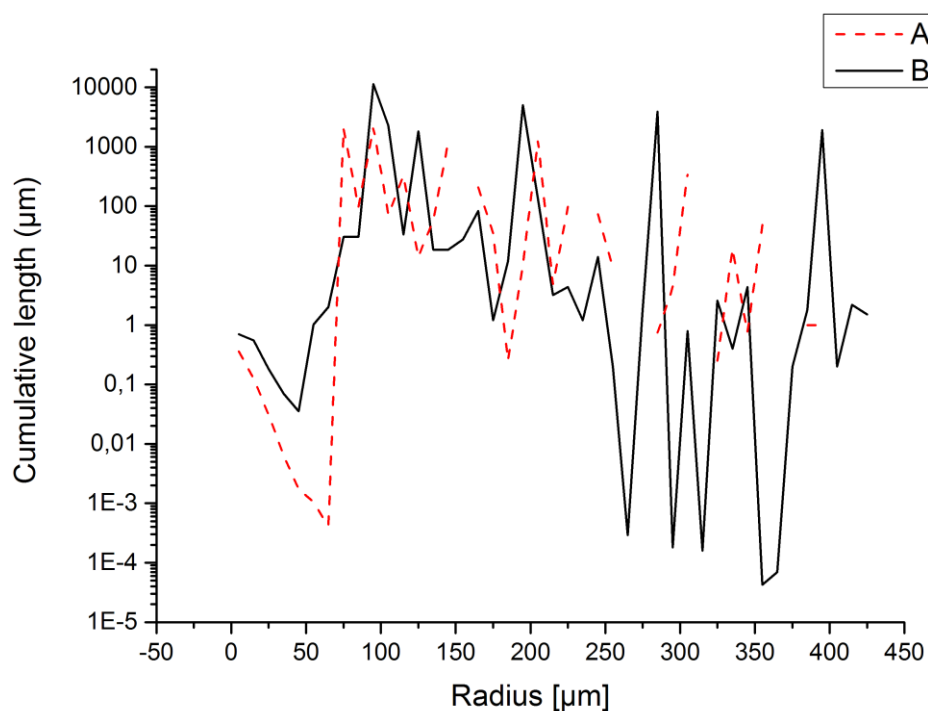


Abb. 11: Mikro-Computertomographie Auswertung

In Gruppe B, in welcher die Implantation der Mikrokapseln mit MSCs erfolgte, konnte im Vergleich zu Gruppe A (ohne MSCs) eine statistisch signifikant längere kumulative Gefäßlänge in Relation zum jeweiligen Gefäßradius festgestellt werden.

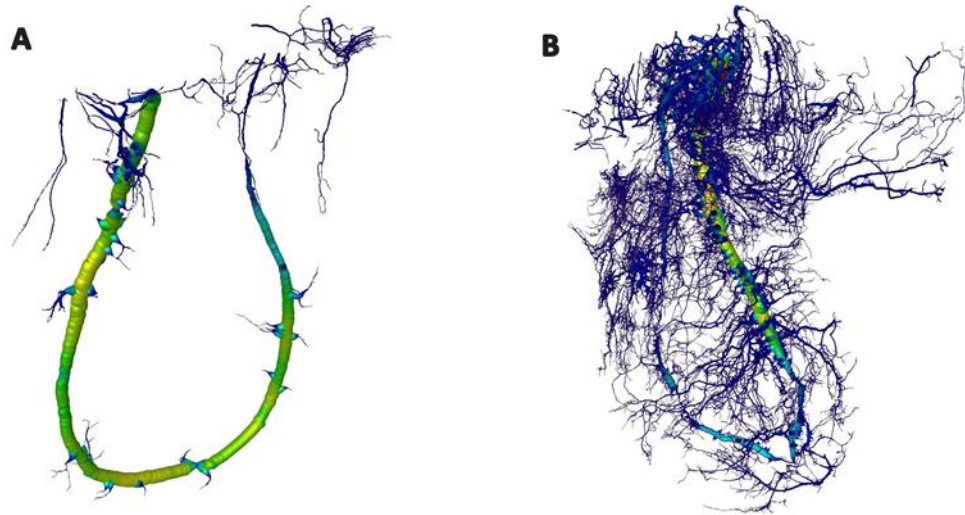


Abb. 12: Dreidimensionale Mikro-Computertomographie (μ -CT) Rekonstruktionen

Die μ -CT Rekonstruktion von dem Gefäßnetzwerk eines MSC-freien (A) und MSC-haltigen (B) Konstrukts.

7. Diskussion

7.1. Beurteilung des Vaskularisierungsmodells

Die ausreichende Vaskularisierung der Konstrukte ist eine sehr wichtige Komponente des Tissue Engineerings, um das frühzeitige Absterben der Zellen zu verhindern. Dies zeigten schon Kneser et al., indem sie PBCB (bovine Knochenspongiosa) Matrices mit Osteoblasten besiedelten. Bei insuffizienter Vaskularisierung kam es bereits nach einer Woche zu einer starken Reduktion der vitalen Osteoblasten (Kneser et al. 2006a).

Gewebe kann nur bis zu 200 μ m durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden (Folkman, J. und Hochberg, M. 1973; Colton 1995), so dass transplantierte Gewebe, die eine kritische Größe überschreiten, die an sie gestellten Anforderungen nicht dauerhaft erfüllen können und die zentral im Konstrukt liegenden Zellen absterben (Kneser et al.

1999). Folglich ist eine Prävascularisierung der Konstrukte zur Herstellung artifiziellen Gewebes unabdingbar.

Es gibt bereits einige etablierte Modelle, um artifiziell gezüchtete Gewebe oder Konstrukte des Tissue Engineering frühzeitig mit einem eigenen Gefäßnetz auszustatten. Bisher wurden vor allem Modelle der extrinsischen Vaskularisierung verwendet. Dabei findet die Vaskularisierung durch das umliegende Gewebe statt. Dieses sollte daher ein dichtes Gefäßnetz aufweisen, wie es bei subkutanen Geweben (Kneser et al. 2005), muskulären Gewebe (Beier et al. 2004) oder intraabdominalen Fettgewebe (Kneser et al. 1999) der Fall ist. In *in vivo* Modellen an diesen gut vaskularisierten (Lee et al. 2013) Geweben gesunden Tieren wurden gute Ergebnisse erzielt (Kneser et al. 2005; Kneser et al. 1999). Die extrinsische Vaskularisation ist jedoch ein langsamer Prozess, was voraussetzt, dass die Konstrukte dünn sind, um eine schnelle Vaskularisierung zu ermöglichen und so den im Konstrukt angesiedelten gewebespezifischen Zellen eine ausreichende Zufuhr an Sauerstoff und Nährstoffen zu ermöglichen (Eiselt et al. 1998; Cassell et al. 2002). Es wurden unterschiedliche Ansätze gesucht, um die Vaskularisierung zu beschleunigen, wie die Integration von Endothelzellen (Mooney und Mikos 1999) oder die Kombination mit Wachstumsfaktoren wie VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) (Moimas et al. 2015). Allerdings führte die für die Angiogenese nötige Entzündungsreaktion auch zu Narbenbildung, die wiederum die Zellproliferation der implantierten Zellen behindert (Mooney und Mikos 1999).

Meist sind die zu rekonstruierenden Gewebedefekte in der Klinik jedoch ausgedehnt und in Bereichen gelegen, in denen vorher große Tumormassen entfernt wurden, eine Bestrahlung, ein Trauma oder Infektionen vorangegangen waren. Dies bedeutet, dass die Blutversorgung regional limitiert ist. Auf Grund der limitierten Gewebedicke und der benötigten stark vaskularisierten Umgebung sind die Modelle der extrinsischen Vaskularisierung für die klinische Anwendung nicht immer geeignet.

Goldstandard in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie sind daher die Eigengewebstransplantationen mittels axial vaskularisierter Lappenplastiken, welche eine gute Vaskularisation in das geschädigte Gewebe mitbringen und so die Heilung und den Aufbau eines neuen Kapillarsystems fördern (Mimoun et al. 1989). Die Innovation neuer und die Verbesserung bestehender freier Lappenplastiken über die letzten Jahrzehnte haben es möglich gemacht, auch große Gewebsdefekte mit eingeschränkter Durchblutung zu schließen und die Körperkonturen wiederherzustellen. Der große Nachteil, den jede Technik der Lappenplastiken mit sich bringt, ist die Hebemorbidity, die sowohl das Angebot an Gewebe, als auch das Wohlergehen des Patienten einschränken kann (Polykandriotis et al. 2007b).

Ein anderer Ansatz zur Reduktion der Hebemorbidity ist die Verbindung des Tissue Engineering mit Modellen der Präfabrikation, mit dem Ziel maßgeschneiderte vaskularisierte bioartifizielle Gewebe herzustellen und diese an einen entfernten Empfängerort zu implantieren.

Die Modelle der intrinsischen Vaskularisierung in Verbindung mit dem Tissue Engineering bieten einen vielversprechenden Ansatz hinsichtlich der Vaskularisierung durch ein eigenes Gefäßsystem, welches eine kontinuierliche Blutversorgung des Konstruktes ermöglicht, und der Minimalisierung der Hebemorbidity.

Das von Erol und Spira eingeführte und von Tanaka et al. sowie Mian et al. modifizierte AV-Loop Modell hat sich bereits in einigen vorangegangenen Studien als erfolgsversprechend gezeigt (Erol und Spira 1979; Tanaka et al. 2000; Mian et al. 2000). Man versteht unter dem Begriff AV-Loop ein Modell, bei dem mikrochirurgisch zwischen einer Arterie und Vene ein Shunt mittels eines Veneninterponats erstellt wird. In den meisten experimentellen Studien, wie auch in unserer, werden dafür die Femoralgefäße der Ratte verwendet.

Es gelang mehreren Arbeitsgruppen mit Hilfe dieses Modells in der Ratte verschiedene Biomaterialien zu vaskularisieren, beispielsweise poröse Hartmatrices (Kneser et al. 2006b), Fibrin-Gel (Polykandriotis et al. 2008), HA/ β -TCP (Hydroxyapatit/beta-Trikalziumphosphat) (Buehrer et al. 2015) und 45S5 Bioglass[®] (Arkudas et al. 2013). Weiterhin hat sich das AV-Loop Modell

dadurch bewährt, dass sich ein dichtes intrinsisches Gefäßnetz aus dem Loop bildet. Man kann daher davon ausgehen, dass das präfabrizierte Gewebe durchblutet bleibt, wenn es transplantiert und im Empfängergebiet mikrochirurgisch angeschlossen wird (Polykandriotis et al. 2006).

Vermutlich beruht die Angiogenese im AV-Loop Modell auf erhöhten Scherkräften, die auf die Gefäßwände des AV-Loops einwirken und die Hypoxie der umgebenden Zellen, welches beides die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF, bFGF (basic fibroblastic growth factor) und Hif-1 α stimuliert (Henn et al. 2019). Außerdem führt das durch den chirurgischen Eingriff gesetzte Trauma zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, die über die Freisetzung von VEGF die Angiogenese stimulieren (Polykandriotis et al. 2007a). Polykandriotis et al. konnten außerdem zeigen, dass die Angiogenese größtenteils von den venösen Gefäßen der AV-Loops ausgeht (Polykandriotis et al. 2008).

Polykandriotis et al. haben gezeigt, dass die ersten beiden Wochen kritisch sind für das Zellüberleben, da in dieser Zeit die Angiogenese einsetzt und die Zellen solange nicht mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden (Polykandriotis et al. 2008). Arkudas et al. konnten zeigen, dass VEGF und bFGF (basic fibroblastic growth factor) die Angiogenese zwischen zwei und vier Wochen nach der Implantation erhöhen kann. Nach vier Wochen konnte durch die beiden Wachstumsfaktoren keine signifikant erhöhte Vaskularisierung nachgewiesen werden (Arkudas et al. 2010).

Als Alternative zum AV-Loop Modell gibt es das Modell des Gefäßbündels, bei dem eine Arterie mit zugehöriger Vene freipräpariert, in eine Matrix gelegt, am distalen Ende ligiert und mit einer Kammer vom Wirtsgewebe getrennt wird (Ismail et al. 2017). Hierdurch erhält das Konstrukt ebenfalls einen axialen Gefäßstiel und man erhoffte sich die Ausbildung eines mikrovaskulären Netzes. Das AV-Loop Modell hat sich allerdings diesem Modell hinsichtlich der Gefäßneubildung als überlegen erwiesen (Tanaka et al. 2003).

Nachteilig bei dem AV-Loop Modell sind die hohen Ansprüche an die mikrochirurgischen Fähigkeiten, die an den Operateur gestellt werden.

In der Teflon-Kammer waren die Vorgänge im Inneren der Kammer von denen des umliegenden Wirtsgewebes isoliert. Dadurch wurden standardisierte und

vergleichbare Verhältnisse geschaffen. Weitere Vorteile der Verwendung von der Teflon-Kammer beinhalten den Schutz des Kammerinhalts vor mechanischen Einflüssen und vor der Integration in das Wirtsgewebe, welches die Explantation des Konstruktes erschweren würde (Zhan et al. 2016).

Ein offenes System durch eine perforierte Kammer hat den Vorteil, dass zusätzlich eine extrinsische Vaskularisierung stattfinden kann, welche die Vaskularisierung des Konstruktes verbessern kann. Die Isolationskammer hingegen kreiert ischämische Verhältnisse in der Kammer, die wiederum die Angiogenese induzieren (Lokmic et al. 2007). Obwohl eine perforierte Kammer in gesunden Tieren bessere Ergebnisse hinsichtlich der Gewebebildung (Dolderer et al. 2007) und der Vaskularisationsgeschwindigkeit (Arkudas et al. 2012) aufweist, wurde für diese Studie die Isolationskammer verwendet, weil externe Einflüsse auf das Konstrukt durch die Isolation vermieden werden und so eine bessere Vergleichbarkeit möglich ist.

7.2. Mesenchymale Stammzellen

In dieser Studie sollte der positive Einfluss von MSCs auf die Angiogenese verdeutlicht werden.

MSCs sind multipotente adulte Stammzellen, die aus mehreren Gründen eine vielversprechende Komponente für das Tissue Engineering von Knochengewebe darstellen.

MSCs sind dank ihrer osteogenen Eigenschaften hervorragend für das Tissue Engineering von Knochengewebe geeignet. Im Gegensatz zu Osteoblasten, die ebenfalls zum Tissue Engineering von Knochengewebe geeignet sind, haben sie die Fähigkeit sich asymmetrisch zu teilen, was bedeutet, dass sie sich entweder zu Knochenzellen differenzieren oder weiter als Stammzelle fungieren und die Eigenschaften einer Stammzelle beibehalten (Pittenger et al. 1999). Sie haben dadurch den Vorteil sich schnell und häufig vermehren zu können und sind daher leicht zu expandieren.

MSCs sind leicht und ohne ausgedehnte Hebemorbidity aus Knochenmarkaspiraten zu isolieren. Hierfür gibt es bereits etablierte Methoden

(Polisetti et al. 2010), die meist für die Isolierung humaner MSCs verwendet werden. Eine Möglichkeit, die wir auch in unserer Studie verwendet haben, ist es von der Eigenschaft der MSC Gebrauch zu machen, an Plastik zu adhären. Dadurch können überflüssige Zellreihen des Aspirats bei dem ersten Mediumwechsel ausgeschwemmt werden, während die MSC am Plastikuntergrund haften bleiben.

MSCs haben einen positiven Effekt auf die Knochenheilung, der in vielen *in vivo* Studien sowohl im Kleintier (Bruder et al. 1998; Ichioka et al. 2002), als auch im Großtier (Boos et al. 2010) nachgewiesen wurde und bereits in der Klinik angewandt wurde (Horwitz et al. 1999; Quarto et al. 2001).

Es konnte in unserer Studie zwar keine de-novo Knochenbildung nachgewiesen werden, allerdings zeigte Moshaverina et al. erst nach acht Wochen Knochengewebe in subkutan verpflanzten Konstrukten, welche mit MSC beladenen Alginat-Mikrokapseln versehen waren (Moshaverinia et al. 2013).

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnte nach sechs Wochen Knochengewebe im AV Loop Modell nachgewiesen werden, allerdings wurden hier eine perforierter Titan-Kammer und neben MSCs eine β -TCP/HA Matrix und BMP-2, ein osteogener Wachstumsfaktor, eingesetzt (Buehrer et al. 2015).

Andere für das Tissue Engineering interessante Eigenschaften der MSCs sind ihre immunmodulatorischen und angiogenen Fähigkeiten.

Undifferenzierte MSCs sind nicht immunogen, induzieren als allogene Zellen keine Immunreaktion und werden weder von zytotoxischen T-Zellen noch von natürlichen Killerzellen angegriffen. Es konnte sogar gezeigt werden, dass sie immunsuppressiv agieren und die Bildung zytotoxischer T-Zellen *in vitro* reduzieren (Le Blanc et al. 2003).

Immunmodulatorische Effekte waren in unserer Studie nicht nachweisbar. Dies könnte daran liegen, dass die Biokompatibilität von ADA-GEL generell keine ausgeprägte Entzündungsreaktion hervorruft und daher auch keine Modulation erkennbar sein kann.

Es ist bereits bekannt, dass MSCs die Angiogenese fördern und VEGF eine entscheidende Rolle dabei spielt (Al-Khaldi et al. 2003).

Annabi et al. erkannten, dass Hypoxie die Fähigkeit von MSCs zu migrieren und Gefäßstrukturen zu formen verstärkt (Chen et al. 2013) und dass dies abhängig ist von der Membran Typ 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) (Annabi et al. 2003). MT1-MMP ist ein Enzym, welches nicht nur die Neubildung von Gefäßen (Chen et al. 2013), sondern auch durch den Abbau der extrazellulären Matrix die Zellmobilität fördert (Itoh 2006; Lee et al. 2013). Kinnaird et al. haben gezeigt, dass MSCs angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF im hypoxischen Milieu *in vitro* produzieren und dadurch die Vaskularisation in einem *in vivo* Ischämie-Modell im Hinterbein von Mäusen fördert (Kinnaird et al. 2004).

Liu et al. entdeckten, dass die Mobilisation von MSCs durch Hypoxie begünstigt und dies über Hif-1 α reguliert wird (Liu et al. 2011). Weiterhin ist bekannt, dass ADA-GEL die VEGF Sekretion von verkapselten Zellen verstärkt (Grigore et al. 2014). Anhand unserer Beobachtungen und den Ergebnissen von Liu et al. und Grigore et al. liegt die Vermutung nahe, dass diese beiden Mechanismen die Vaskularisation fördern.

Die vermehrte Vaskularisierung erklärt auch die schnelle Degradation der Mikrokapseln in Gruppe B verglichen mit Gruppe A. Ein weiterer Erklärungsansatz ist der Zusammenhang der MT1-MMP mit der vermehrten Degradation in den Konstrukten, welche MSCs enthielten. Dieser Zusammenhang sollte in weiteren zukünftigen Versuchen noch genauer eruiert werden.

7.3. ADA-GEL Mikrokapseln

Die Wahl eines geeigneten Biomaterials ist untrennbar mit dem Erfolg des Tissue Engineering verknüpft. Das Trägermaterial simuliert eine extrazelluläre Matrix, bis die Zellen ihre eigene aufbauen. Daher muss das Trägermaterial biokompatibel sein und durch Porosität die Versorgung der Zellen mit

Sauerstoff und Nährstoffen ermöglichen. Hydrogele haben bisher vielversprechende Ergebnisse dazu geliefert, so auch das Biomaterial ADA-GEL. ADA-GEL entsteht durch kovalente Bindungen zwischen Alginat-Dialdehyd, dem teilweise oxidierten Derivat von Alginat, einem Polysaccharid aus der Braunalge, und Gelatine. Die Verbindung wird durch Schiff'sche Basen hervorgerufen und macht sich die günstigen Eigenschaften beider Stoffe zu Nutze, wie die guten mechanischen Eigenschaften des ADA und die Angiogenese und Zelladhäsion fördernden Eigenschaften der Gelatine.

Die mechanischen Eigenschaften von ADA-GEL ermöglichen die Herstellung von Mikrokapseln. Da ADA-GEL eine hohe Porosität aufweist, werden in ADA-GEL verkapselte Zellen nicht von der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen abgeschlossen (Nicodemus und Bryant 2008).

Sarker et al. haben in ihrer *in vitro* Studie gezeigt, dass Fibroblasten an ADA-GEL sowohl adhären als auch proliferieren. Sie folgerten, dass sich ADA-GEL zum Tissue Engineering eignet (Sarker et al. 2014b). Grigore et al. haben gezeigt, dass auch verkapselte Zellen in ADA-GEL *in vitro* überleben, sich ausbreiten und proliferieren. Sie benutzen dafür eine Osteosarkomzelllinie (MG63) und bahnten den Weg ADA-GEL als dreidimensionales Trägermaterial im Tissue Engineering von Knochengewebe anzuwenden (Grigore et al. 2014).

In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte in einem *in vivo* subkutan Modell in der Ratte gezeigt werden, dass mit ADA-GEL Mikrokapseln eine gute Biokompatibilität aufweisen und die Vaskularisierung zum Zeitpunkt der Explantation nach vier Wochen begonnen hatte. Weiterhin hatte die Degradation von ADA-GEL nach vier Wochen bereits begonnen (Rottensteiner et al. 2014).

Unsere Ergebnisse stimmen mit diesen Beobachtungen überein. Die Biokompatibilität von ADA-GEL war gut und wir konnten keine signifikante Immunreaktion nachweisen. Auch die Degradation, gemessen an der Querschnittsfläche der Präparate, hatte zum Explantationszeitpunkt von vier Wochen bereits begonnen. Diese war in der Gruppe mit MSCs Gruppe (Gruppe B) weiter fortgeschritten, als in der Gruppe ohne MSCs (Gruppe A). Allerdings war die Degradation von ADA-GEL ohne MSCs langsamer, als die Degradation von Fibrin-GEL ($1,46 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ vs. $5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$), welche in einer

anderen Studie mit ansonsten gleichen Gegebenheiten ermittelt wurde (Arkudas et al. 2007b).

Die Resorption des Biomaterials sollte möglichst synchron ablaufen mit dem Aufbau des gewünschten Gewebes. Beides sollte vorzugsweise schnell geschehen, da das gezüchtete Gewebe dann schneller in den Defekt transplantiert werden kann. Um die Knochenbildung zu beschleunigen kann man (wie oben beschrieben) Wachstumsfaktoren, wie BMP-2, in den Versuchsaufbau einbinden. Eine schnellere Resorption von ADA-GEL konnte in dieser Studie in der Gruppe mit MSCs (Gruppe B) beobachtet werden. Dies ist mit dem vermehrten Einwachsen von fibrovaskulärem Gewebe zu erklären.

Eine weitere Option, um eine notwendige Beschleunigung der Degradation von ADA-GEL zu erreichen, wäre die Produktion kleinerer Mikrokapseln, um ein optimales Oberflächen-Volumen-Verhältnis zu schaffen. Weiterhin könnte man das Verhältnis von Alginat-Dialdehyd zu Gelatine in Richtung der Gelatine verschieben. Dies wurde *in vitro* bereits von Sarker et al. untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein hoher Anteil von Gelatine mit einer besseren Zellproliferation, einem besseren Zellüberleben und einer schnelleren Degradation des Hydrogels einher geht (Sarker et al. 2014b). Allerdings geht ein Verhältnis zu Gunsten von Gelatine mit schlechteren mechanischen Eigenschaften einher (Sarker et al. 2014b), so dass hier eine Abwägung erfolgen müsste.

Man kann sich von einer schnelleren Degradation außerdem erhoffen, dass Gefäße in die Mikrokapseln einwachsen, was wir in dieser Studie in beiden Gruppen nicht beobachten konnten.

8. Schlussfolgerung

Wir konnten in unserer Studie nachweisen, dass die Vaskularisierung von ADA-GEL im AV-Loop Modell der Ratte erfolgreich war. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Verkapselung von MSCs in ADA-GEL die Bildung von vaskularisiertem Bindegewebe und die Biodegradation beschleunigt.

Durch das Verkapseln von MSCs in ADA-GEL konnte im Vergleich zu den MSC-freien ADA-GEL Mikro kapseln in der Kontrollgruppe eine statistisch signifikant höhere Vaskularisation erreicht werden. Daraus resultierte auch eine schnellere Degradation der ADA-GEL Mikro kapseln in der MSC-haltigen Gruppe, gemessen an der Querschnittsfläche der histologischen Präparate. Die immunologische Reaktion zeigte sich in der ED1-Färbung in beiden Gruppen gleich mild ausgeprägt und wir konnten in keinem histologischen Schnitt Knochengewebe nachweisen. Zur Entstehung von Knochengewebe müssen die Konstrukte einerseits eine längere Zeit *in vivo* verbleiben und andererseits eine osteogene Differenzierung der Zellen induziert werden. Weitere Studien die diese Aspekte in ihrem Aufbau berücksichtigen, werden zur Generierung von bioartifiziellem Knochengewebe nötig sein.

Mit Hilfe von der Analyse des μ CTs und der histomorphometrischen Auswertung konnte eine signifikant höhere Gefäßdichte und Anzahl der Gefäße in der MSC-haltigen Gruppe im Vergleich zur MSC-freien Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Wir konnten demonstrieren, dass die neu entstandenen Gefäße intakt und funktionstüchtig waren. Folglich ist das AV-Loop Modell zur funktionellen intrinsischen Vaskularisierung von bioartifiziellem Ersatzgewebe geeignet.

Durch die Vaskularisierung von ADA-GEL im AV-Loop Modell ist ein weiterer wichtiger Schritt in die Richtung des erfolgreichen Tissue Engineering von Knochengewebe gemacht worden, da eine axiale Vaskularisierung essentiell für die mikrochirurgische Transplantation von Ersatzgewebe ist. Weitere Studien werden nötig sein, um mit Hilfe von ADA-Gel und dem AV Loop Modell die Züchtung von axial vaskularisiertem bioartifiziellem Knochengewebe zeigen zu können.

9. Ausblick

Das Tissue Engineering ist eine Möglichkeit für die regenerative Medizin, das Wohlbefinden der Patienten mit Gewebeschäden zu verbessern. Es hat das

Potenzial, die Hebermorbidität drastisch zu verringern und einen Gewebedefekt maßgeschneidert zu rekonstruieren.

Heutzutage können bereits kleinere Defekte mit bioartifiziellen Ersatzgewebe rekonstruiert werden (Lauer und Schimming 2001; Horch et al. 2005).

Für ausgedehnte Gewebedefekte besteht die Herausforderung darin, ein geeignetes Konstrukt zu erstellen, welches aus einem Biomaterial besteht, dass die extrazelluläre Matrix optimal nachahmt, multipotente Zellen mit hohem Proliferationspotential enthält und vor allem ein präformiertes mikrovaskuläres Gefäßsystem beinhaltet, welches ein axiales Anschlussgefäß mitbringt, um so eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu erhalten. Die Kombination von ADA-GEL mit MSCs und dem AV-Loop Modell zeigt sich vielversprechend, um diese Problematik zu lösen.

Das AV-Loop Modell hat sich in vorangegangenen Studien bereits als geeignet zur Anfertigung eines mikrovaskulären Gefäßnetzes mit axialen Gefäßstiel in Kombination mit verschiedenen Matrices erwiesen (Cassell et al. 2001; Kneser et al. 2006b; Arkudas et al. 2007a). Es gelang sogar Horch et al. bereits einen großvolumigen Knochendefekt der Tibia und einen des Radius mit bioartifiziellen Ersatzgewebe aus autologen Zellen und einer arteriovenösen Schleife zu rekonstruieren (Horch et al. 2014).

Durch die Verwendung einer Isolierungskammer in Verbindung mit dem AV-Loop, kann das Konstrukt ohne Einflüsse des umliegenden Wirtgewebes untersucht werden.

Dank der guten mechanischen Eigenschaften, Biokompatibilität, Zelladhäsion und Biodegradation von ADA-GEL, bringt das Hydrogel beste Voraussetzungen für das Tissue Engineering mit sich (Xia et al. 2012; Wang et al. 2014; Rottensteiner et al. 2014; Sarker et al. 2014b). Die ermutigenden Studien von Wang et al. und Xia et al. zeigen, dass sich Hydrogele im Allgemeinen für die Herstellung von bioartifiziellen Knochenersatzgewebe eignen (Xia et al. 2012; Wang et al. 2014). Auf der Basis der pertinenten Literatur und dieser Studie scheint es sinnvoll das Hydrogel ADA-GEL weiter im Zusammenhang mit dem Tissue Engineering von vaskularisiertem

Knochengewebe zu untersuchen, um letztendlich klinisch anwendbares bioartifizielles Knochenersatzgewebe herzustellen.

Auch MSCs sind im Tissue Engineering von Knochengewebe auf Grund ihrer multipotenten, immunmodulatorischen, angiogenen Eigenschaften und ihrer einfachen Isolierung aus dem Knochenmark schon in zahlreichen Studien etabliert worden (Pittenger et al. 1999; Bruder et al. 1998; Mauney et al. 2005; Le Blanc et al. 2003; Barry und Murphy 2004; Moshaverinia et al. 2013).

Weitere Studien auf dem Feld des Tissue Engineering von Knochengewebe werden nötig sein, bis eine klinische Anwendung als Standardverfahren etabliert werden kann.

Um die Degradationsrate von ADA-GEL zu optimieren, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, wie sich kleinere Mikrokapseln mit einem besseren Oberflächen-Volumen-Verhältnis auf die Geschwindigkeit der Resorption von ADA-GEL auswirkt.

Mikrokapseln mit einem höheren Anteil von Gelatine könnten, solange die Mikrokapseln dadurch nicht an Stabilität verlieren, ebenfalls *in vivo* untersucht werden, um die Geschwindigkeit der Resorption von ADA-GEL zu untersuchen. Gleichzeitig ist es sinnvoll durch osteogene Stimulierung die Knochenbildung anzuregen. Zur Knochenentstehung sind außerdem längere Explantationszeiträume sinnvoll. Man könnte weiterhin untersuchen zu welchem Zeitpunkt eine komplette Degradation von ADA-GEL im AV-Loop Modell stattfindet.

10. Literaturverzeichnis

1. Al-Khaldi, A.; Eliopoulos, N.; Martineau, D.; Lejeune, L.; Lachapelle, K.; Galipeau, J. (2003): Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene therapy* 10 8:621–629.
2. Almog, Nava (2010): Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer letters* 294 2:139–146.
3. Amini, Ami R.; Laurencin, Cato T.; Nukavarapu, Syam P. (2012): Bone Tissue Engineering. Recent Advances and Challenges. *Critical reviews in biomedical engineering* 40 5:363–408.
4. Andersen, Therese; Strand, Berit L.; Formo, Kjetil; Alsberg, Eben; Christensen, Bjørn E. (2012): Chapter 9. Alginates as biomaterials in tissue engineering. In: Amelia Pilar Rauter und Thisbe K. Lindhorst (Hg.): *Carbohydrate chemistry. Chemical and biological approaches ; a review of the literature published between January 2010 and February 2011, Bd. 37.* Cambridge: RSC Publ (Specialist periodical reports carbohydrate chemistry, vol. 37)227–258.
5. Annabi, Borhane; Lee, Ying-Ta; Turcotte, Sandra; Naud, Emmanuelle; Desrosiers, Richard R.; Champagne, Martin et al. (2003): Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 21 3:337–347.
6. Arkudas, A.; Tjiawi, J.; Saumweber, A.; Beier, J. P.; Polykandriotis, E.; Bleiziffer, O. et al. (2009): Evaluation of blood vessel ingrowth in fibrin gel subject to type and concentration of growth factors. *Journal of cellular and molecular medicine* 13 9A:2864–2874.
7. Arkudas, Andreas; Balzer, Amelie; Buehrer, Gregor; Arnold, Isabel; Hoppe, Alexander; Detsch, Rainer et al. (2013): Evaluation of angiogenesis of bioactive glass in the arteriovenous loop model. *Tissue engineering. Part C, Methods* 19 6:479–486.
8. Arkudas, Andreas; Beier, Justus P.; Heidner, Kristina; Tjiawi, Jimmy; Polykandriotis, Elias; Srour, Safwan et al. (2007a): Axial

prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue engineering* 13 7:1549–1560.

9. Arkudas, Andreas; Beier, Justus Patrick; Prymachuk, Galyna; Hoereth, Tobias; Bleiziffer, Oliver; Polykandriotis, Elias et al. (2010): Automatic quantitative micro-computed tomography evaluation of angiogenesis in an axially vascularized tissue-engineered bone construct. *Tissue engineering. Part C, Methods* 16 6:1503–1514.
10. Arkudas, Andreas; Prymachuk, Galyna; Beier, Justus P.; Weigel, Linda; Körner, Carolin; Singer, Robert F. et al. (2012): Combination of extrinsic and intrinsic pathways significantly accelerates axial vascularization of bioartificial tissues. *Plastic and Reconstructive Surgery* 129 1:55e-65e.
11. Arkudas, Andreas; Tjiawi, Jimmy; Bleiziffer, Oliver; Grabinger, Lucia; Polykandriotis, Elias; Beier, Justus P. et al. (2007b): Fibrin gel-immobilized VEGF and bFGF efficiently stimulate angiogenesis in the AV loop model. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 13 9-10:480–487.
12. Balakrishnan, Bijj; Jayakrishnan, A. (2005): Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 26 18:3941–3951.
13. Bari, Cosimo de; Dell'Accio, Francesco; Tylzanowski, Przemyslaw; Luyten, Frank P. (2001): Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism* 44 8:1928–1942.
14. Barry, Frank P.; Murphy, J. Mary (2004): Mesenchymal stem cells. Clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36 4:568–584.
15. Beier, J. P.; Kneser, U.; Stern-Sträter, J.; Stark, G. B.; Bach, A. D. (2004): Y Chromosome Detection of Three-Dimensional Tissue-Engineered Skeletal Muscle Constructs in a Syngeneic Rat Animal Model. *Cell transplantation* 13 1:45–53.

16. Bhavya Lal, Jessica Viola, Oren Grad, Diana Hicks (2003): The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field.
17. Bigi, A.; Panzavolta, S.; Rubini, K. (2004): Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials* 25 25:5675–5680.
18. Boanini, Elisa; Bigi, Adriana (2011): Biomimetic gelatin-octacalcium phosphate core-shell microspheres. *Journal of colloid and interface science* 362 2:594–599.
19. Boos, A. M.; Arkudas, A.; Kneser, U.; Horch, R. E.; Beier, J. P. (2010): Knochen Tissue Engineering zur Therapie von Knochendefekten. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe : Organ der V...* 42 6:360–368.
20. Bouhadir, Kamal H.; Hausman, Debra S.; Mooney, David J. (1999): Synthesis of cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. *Polymer* 40 12:3575–3584.
21. Bruder, Scott P.; Kraus, Karl H.; Goldberg, Victor M.; Kadiyala, Sudha (1998): The Effect of Implants Loaded with Autologous Mesenchymal Stem Cells on the Healing of Canine Segmental Bone Defects*. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 80 7:985–996.
22. Buehrer, Gregor; Balzer, Amelie; Arnold, Isabel; Beier, Justus P.; Koerner, Carolin; Bleiziffer, Oliver et al. (2015): Combination of BMP2 and MSCs significantly increases bone formation in the rat arterio-venous loop model. *Tissue engineering. Part A* 21 1-2:96–105.
23. Cassell, O. C. S.; Stefan Hofer, O. P.; Morrison, Wayne A.; Knight, Kenneth R. (2002): Vascularisation of tissue-engineered grafts. The regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *British Journal of Plastic Surgery* 55 8:603–610.
24. Cassell, Oliver C.S.; Morrison, Wayne A.; Messina, Aurora; Penington, Anthony J.; Thompson, Erik W.; Stevens, Geoffrey W. et al. (2001): The Influence of Extracellular Matrix on the Generation of Vascularized,

Engineered, Transplantable Tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences* 944 1:429–442.

25. Chen, Qishan; Jin, Min; Yang, Feng; Zhu, Jianhua; Xiao, Qingzhong; Zhang, Li (2013): Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators of inflammation* 2013:928315.
26. Colton, C. K. (1995): Implantable biohybrid artificial organs. *Cell transplantation* 4 4:415–436.
27. Colton, Ray; D'Agostino, Antonella; Traeger, John C. (1995): Electrospray mass spectrometry applied to inorganic and organometallic chemistry. *Mass Spectrom. Rev.* 14 2:79–106.
28. Dolderer, Juergen H.; Abberton, Keren M.; Thompson, Erik W.; Slavin, John L.; Stevens, Geoffrey W.; Penington, Anthony J.; Morrison, Wayne A. (2007): Spontaneous large volume adipose tissue generation from a vascularized pedicled fat flap inside a chamber space. *Tissue engineering* 13 4:673–681.
29. Dreesmann, Lars; Ahlers, Michael; Schlosshauer, Burkhard (2007): The pro-angiogenic characteristics of a cross-linked gelatin matrix. *Biomaterials* 28 36:5536–5543.
30. Duan, Bin; Hockaday, Laura A.; Kang, Kevin H.; Butcher, Jonathan T. (2013): 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part A* 101 5:1255–1264.
31. Eckert, A. W.; Kappler, M.; Schubert, J.; Taubert, H. (2012): Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral and maxillofacial surgery* 16 2:189–196.
32. Eiselt, P.; Kim, B. S.; Chacko, B.; Isenberg, B.; Peters, M. C.; Greene, K. G. et al. (1998): Development of technologies aiding large-tissue engineering. *Biotechnology progress* 14 1:134–140.

33. Erices, Alejandro; Conget, Paulette; Minguell, José J. (2000): Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology* 109 1:235–242.
34. Erol, O. O.; Spira, M. (1979): New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. *Surgical forum* 30:530–531.
35. Folkman, J. und Hochberg, M. (1973): Self-Regulation of Growth in three Dimension. *Journal of Experimental Medicine* 138 4:745–753.
36. Forsythe, J. A.; Jiang, B. H.; Iyer, N. V.; Agani, F.; Leung, S. W.; Koos, R. D.; Semenza, G. L. (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16 9:4604–4613.
37. Friedenstein, A. J.; Chailakhjan, R. K.; Lalykina, K. S. (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif* 3 4:393–403.
38. Griffith, L. G.; Swartz, M. A. (2006): Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 7 3:211–224.
39. Grigore, Alexandra; Sarker, Bapi; Fabry, Ben; Boccaccini, Aldo R.; Detsch, Rainer (2014): Behavior of encapsulated MG-63 cells in RGD and gelatine-modified alginate hydrogels. *Tissue engineering. Part A* 20 15-16:2140–2150.
40. Henn, Dominic; Abu-Halima, Masood; Wermke, Dominik; Falkner, Florian; Thomas, Benjamin; Köpple, Christoph et al. (2019): MicroRNA-regulated pathways of flow-stimulated angiogenesis and vascular remodeling in vivo. *J Transl Med* 17 1:388.
41. Hofer, Stefan O. P.; Knight, Katherine M.; Cooper-White, Justin J.; O'Connor, Andrea J.; Perera, Jilka M.; Romeo-Meeuw, Rosalind et al. (2003): Increasing the volume of vascularized tissue formation in engineered constructs: an experimental study in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery* 111 3:1186-92; discussion 1193-4.

42. Horch, Raymund E.; Kopp, Jürgen; Kneser, Ulrich; Beier, Justus; Bach, Alexander D. (2005): Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cellular Mol Med* 9 3:592–608.
43. Horwitz, E. M.; Prockop, D. J.; Fitzpatrick, L. A.; Koo, W. W.; Gordon, P. L.; Neel, M. et al. (1999): Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature medicine* 5 3:309–313.
44. Ichioka, Naoya; Inaba, Muneo; Kushida, Taketohi; Esumi, Takashi; Takahara, Kazuhiko; Inaba, Kayo et al. (2002): Prevention of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 20 6:542–551.
45. Ismail, Tarek; Osinga, Rik; Todorov, Atanas; Haumer, Alexander; Tchang, Laurent A.; Epple, Christian et al. (2017): Engineered, axially-vascularized osteogenic grafts from human adipose-derived cells to treat avascular necrosis of bone in a rat model. *Acta Biomaterialia* 63:236–245.
46. Itoh, Yoshifumi (2006): MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue. *IUBMB life* 58 10:589–596.
47. Jensen, T.; Baas, J.; Dolathshahi-Pirouz, A.; Jacobsen, T.; Singh, G.; Nygaard, J. V. et al. (2011): Osteopontin functionalization of hydroxyapatite nanoparticles in a PDLLA matrix promotes bone formation. *Journal of biomedical materials research. Part A* 99 1:94–101.
48. Kinnaird, T.; Stabile, E.; Burnett, M. S.; Lee, C. W.; Barr, S.; Fuchs, S.; Epstein, S. E. (2004): Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation research* 94 5:678–685.
49. Kneser, U.; Stangenberg, L.; Ohnolz, J.; Buettner, O.; Stern-Straeter, J.; Möbest, D. et al. (2006a): Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model. *J Cell Mol Med* 10 3:695–707.

50. Kneser, U.; Voogd, A.; Ohnolz, J.; Buettner, O.; Stangenberg, L.; Zhang, Y. H. et al. (2005): Fibrin Gel-Immobilized Primary Osteoblasts in Calcium Phosphate Bone Cement. In vivo Evaluation with Regard to Application as Injectable Biological Bone Substitute. *Cells Tissues Organs* 179 4:158–169.
51. Kneser, Ulrich; Kaufmann, Peter M.; Fiegel, Henning C.; Pollok, Joerg M.; Kluth, Dietrich; Herbst, Hermann; Rogiers, Xavier (1999): Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* 47 4:494–503.
52. Kneser, Ulrich; Polykandriotis, Elias; Ohnolz, Jan; Heidner, Kristina; Grabinger, Lucia; Euler, Simon et al. (2006b): Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop. *Tissue engineering* 12 7:1721–1731.
53. Langer, R.; Vacanti, J. (1993): Tissue engineering. *Science* 260 5110:920–926.
54. Lauer, G.; Schimming, R. (2001): Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue. A clinical and immunohistologic study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 59 2:169-75; discussion 175-7.
55. Le Blanc, K.; Tammik, L.; Sundberg, B.; Haynesworth, S. E.; Ringden, O. (2003): Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex. *Scand J Immunol* 57 1:11–20.
56. Le Blanc, Katarina; Ringdén, Olle (2006): Mesenchymal stem cells. Properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Current opinion in immunology* 18 5:586–591.
57. Lee, Hsinyu; Chang, Kai-Wei; Yang, Hsi-Yuan; Lin, Po-Wei; Chen, Shee-Uan; Huang, Yuan-Li (2013): MT1-MMP regulates MMP-2 expression and angiogenesis-related functions in human umbilical vein

endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 437 2:232–238.

58. L'Heureux, Nicolas; Paquet, Stéphanie; Labbé, Raymond; Germain, Lucie; Auger, Francois A. (1998): A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* Vol. 12 No. 1:47–56.
59. Liu, Lizhen; Yu, Qin; Lin, Jie; Lai, Xiaoyu; Cao, Weijie; Du, Kaili et al. (2011): Hypoxia-inducible factor-1 α is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem cells and development* 20 11:1961–1971.
60. Lokmic, Zerina; Mitchell, Geraldine M. (2008): Engineering the microcirculation. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 14 1:87–103.
61. Lokmic, Zerina; Stillaert, Filip; Morrison, Wayne A.; THOMPSON, ERIK W.; Mitchell, Geraldine M. (2007): An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 2:511–522.
62. Majumdar, Manas K.; Thiede, Mark A.; Mosca, Joseph D.; Moorman, Mark; Gerson, Stanton L. (1998): Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 176 1:57–66.
63. Mauney, Joshua R.; Volloch, Vladimir; Kaplan, David L. (2005): Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue engineering* 11 5-6:787–802.
64. Mian, R.; Morrison, W. A.; Hurley, J. V.; Penington, A. J.; Romeo, R.; Tanaka, Y.; Knight, K. R. (2000): Formation of new tissue from an arteriovenous loop in the absence of added extracellular matrix. *Tissue engineering* 6 6:595–603.
65. Mimoun, M.; Hilligot, P.; Baux, S. (1989): The nutrient flap: a new concept of the role of the flap and application to the salvage of arteriosclerotic lower limbs. *Plastic and Reconstructive Surgery* 84 3:458–467.

66. Minuth, Will W.; Strehl, Raimund; Schumacher, Karl (2012): Zukunftstechnologie Tissue Engineering. Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. 1., Auflage. Weinheim: Wiley-VCH.
67. Moimas, Silvia; Manasseri, Benedetto; Cuccia, Giuseppe; Stagno d'Alcontres, Francesco; Geuna, Stefano; Pattarini, Lucia et al. (2015): AAV vector encoding human VEGF165–transduced pectineus muscular flaps increase the formation of new tissue through induction of angiogenesis in an in vivo chamber for tissue engineering. A technique to enhance tissue and vessels in microsurgically engineered tissue. *Journal of Tissue Engineering* 62041731415611717.
68. Mooney, D. J.; Mikos, A. G. (1999): Growing new organs. *Sci Am* 280 4:60–65.
69. Moshaverinia, Alireza; Chen, Chider; Akiyama, Kentaro; Xu, Xingtian; Chee, Winston W. L.; Schricker, Scott R.; Shi, Songtao (2013): Encapsulated dental-derived mesenchymal stem cells in an injectable and biodegradable scaffold for applications in bone tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part A* 101 11:3285–3294.
70. Nicodemus, Garret D.; Bryant, Stephanie J. (2008): Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 14 2:149–165.
71. O'Brien, Fergal J. (2011): Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 14 3:88–95.
72. Patel, J.; Shafiee, A.; Wang, W.; Fisk, N. M.; Khosrotehrani, K. (2014): Novel isolation strategy to deliver pure fetal-origin and maternal-origin mesenchymal stem cell (MSC) populations from human term placenta. *Placenta* 35 11:969–971.
73. Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D. et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 5411:143–147.
74. Polisetti, Naresh; Chaitanya, V. G.; Babu, Phanithi Prakash; Vemuganti, Geeta K. (2010): Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurology India* 58 2:201–208.

75. Polykandriotis, E.; Arkudas, A.; Euler, S.; Beier, J. P.; Horch, R. E.; Kneser, U. (2006): Prävascularisationsstrategien im Tissue Engineering. *Handchir Mikrochir plast Chir* 38 04:217–223.
76. Polykandriotis, E.; Arkudas, A.; Horch, R. E.; Stürzl, M.; Kneser, U. (2007a): Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering. Opening a new perspective for biomedical science. *Journal of cellular and molecular medicine* 11 1:6–20.
77. Polykandriotis, E.; Tjiawi, J.; Euler, S.; Arkudas, A.; Hess, A.; Brune, K. et al. (2008): The venous graft as an effector of early angiogenesis in a fibrin matrix. *Microvascular Research* 75 1:25–33.
78. Polykandriotis, Elias; Horch, Raymund. E.; Arkudas, Andreas; Labanaris, Apostolos; Brune, Kay; Greil, Peter et al. (2007b): Intrinsic Versus Extrinsic Vascularization in Tissue Engineering. In: John P. Fisher (Hg.): *Tissue Engineering*, Bd. 585. 1. Aufl. s.l.: Springer-Verlag (Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 585, v.585)311–326.
79. Ponticiello, M. S.; Schinagl, R. M.; Kadiyala, S.; Barry, F. P. (2000): Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *Journal of biomedical materials research* 52 2:246–255.
80. Putnam, Andrew J.; Mooney, David J. (1996): Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. *Nat Med* 2 7:824–826.
81. Quarto, R.; Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Kutepov, S. M.; Mukhachev, V.; Lavroukov, A. et al. (2001): Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England journal of medicine* 344 5:385–386.
82. Risau, W. (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386 6626:671–674.
83. Rottensteiner, Ulrike; Sarker, Bapi; Heusinger, Dominik; Dafinova, Diana; Rath, Subha; Beier, Justus et al. (2014): In vitro and in vivo Biocompatibility of Alginate Dialdehyde/Gelatin Hydrogels with and

without Nanoscaled Bioactive Glass for Bone Tissue Engineering Applications. *Materials* 7 3:1957–1974.

84. Rowley, Jon A.; Madlambayan, Gerard; Mooney, David J. (1999): Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20 1:45–53.
85. Sarker, Bapi; Papageorgiou, Dimitrios G.; Silva, Raquel; Zehnder, Tobias; Gul-E-Noor, Farhana; Bertmer, Marko et al. (2014a): Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *J. Mater. Chem. B* 2 11:1470.
86. Sarker, Bapi; Singh, Raminder; Silva, Raquel; Roether, Judith A.; Kaschta, Joachim; Detsch, Rainer et al. (2014b): Evaluation of fibroblasts adhesion and proliferation on alginate-gelatin crosslinked hydrogel. *PLoS one* 9 9:e107952.
87. Shweiki, D.; Itin, A.; Soffer, D.; Keshet, E. (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359 6398:843–845.
88. Singer, Nora G.; Caplan, Arnold I. (2011): Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual review of pathology* 6457–478.
89. Tanaka, Y.; Tsutsumi, A.; Crowe, D. M.; Tajima, S.; Morrison, W. A. (2000): Generation of an autologous tissue (matrix) flap by combining an arteriovenous shunt loop with artificial skin in rats: preliminary report. *British Journal of Plastic Surgery* 53 1:51–57.
90. Tanaka, Yoshio; Sung, Ki-Chul; Tsutsumi, Akira; Ohba, Sousuke; Ueda, Koichi; Morrison, Wayne A. (2003): Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation? *Plastic and Reconstructive Surgery* 112 6:1636–1644.
91. Tsai, Ming-Song; Lee, Jia-Ling; Chang, Yu-Jen; Hwang, Shiaw-Min (2004): Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction* 19 6:1450–1456.

92. Wade, Nicholas (2001): In Tiny Cells, Glimpses Of Body's Master Plan. New York Times. Online verfügbar unter <http://www.nytimes.com/2001/12/18/science/in-tiny-cells-glimpses-of-body-s-master-plan.html>, zuletzt geprüft am 01.07.2017.
93. Wake, M. Conley; Patrick, Charles W.; Mikos, Antonios G. (1994): Pore Morphology Effects on the Fibrovascular Tissue Growth in Porous Polymer Substrates. *Cell transplantation* 3 4:339–343.
94. Wang, Xiaohong; Tolba, Emad; Schröder, Heinz C.; Neufurth, Meik; Feng, Qingling; Diehl-Seifert, Bärbel; Müller, Werner E. G. (2014): Effect of bioglass on growth and biomineralization of SaOS-2 cells in hydrogel after 3D cell bioprinting. *PloS one* 9 11:e112497.
95. Wang, Yan; Vaddiraju, Santhisagar; Qiang, Liangliang; Xu, Xiaoming; Papadimitrakopoulos, Fotios; Burgess, Diane J. (2012): Effect of Dexamethasone-Loaded Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microsphere/Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel Composite Coatings on the Basic Characteristics of Implantable Glucose Sensors. *Journal of Diabetes Science and Technology* 6 6:1445–1453.
96. Xia, Yang; Mei, Fang; Duan, Yongli; Gao, Ying; Xiong, Zhuo; Zhang, Ting; Zhang, Hongquan (2012): Bone tissue engineering using bone marrow stromal cells and an injectable sodium alginate/gelatin scaffold. *Journal of biomedical materials research. Part A* 100 4:1044–1050.
97. Zhan, Weiqing; Marre, Diego; Mitchell, Geraldine M.; Morrison, Wayne A.; Lim, Shiang Y. (2016): Tissue Engineering by Intrinsic Vascularization in an In Vivo Tissue Engineering Chamber. *Journal of visualized experiments : JoVE* 111:
98. Zuk, Patricia A.; Zhu, Min; Mizuno, Hiroshi; Huang, Jerry; Futrell, J. William; Katz, Adam J. et al. (2001): Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue engineering* 7:210–227.

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mit ihrer Unterstützung zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Raymund E. Horch für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Andreas Arkudas für die Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten und die jederzeitige Ansprechbarkeit, trotz der alltäglichen Praxis als Plastischer Chirurg, sowie für seine jederzeit herausragende Betreuung meiner Arbeit.

Frau Laura Fischer möchte ich für die Durchführung der Tier-Operationen danken.

Herrn Dr. med. Dominik Steiner möchte ich für den wissenschaftlichen Rat während der Erstellung der Arbeit und die Durchsicht des Manuskripts danken. Ganz herzlich möchte ich den Mitarbeitern des Forschungslabors für ihre fachkundige Unterstützung während der praktischen Phase danken. Insbesondere möchte ich mich hierfür bei Frau Katrin Köhn und Frau Ilse Arnold für die technische Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Schnittpräparate und bei der Durchführung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Greil und Herrn Reinhardt für die Herstellung der Teflon-Trennkammern danken.

Dr.-Ing. Tobias Fey und dem Department Werkstoffwissenschaften Lehrstuhl für Glas und Keramik der Universität Erlangen-Nürnberg danke ich für die Durchführung der μ CT-Untersuchungen.

Mein Dank geht ebenso an den Verlag Mary Ann Liebert, Inc., New Rochelle, NY und für die Erlaubnis die Abbildung 1-12 zu verwenden.

Grenzenloser Dank gilt meiner Familie, die mir durch ihre Unterstützung das Medizinstudium und diese Arbeit erst ermöglichten und mich immer wieder voranbrachten. Liebster Dank gilt auch meinen Freunden, die mich in den schwierigen Phasen unterstützten.