

Aus der Hals-, Nasen-, Ohren-Klinik und Poliklinik - Plastische Operationen
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Modulation der mikrovaskulären Biomaterialintegration *in vivo* mittels
Polyphosphat-modifizierten Polycaprolacton-Gerüsten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin oder Zahnmedizin oder der physiologischen Wissenschaften
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Dr. Martin Heller
aus Wiesbaden

Mainz, 2020

Tag der Promotion: 22. Oktober 2020

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden von April 2017 bis Februar 2019 im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit in einem Kooperationsprojekt zwischen der Hals-Nasen-Ohren Klinik und dem Institut für Physiologische Chemie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Die regenerative Medizin und seine Herausforderungen	1
1.2 Zielsetzung der Arbeit.....	3
2 Literaturdiskussion	5
2.1 Biomaterialien in der Medizin.....	5
2.1.1 Biomaterialien in der regenerativen Medizin: Ein Überblick	5
2.1.2 Polycaprolacton: ein vielseitiges Biomaterial	7
2.1.3 3D-Druck in der Medizin	8
2.2 Die medizinische Bedeutung von Biomaterialmodifikationen.....	10
2.2.1 Biomaterialmodifikation zur Förderung der Blutgefäßbildung für eine verbesserte Einheilung von Implantaten	12
2.2.2 Biomaterialmodifikation mittels anorganischem Polyphosphat zur Förderung der mikrovaskulären Implantatintegration.....	13
2.3 Analyse der mikrovaskulären Integration von Biomaterialien <i>in vivo</i>	14
3 Material and Methoden	16
3.1 Materialien	16
3.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	16
3.1.2 Chemikalien	18
3.1.3 Puffer und Lösungen	19
3.1.4 Antikörper	19
3.1.5 Software.....	20
3.2 Methoden.....	20
3.2.1 Herstellung der PolyP-modifizierten Polycaprolacton-Gerüste	20
3.2.2 Chorionallantoismembran-Assay	22
3.2.2.1 Versuchsaufbau und Vorbereitung der befruchteten Hühnereier	22
3.2.2.2 Präparation der Hühnereier.....	23
3.2.2.3 Die Inkubation mit Polycaprolacton-Gerüsten	23
3.2.2.4 Beendigung der Inkubation und Entnahme der PCL-Gerüste	23
3.2.2.5 Immunhistologische Analyse der CAM	24
3.2.2.6 Visualisierung und qualitative Analyse der Angiogenese	27

3.2.2.7	Visualisierung der Gefäße in der CAM mittels Intravitalmikroskopie..	27
3.2.2.8	Quantifizierung angiogener Parameter	28
3.2.2.9	Statistische Auswertung	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Herstellung der Polycaprolacton-Gerüste	31
4.2	Mikroskopische Analyse der Blutgefäße	32
4.3	Immunhistologische Analyse der mikrovaskulären Integration	36
4.4	Intravitalmikroskopische Analyse der mikrovaskulären Integration.....	39
5	Diskussion.....	42
5.1	Problemstellung und Zielsetzung.....	42
5.2	Herstellung der Polycaprolacton-Gerüste	43
5.3	Polyphosphat führt zu einer reduzierten Gefäßdichte in der CAM	44
5.4	Die Reduktion des Gefäßnetzwerkes als potenziell modulatorischer Effekt von PolyP	46
5.5	Analyse des gewählten <i>in vivo</i> Modells	49
6	Schlussfolgerung und Ausblick	52
7	Zusammenfassung	54
8	Referenzen	56
9	Anhang	68
9.1	Originale Datensätze	68
9.1.1	Anzahl der Verzweigungspunkte	68
9.1.2	Bestimmung der prozentualen Gefäßdichte.....	71
9.1.3	Bestimmung der Gefäßdurchmesser	71
9.1.4	Bestimmung der Gefäßdurchmesser	73
9.1.5	Bestimmung der Gefäßlängen	74
	Danksagung	81
	Curriculum Vitae	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des 3D-Drucks am Beispiel des Schmelzschichtens (Fused Deposition Modeling)	10
Abbildung 2.2 Schematische Darstellung eines Hühnerembryos [nach Dombre et al., 2017 und Wolpert, 1999].	14
Abbildung 3.1 Zeitlicher Ablauf der CAM-Experimente	22
Abbildung 3.2 Analyse der mikrovaskulären Integration. Gezeigt ist die zufällige Definition der fünf Bildbereiche mit jeweils $0,04 \text{ mm}^2$	29
Abbildung 3.3 Software-basierte Bildbearbeitung mittels ImageJ zur Berechnung der mittleren Gefäßlängen.	29
Abbildung 4.1 Darstellung der porösen PCL Gerüste.	31
Abbildung 4.2 Übersichtsaufnahmen der PCL-Gerüste (Kontrolle vs. PolyP-modifiziert) nach Inkubation auf der CAM nach 24 Stunden, 3 Tagen und 7 Tagen.	32
Abbildung 4.3 Analyse der mikrovaskulären Integration der PCL-Gerüste (Kontrolle vs PolyP) nach 24 Stunden, 3 Tagen und 7 Tagen in den Randbereichen der CAM.	34
Abbildung 4.4 Analyse der mikrovaskulären Integration der PCL-Gerüste (Kontrolle vs PolyP) nach 24 Stunden, 3 Tagen und 7 Tagen innerhalb der porösen Strukturen der PCL-Gerüste.	35
Abbildung 4.5 HE-Färbung histologischer Schnitte von Kontroll-Proben zur qualitativen Analyse der CAM-Gewebe bzw. Gefäßstrukturen.	36
Abbildung 4.6 HE-Färbung und Endothellzell-spezifischen bzw. Gefäß-spezifische Färbungen mit CD31, vWF, α -SMA von histologischen CAM-Schnitten zur Beurteilung der Färbungsqualität	37
Abbildung 4.7 Färbung der histologischen Präparate mittels anti- α -SMA.	38
Abbildung 4.8 Intravitalmikroskopische Aufnahmen nach Färbung mit FITC-Dextran	39
Abbildung 4.9 Analyse der verschiedenen angiogenen Parameter wie (A) Anzahl der Verzweigungspunkte, (B) Gefäßdichte, (C) mittlere Gefäßdurchmesser und (D) mittlere Gefäßlängen	40
Abbildung 5.1 Die poröse Struktur zweier PCL-Gerüste aus verschiedenen Chargen	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Überblick über eingesetzte Materialien und Anwendungsgebiete in der Medizin [nach Heller, 2009].	6
Tabelle 3.1 Auflistung der eingesetzten primären Antikörper.....	19
Tabelle 3.2 Auflistung des eingesetzten sekundären Antikörpers.....	20
Tabelle 3.3 Aufsteigende Alkoholreihe während des Einbettens	25
Tabelle 9.1 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes A1.....	68
Tabelle 9.2 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes A2.....	68
Tabelle 9.3 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes A3.....	68
Tabelle 9.4 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes B1.....	69
Tabelle 9.5 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes B2.....	69
Tabelle 9.6 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes B3.....	69
Tabelle 9.7 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes C1	70
Tabelle 9.8 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes C2	70
Tabelle 9.9 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes C3	70
Tabelle 9.10 Originaldaten der prozentualen Gefäßdichte der verschiedenen Versuchs-ansätze	71
Tabelle 9.11 Originaldaten für die Bestimmung der mittleren Gefäßdurchmesser der Kontrollproben.....	71
Tabelle 9.12 Originaldaten für die Bestimmung der mittleren Gefäßdurchmesser der PolyP-modifizierten PCL-Proben	73
Tabelle 9.13 Originaldaten für die Bestimmung der mittleren Gefäßlängen.....	74
Tabelle 9.14 Berechnung der mittleren Gefäßlängen	80

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
aqua dest.	destilliertes Wasser
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumdichlorid
CAM	<i>chorio-allantoic membrane</i>
CD31	<i>cluster of differentiation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	<i>hour</i>
IL-8	Interleukin-8
M	Molarität einer Lösung (mol/l)
μ g	Mikrogramm
min	Minute
μ l	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCL	Polycaprolacton
PDGF	platelet derived growth factor
PolyP	Polyphosphat
RT	Raumtemperatur

SD	<i>standard deviation</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Die regenerative Medizin und ihre Herausforderungen

Der adäquate Ersatz von verloren gegangenem Gewebe nach einem Trauma oder als Folge einer Erkrankung wie z. B. Krebs, gehört mit zu den größten Herausforderungen in der regenerativen Medizin. Dabei gibt es die Möglichkeit, das verlorene Gewebe durch körpereigenes zu ersetzen, oder es werden je nach medizinischer Indikation Biomaterialien verwendet, welche in den Körper implantiert werden können. So kann z. B. im Bereich der Orthopädie im Falle von Kreuzbandrupturen, ein autologer Ersatz mit der Sehne des Musculus semitendinosus erfolgen [Lee et al., 2019]. Für die chirurgische Versorgung größerer Weichteildefekte können des Weiteren auch Lappenplastiken verwendet werden, durch welche der Verschluss der Gewebedefekte möglich wird [Georgescu et al., 2019]. Leider steht in vielen Fällen nicht genügend eigenes Gewebe zur Verfügung bzw. ist die Entnahme mit erheblichen Komplikationen vergesellschaftet, sodass hier synthetische Materialien zum Einsatz kommen [Ayoub et al., 2015]. Dabei werden höchste Anforderungen an die Materialien gestellt, die eingesetzt werden. Je nach der zu erfüllenden Funktion müssen die Materialien, wie im Falle einer osteosynthetischen Versorgung von Knochenbrüchen, eine gewisse Festigkeit bzw. Stabilität aufweisen, um die Struktur und Funktion des Knochens wieder herzustellen. Nach erfolgter chirurgischer Versorgung kann so eine schnelle Wiederaufnahme von Aktivitäten und Belastungen der rekonstruierten bzw. stabilisierten Region erreicht werden [van der Ven et al., 2019]. Beim Ersatz von Weichgewebe werden wiederum andere Materialeigenschaften benötigt, um z. B. nach teilweiser oder vollständiger Brustentfernung bei Brustkrebs ästhetisch ansprechende Ergebnisse mittels Silikonimplantaten erzielen zu können [Singla et al., 2017].

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Wahl eines geeigneten Materials ist die Frage nach der Zeit, die es im Körper seine Funktion erfüllen muss. Während im Falle von Knochenbrüchen oder auch Gelenkprothesen die Materialien teilweise sehr lange oder sogar lebenslang im Körper verbleiben können, werden z.B. bei

Wundnähten oder kleineren Knochendefekten Materialien verwendet, die nur temporär ihre Funktion erfüllen und sich dann auflösen bzw. vom Körper resorbiert werden. Zu den langlebigen nicht-resorbierbaren Materialien gehören vor allem Metalle oder verschiedene Polymere [Rodriguez et al., 2020; Amabili et al., 2020; Parry et al., 2018; Jensen et al., 2007]. Zu den resorbierbaren Materialien gehören „instabilere“ Polymere, welche nach einer gewissen Zeit im Körper sowohl enzymatisch als auch hydrolytisch aufgespalten werden können und sich nach Wochen oder Monaten auflösen [Miyaguchi et al., 2016; Pang et al., 2010; Ng et al., 2007].

Das Einbringen von fremden Materialien in den Körper bringt nicht selten Komplikationen in Form von immunologischen Fremdkörperreaktionen mit sich. Dabei kommt es zu Entzündungsreaktionen, welche eine überschießende Narbenbildung zur Folge haben und schließlich in einer Fibrose münden können [Kloppfleisch et al., 2017; Anderson et al., 2008]. Das Forschungsfeld der medizinischen Biomaterialforschung hat es sich in den vergangenen Jahrzehnten zur Aufgabe gemacht, durch Modifikation der verwendeten Materialien Fremdkörperreaktionen entgegenzuwirken und das Einheilen von Implantaten zu verbessern. Neben sog. „biomimetischen“ Modifikationen bei denen die Oberflächen von Materialien so verändert werden, dass der Körper sie nicht mehr als „Fremdkörper“ erkennt, steht seit einigen Jahren insbesondere die Wundheilung bzw. die mit der Heilung assoziierte Bildung neuer Blutgefäße, die sog. Angiogenese, im Fokus der Forschung. So finden sich zahlreiche Forschungsarbeiten, in denen durch eine Förderung der Angiogenese das Einheilen von Implantaten verbessert werden kann. Dabei werden verschiedenste Ansätze verfolgt, um dieses Ziel zu erreichen. So konnte in *in vitro* Experimenten demonstriert werden, dass sich das Verhalten von Endothelzellen, welche Gefäße bilden, an der Grenzfläche von Titan nach Beschichtung mit Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) oder von Adhäsionspeptiden gezielt beeinflussen lässt [Heller et al., 2015; Kämmerer et al., 2011]. Auch im Tierversuch zeigte der Einsatz von Proteinen der EZM einen positiven Effekt auf das Einheilen bzw. die Angiogenese nach Implantation von porösem Polyethylen, das im Vorfeld mit dem Protein beschichtet wurde [Hessenauer et al., 2018].

Im Rahmen der angiogenen Prozesse während der Blutgefäßbildung spielt insbesondere der pro-angiogene Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) eine entscheidende Rolle. So konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass sich durch die Modifikation verschiedener Materialien bzw. Gerüste mittels VEGF sowohl das zelluläre Verhalten *in vitro* als auch die Angiogenese *in vivo* gezielt beeinflussen lassen [Xu et al., 2018; Zhao et al., 2016; Shen et al., 2015; Koch et al., 2012, 2006; Ito et al., 2005].

Zur angiogenen Stimulation während der Blutgefäßbildung konnte in den letzten Jahren ein weiterer Faktor identifiziert werden, der im Zusammenhang der Biomaterialintegration immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt ist. Anorganisches Polyphosphat (PolyP), welches natürlicherweise in Thrombozyten vorkommt und aus den elektronendichten Granula freigesetzt wird, zeigte insbesondere sowohl im Kontext der Knochenmineralisation/-regeneration als auch für den Prozess der Angiogenese fördernde Effekte [Müller et al. 2018, 2016 (*a, b); Wang et al., 2017]. Es lassen sich jedoch auch gegensätzliche Literaturangaben finden, welche im Kontext der Tumorangio-genese von einem anti-angiogenen Effekt durch PolyP sprechen [Han et al., 2007].

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Das Biomaterial Polycaprolacton (PCL) ist ein vielseitiges Material, welches aufgrund seiner Eigenschaften zunehmend Eingang in die regenerative Medizin findet. Als Biomaterial findet es unter anderem Verwendung als abbaubares Nahtmaterial, Wundabdeckungen, Zahnwurzelkanalfüllungen und als Gerüstmaterial im Bereich des *Tissue Engineering* und der regenerativen Medizin [Müller et al., 2018, 2016 (*a, b); Dalton et al., 2009; Alani et al., 2009; Ng et al., 2007].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten PCL-Gerüste mittels PolyP modifiziert und anschließend der angiogene Effekt bzw. die mikrovaskuläre Integration analysiert werden. Wie bereits erwähnt lassen sich für PolyP bislang einige Arbeiten finden, die eine pro-angiogene Wirkung im Zusammenhang der Biomaterialintegration beschreiben, allerdings beruhen diese Daten bisher nur auf *in vitro* Experimenten [Müller et al. 2018, 2016 (*a, b); Wang et al., 2017]. Eine Bestätigung durch *in vivo*

Studien fehlt. Aus diesem Grund war das übergeordnete Ziel dieser Arbeit den angiogenen Effekt von PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten auf die mikrovaskuläre Integration *in vivo* zu untersuchen. Die PCL-Gerüste, welche als Träger für die PolyP-Modifikation fungierten, wurden in dieser Arbeit mittels 3D-Druck hergestellt.

Für die *in vivo* Analyse wurde das Chorionalantoismembran-Assay (CAM-Assay) verwendet. Aufgrund der Verwendung eines lebenden Modellsystems ergaben sich verschiedenen Herausforderungen, die für die Durchführung der geplanten Experimente überwunden werden mussten. Zum einen mussten in Vorexperimenten die geeigneten Inkubationszeiträume für die modifizierten Biomaterialien im CAM-Assay definiert werden. Zum andern war es notwendig, verschiedene immunhistologische und intravitale Färbemethoden für das CAM-Assay zu etablieren, um qualitative sowie quantitative Analysen über die mikrovaskuläre Integration der modifizierten PCL-Gerüste durchführen zu können.

Neben den lichtmikroskopischen und immunhistologischen Analysen für eine deskriptiv qualitative Auswertung, sollte zusätzlich eine Quantifizierung angiogener Parameter auf der Grundlage einer intravitalmikroskopischen Färbung durchgeführt werden. Die bestimmten angiogenen Parameter waren Anzahl der Verzweigungspunkte, prozentuale Gefäßdichte, mittlerer Gefäßdurchmesser und mittlere Gefäßlängen. Nach abschließender statistischer Analyse der quantitativen Daten sollten Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse in Zusammenschau der existierenden Literaturdaten erfolgen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Biomaterialien in der Medizin

2.1.1 Biomaterialien in der regenerativen Medizin: Ein Überblick

Als Biomaterialien werden in der Medizin alle synthetischen, nichtlebenden Materialien bezeichnet, die nach Einbringung in den Körper das Potenzial besitzen, mit biologischen Systemen zu interagieren [Kopffleisch et al., 2017; Ratner et al., 2004]. Dabei sollten sie im optimalen Fall nach Implantation keine Fremdkörperreaktion, d. h. keine toxischen, allergischen oder immunologischen Reaktionen, auslösen [Zdolsek et al. 2007]. Materialien bei denen keine oder nur sehr geringe Fremdkörperreaktionen auftreten, werden auch als biokompatibel bezeichnet.

Die Wahl des entsprechenden Biomaterials wird im Wesentlichen von der zu erfüllenden Funktion im Körper bestimmt. Dabei gibt es verschiedene Kriterien bzw. Anforderungen, die an ein Biomaterial gestellt werden, wie z.B. eine strukturelle und/oder funktionelle Stabilität. In Tabelle 2.1 wird ein Überblick über die verschiedenen Materialien mit ihren Anwendungsgebieten in der Medizin gegeben. Am Beispiel von Titan und seinen Legierungen, welche häufig in der Zahnmedizin oder Orthopädie verwendet werden, übernimmt das Material beispielsweise nach Zahnverlust oder nach Knochenfraktur sowohl die strukturelle als auch die funktionelle Komponente des zu ersetzenden oder zu stabilisierenden Gewebes [Kaur et al., 2019; Ottria et al., 2018]. Andere Materialien wie Hydroxylapatit oder Kollagen übernehmen nach dem Auffüllen von Knochendefekten vorwiegend eine strukturelle Funktion als eine Art „Platzhalter“ während der Wundheilung oder für die Zeit nach der Implantation, bis der Körper das physiologische Gewebe nachgebildet hat bzw. das eingebrachte Biomaterial durch Narbengewebe ersetzt wurde [Noguchi et al., 2019; Schwarz et al., 2014]. In diesem Zusammenhang spielen insbesondere auch die physiko-chemischen Eigenschaften der verschiedenen Materialien eine Rolle. Dabei unterscheidet man zwischen nicht-resorbierbaren Materialien, welche möglichst langlebig und

korrosionsbeständig sein müssen von resorbierbaren Materialien, welche nur temporär eine bestimmte Funktion erfüllen.

Als Beispiel für nicht-resorbierbare Materialien sind vor allem Metalle wie Titan und seine Legierungen, Gold oder Edelstahl zu nennen. Des Weiteren finden Polymere wie z.B. Polyethylenterephthalat oder Polytetrafluorethylen als Gefäßprothesen in der Gefäßchirurgie oder generell als langlebige Nahtmaterialien Einsatz [Rodriguez et al., 2020; Amabili et al., 2020; Parry et al., 2018; Jensen et al., 2007].

Zu den resorbierbaren Materialien gehören in der Regel Polymere welche über verschieden Mechanismen (hydrolytisch, enzymatisch) vom Körper abgebaut werden und nach einer temporär funktionellen bzw. strukturellen Funktion vollständig abgebaut werden und durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden können [Miyaguchi et al., 2016; Pang et al., 2010; Ng et al., 2007].

Tabelle 2.1 Überblick über eingesetzte Materialien und Anwendungsgebiete in der Medizin [nach Heller, 2009].

Materialtyp	Materialien	Anwendungsgebiete	Beispiele
Metalle	Titan, Titan-Legierungen, Gold, Edelstahl	Funktioneller und struktureller Hartgewebeersatz	Knochenfrakturen, Zahnimplantate, Spondylodese
Nicht- resorbierbare Polymere	Polyethylenterephthalat, Polytetrafluorethylen	Gefäßprothesen, langlebige Wund- und Fasziennähte	Gefäßaneurysma/ Dissektion, Fasziennähte
Resorbierbare Polymere	Polyglycolsäure, Polymilchsäure, Polycaprolacton	Kleinere Wunden und Verletzungen	Resorbierbare Wundnähte

Zu nennen sind hier vor allem Polymere wie z.B. Polylactid, das als resorbierbares Nahtmaterial verwendet wird oder Polycaprolacton (PCL), welches aufgrund seiner Eigenschaften und der langsamen Biodegradation unter physiologischen Bedingungen in zahlreichen verschiedenen medizinischen Anwendungen

eingesetzt werden kann. In dieser Arbeit wurde mit modifizierten PCL-Gerüsten gearbeitet, weshalb im Folgenden auf dieses Material detaillierter eingegangen werden soll.

2.1.2 Polycaprolacton: ein vielseitiges Biomaterial

Neben den Metallen, die zu den häufigsten in der Medizin verwendeten Materialien gehören, stellt insbesondere Polycaprolacton (PCL) ein sehr vielseitiges Material dar, welches zahlreiche Einsatzgebiete in der Medizin kennt. Polycaprolacton ist ein biokompatibles, biodegradierbares und semikristallines Polymer, welches durch zwei Polymerisierungsverfahren (Polykondensation und Ring-Öffnungs-Polymerisation) hergestellt werden kann [Labet et al., 2009]. Neben der Biokompatibilität stellt insbesondere die Biodegradierbarkeit eine Eigenschaft dar, welche das Material für medizinische Anwendungen interessant macht. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass der Abbau von PCL zwischen einigen Monaten bis zu mehreren Jahren dauern kann und dass dieser Abbau auf autokatalytischen Prozessen und zufälliger hydrolytischer Spaltung der Polymerketten beruht [Lam et al. 2009; Sinha et al., 2004; Pitt et al. 1990, 1981]. Ein enzymatischer Abbau im menschlichen Körper existiert aufgrund des Fehlens der entsprechenden Enzyme nicht [Vert 2009].

Der Abbau lässt sich in folgende zwei Teilprozesse unterteilen: (1) Entstehung von Fragmenten mit einem Molekulargewicht von 5000 aufgrund der hydrolytischen Kettenspaltung, (2) Fortschreiten der Hydrolyse und Reduktion des Molekulargewichts der Fragmente. Die Reduktion des Materialgewichts erfolgt hierbei nicht in der ersten Phase des Abbauprozesses, da die Spaltung kleinerer Fragmente mit einem Molekulargewicht von <5000 erst in der zweiten Phase eine Diffusion der Fragmente aus dem Bulk des Materials ermöglicht [Sinha et al. 2004]. Aufgrund der relativ langsamen Degradation eignet sich PCL insbesondere für medizinische Anwendungen, bei denen eine längere Haltbarkeit oder langfristige Verweildauer im Körper nötig wird. So findet sich PCL z. B. in medizinischen Nahtmaterialien (Monocryl®, Ethicon) und Wundabdeckungen oder in Kompositmaterialien in der Zahnheilkunde um Wurzelkanäle zu füllen [Ng et al., 2007; Alani et al., 2009]. Ein weiteres medizinisches Einsatzgebiet von PCL sind *Drug-Delivery*-Systeme, bei denen Medikamente bzw. Wirkstoffe über einen

längeren Zeitraum freigesetzt werden können, wie es z. B. auch für Kontrazeptiva gewünscht ist [Sun et al., 2006; Zalfen et al., 2008]. In den letzten Jahren entstand erneut ein größeres Interesse an dem Material PCL in den Bereichen der regenerativen Medizin und des *Tissue Engineering*. So wurde der wissenschaftliche Fokus insbesondere auf die Bereiche der muskuloskeletalen und kraniofazialen Knochen- und Knorpelregeneration bzw. Knochenaugmentation gerichtet [Silva et al., 2020, Mellor et al., 2019; Onal et al. 2008; Agrawal et al., 2001] und die Eignung von PCL als Gerüstmaterial im *Tissue Engineering* untersucht [Dalton et al., 2009; Zein et al., 2002]. Bei der Herstellung von geeigneten Gerüsten aus PCL für das *Tissue Engineering* gibt es zahlreiche Fertigungsmöglichkeiten. Neben den zahlreichen konventionellen Methoden wie dem „porogen leaching“ und verschiedene Phasentrennungsmethoden auf die hier nicht näher eingegangen werden sollen, zeigt insbesondere der medizinische 3D-Druck großes Potenzial bei der Herstellung von individuell gefertigten und auf die jeweilige Fragestellung angepassten Gerüste aus PCL.

2.1.3 3D-Druck in der Medizin

Das Verfahren des 3D Drucks ist keine neue Methode und lässt sich bis in die 1980er Jahre zurückverfolgen [Hull, 1986; Whitaker, 2014]. Das Prinzip des 3D Druck-Verfahrens beruht auf der Herstellung von Objekten indem Schichten nacheinander Schicht für Schicht gedruckt werden. Dies bedeutet, dass die Schicht, auf die eine nächste Schicht aufgedruckt wird, zunächst aushärten muss. Dieses Aushärten ist abhängig vom Material und der verwendeten Druckmethode. Die verschiedenen Druckmethoden, welche in der Medizin Anwendung finden, werden im Folgenden aufgeführt [Heller et al., 2016]:

- Pulverbettverfahren (Sinterverfahren, Inkjet-Verfahren)
- Elektronenstrahlschmelzen
- Stereolithographie
- Schmelzschichtung

Bei den sogenannten Pulverbettverfahren werden Pulverschichten bzw. Pulverpartikel auf eine Druckplattform aufgebracht und anschließend entweder durch thermische Impulse oder durch chemische Verfahren eine Verbindung zwischen den Partikeln erzeugt. Durch diesen Prozess kann ein neuer Werkstoff

bzw. Festkörper hergestellt werden. Die thermischen Impulse werden bei Sinterverfahren z.B. durch Laserstrahlen erzeugt um Materialien wie Metalle oder Kunststoffe zu schmelzen, bei Inkjet-Verfahren werden Binderlösungen oder Klebstoffe verwendet, um eine Verbindung zwischen den Partikeln zu erzeugen und ein neues Objekt herzustellen [Heller et al., 2016; Vandenbroucke et al., 2007; Chumnanklang et al., 2007; Suchanek et al., 1997]. Bei der Methode des Elektronenstrahlschmelzens werden pulverförmige Metalle unter Vakuum mittels Elektronenstrahl zum Schmelzen gebracht. Hierdurch ist es möglich durch das Schmelzen von z. B. Titanpulver Titanimplantate herzustellen [Heller et al., 2016; Facchini et al., 2009]. Ein weiteres in der Medizin gängiges Verfahren ist die Stereolithografie. Bei diesem Verfahren werden spezielle photosensitive Kunststoffe verwendet, welche nach Anregung durch Licht bestimmter Wellenlängen ausgehärtet werden können. Dieses Aushärten geschieht in der Regel durch Laserstrahlung [Heller et al., 2016; Melchels et al., 2010]. Als letztes Verfahren im medizinischen 3D Druck, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde, ist das sog. Schmelzsichten zu nennen. Hierbei wird Kunststoff durch Erhitzen verflüssigt und in einen druckbaren Zustand gebracht. Anschließend wird das erhitzte Material über einen beheizbaren Druckkopf auf eine Druckplattform gedruckt [Neufurth et al., 2017; Heller et al., 2016; Zein et al., 2002]. Das Schmelzsichten ist ein Verfahren, mit dem unter anderem auch das Material Polycaprolacton gedruckt werden kann [Neufurth et al., 2017; Cao et al., 2003; Zein et al., 2002]. Das Grundprinzip des 3D Drucks am Beispiel des Schmelzsichtens (Fused Deposition Modeling) wird in Abbildung 2.1 dargestellt.

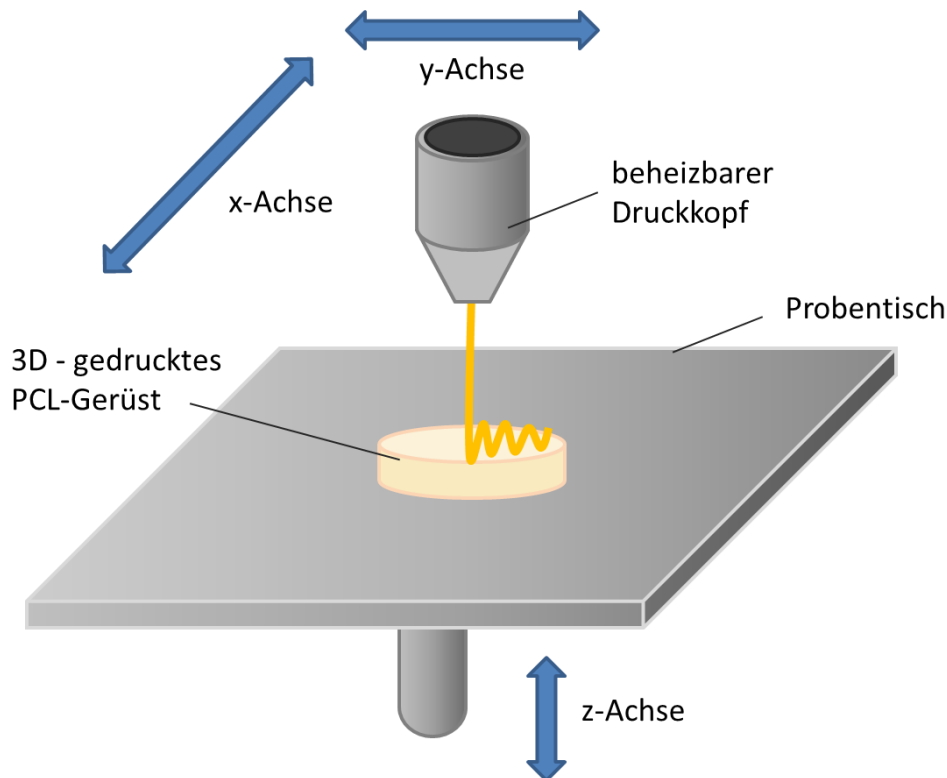


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des 3D-Drucks am Beispiel des Schmelzschichtens (Fused Deposition Modeling). Durch einen beheizbaren Druckkopf wird das Material erhitzt und in einen flüssigen und druckbaren Zustand versetzt. Anschließend kann das Material Schicht für Schicht in ein 3D-Objekt entsprechend der Raumachsen (X, Y, Z) gedruckt werden [nach <https://www.protec3d.de/3d-drucken/>].

2.2 Die medizinische Bedeutung von Biomaterialmodifikationen

Bei Fremdkörperreaktionen kommt es zu entzündlichen Prozessen, bei denen zunächst Entzündungszellen wie z.B. Makrophagen und Lymphozyten an der Materialoberfläche adhären. In der Folge werden durch Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verschiedene Prozesse der Entzündung in Gang gesetzt, wodurch es in der Folge zu einer überschießenden Bildung von Bindegewebe und somit zu einer Fibrose an der Grenzfläche von Implantat und Gewebe kommen kann [Kloppfleisch et al., 2017; Anderson et al., 2008; Chang et al., 2008; Luttkhuizen et al., 2006]. Am Beispiel von Implantaten, welche eine feste Verankerung im Knochen wie beispielsweise Zahnimplantate oder zementfreie Hüftimplantate benötigen, kann eine fibröse Kapsel die stabile Integration des Implantats verhindern und bis hin zum Verlust des Implantats führen. Um den beschriebenen unerwünschten Prozessen der Fremdkörperreaktion

entgegenzuwirken bzw. um das Einheilen der Biomaterialien zu verbessern, entstand das Forschungsfeld der Biomaterialmodifikation. Es gibt verschiedene Ansätze der Biomaterialmodifikation. Generell lassen sich Biomaterialmodifikation in 3 Klassen einteilen [Puleo et al., 1999]: (1) Physikochemische Modifikation, (2) Morphologische Modifikation und (3) Biochemische Modifikationen. Während bei der Physikochemischen Modifikation im Wesentlichen die Material- bzw. Oberflächeneigenschaften wie Oberflächenladungen und Oberflächenzusammensetzung durch verschiedene Materialzusammensetzungen bzw. Beschichtungen verändert werden, kommt es bei der morphologischen Modifikation zu einer Veränderung der Oberflächenstruktur bzw. Rauheit. Als Beispiele für eine physikochemische Modifikation sind vor allem Beschichtungen mit Calciumphosphat zu nennen, welche in der Zahnheilkunde bzw. in der Orthopädie breite Anwendung finden [Garcia-Gareta et al., 2017; Saleh et al., 2016]. Durch die Methode des 3D-Drucks ist es nunmehr auch möglich direkt Hydroxylapatitgerüste mit einer definierten Zusammensetzung zu drucken [Chumnanklang et al., 2007]. Bei der morphologischen Modifikation wird die Oberflächenstruktur durch verschiedene Techniken wie z. B. Sandstrahlen oder Ätzen z. B. von Titanoberflächen verändert [Heller et al., 2015, Kämmerer et al., 2011, Li et al., 2002]. Eine weitere Möglichkeit bei der Herstellung von definierten Oberflächenstrukturen ist z.B. die Fertigung mittels 3D-Druck. Hier konnte gezeigt werden, dass besonders die Größe und Verteilung der verwendeten Pulverpartikel im 3D Druck einen Einfluss auf die Verarbeitung und Oberflächentextur der gedruckten Gerüste hat [Spath et al., 2014].

Bei der biochemischen Modifikation können biologisch aktive Moleküle (Wachstumsfaktoren, Adhäsionspeptide, biochemische Signalmoleküle) direkt auf die Oberfläche von verschiedenen Materialien gekoppelt werden, um so das zelluläre Verhalten wie Adhäsion, Proliferation, Differenzierung direkt an der Grenzfläche von Gewebe und Implantat zu beeinflussen [Kämmerer et al., 2020; Hessenauer et al., 2018; Heller et al., 2018, 2015; Huh et al., 2011].

2.2.1 Biomaterialmodifikation zur Förderung der Blutgefäßbildung für eine verbesserte Einheilung von Implantaten

Im Kontext der Geweberegeneration von Knochen nach Implantation ist eine ausreichende Blutgefäßversorgung bzw. Neovaskularisation eine Voraussetzung für eine suffiziente Wundheilung bzw. erfolgreiche Integration von Implantaten [Heller et al., 2018, 2015; Kämmerer et al., 2011; Kanczler et al., 2008; Bauer et al., 2005]. Bei der Bildung von Blutgefäßen unterscheidet man grundsätzlich Angiogenese und Vaskulogenese. Während bei der Angiogenese die Bildung neuer Blutgefäßen aus bereits existierenden Gefäßen durch z. B. Aussprossen oder Intussuszeption entstehen, beschreibt der Prozess der Vaskulogenese die vollständige *de novo* Entstehung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen [Chung et al., 2011; Schmidt et al., 2007; Risau et al., 1997, 1995]. Die Kontrolle der hochkomplexen Prozesse während der Blutgefäßbildung unterliegt einer strengen Regulation von pro- und anti-angiogenen Faktoren wie z. B. verschiedene Wachstums- und Transkriptionsfaktoren. Zu den bekanntesten pro-angiogenen Faktoren zählen VEGF (*vascular endothelial growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), TGF (*transforming growth factor*), TNF- α (*tumor necrosis factor*), IL-8 (Interleukin-8) und Angiopoetin sowie HIF (*hypoxia-inducible factor*) [Moccia et al., 2019; Unger et al., 2015; Carmeliet et al., 2011].

Bei der Biomaterialmodifikation zur Förderung der Wundheilung bzw. der Blutgefäßneubildung konnten bereits verschiedene Ansätze in der Literatur erfolgreich demonstrieren, dass insbesondere eine Modifikation mit dem gefäßspezifischen Wachstumsfaktor VEGF pro-angiogene Effekte ausgelöst werden können. Dabei wurde VEGF mittels verschiedener chemischer Oberflächenkopplungen auf Materialien bzw. Gerüste aus Polycaprolacton, Kollagen oder Gelatine gebunden und in verschiedenen *in vitro* oder *in vivo* Experimenten analysiert. Es zeigten sich deutliche Effekte auf die zelluläre Antwort, wie Zellwachstum, Zellüberleben, Migration und Proliferation *in vitro* sowie ein fördernder Effekt auf das Wachstum von Blutgefäßen *in vivo* [Xu et al., 2018; Zhao et al., 2016; Shen et al., 2015; Koch et al., 2012, 2006; Ito et al., 2005].

Auch andere wissenschaftliche Ansätze konnten demonstrieren, dass es möglich ist, durch die Kopplung von extrazellulären Matrixproteinen wie z.B. Kollagen und

Fibronectin auf Titan die Adhäsion von Endothelzellen *in vitro* positiv zu beeinflussen oder durch die Beschichtung von Polyethylen mit Vitronectin die Angiogenese *in vivo* zu fördern [Hessenauer et al., 2018; Heller et al., 2015]. Ein ähnlicher Effekt konnte erzielt werden, nachdem man Adhäsionspeptide wie das RGD-Peptid kovalent auf Titan gekoppelt hat. Hier zeigte sich eine Förderung der Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen als Antwort auf die verwendeten Adhäsionspeptide [Kämmerer et al., 2011].

2.2.2 Biomaterialmodifikation mittels anorganischem Polyphosphat zur Förderung der mikrovaskulären Implantatintegration

Neben den Biomaterialmodifikationen mittels Wachstumsfaktoren wie VEGF entstand in den letzten Jahren ein größeres Interesse an alternativen Faktoren zur Förderung der Angiogenese im Kontext der mikrovaskulären Biomaterialmodifikation. Insbesondere im Zusammenhang der Knochenregeneration und Angiogenese wurde intensiv an anorganischem Polyphosphat (PolyP) als „metabolischem Brennstoff“ bzw. Modulator der Angiogenese geforscht [Müller et al., 2018; Wang et al., 2017]. Im Zusammenhang der Knochenregeneration konnte in einigen Studien beschrieben werden, dass PolyP im Zusammenhang der Knochenregeneration nach Komplexbildung mit Calcium-Ionen die Prozesse der Knochenmineralisierung von Osteoblasten fördert und darüber hinaus noch die Expression und Aktivität der alkalischen Phosphatase und des „Bone Morphogenic Proteins“ erhöht [Müller et al., 2011, 2015; Wang et al., 2013]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PolyP-modifizierte Materialien bzw. Gerüste sowohl für die osteochondrale Regeneration als auch für die Induktion der Osteogenese eingesetzt werden können. Interessanterweise konnte neben den fördernden Effekten auf die Knochenbildung ein fördernder Effekt auf die Gefäßbildung bzw. gefäßbildenden Zellen *in vitro* beschrieben werden [Müller et al., 2018, 2016 (*a, b); Wang et al., 2017]. Es lassen sich in der Literatur allerdings hierzu auch widersprüchliche Daten finden. Aus Arbeiten der Krebsforschung konnte man eine Hemmung der Tumormetastasierung durch PolyP nachweisen und führte diesen Effekt auf seine anti-angiogene Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zurück [Han et al., 2007]. Zu der Widersprüchlichkeit der Literaturdaten kommt hinzu, dass auf dem Gebiet

der Biomaterialforschung bislang überwiegend *in vitro* Daten zu finden sind, welche einen pro-angiogenen Effekt durch PolyP beschreiben. Für die in dieser Arbeit verwendeten PCL-Gerüste bzw. deren fördernde Wirkung auf die Angiogenese nach PolyP-Modifikation existieren jedoch bislang noch keine *in vivo* Studien.

2.3 Analyse der mikrovaskulären Integration von Biomaterialien *in vivo*

Für die Analyse angiogener Effekte im Kontext der mikrovaskulären Integration von modifizierten Biomaterialien eignen sich grundsätzlich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Modelle. Jedoch haben die verschiedenen Modellsysteme je nach Fragestellung nur eine begrenzte Aussagekraft und lassen sich nur schwer auf die physiologischen Gegebenheiten im menschlichen Körper übertragen. Obwohl sich *in vitro* Modelle gut eignen, um beispielsweise in verschiedenen Zellkultur-Systemen isolierte Zellreaktionen wie z. B. Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung detailliert zu untersuchen, erlauben diese Systeme in der Regel keine Aussagen bzw. Rückschlüsse auf Zusammenhänge im lebenden Organismus unter physiologischen Bedingungen. Deshalb bieten verschiedene *in vivo* Modelle insbesondere für die Beantwortung weiterführender bzw. komplexere Fragestellungen im Kontext der Biomaterialintegration bzw. der Angiogenese gewisse Vorteile. Ein intensiv untersuchtes *in vivo* Modelle für die Untersuchung der Angiogenese ist das sog. CAM-Assay im befruchteten Hühnerei. In Abbildung 2.2 ist eine schematische Darstellung eines Hühnerembryos dargestellt.

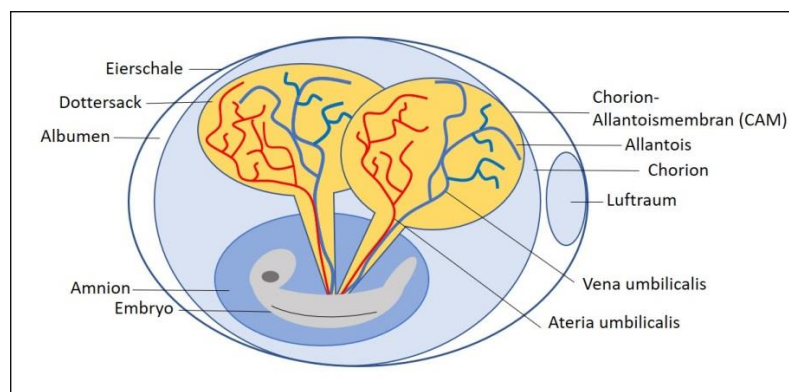


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung eines Hühnerembryos [nach Dombre et al., 2017 und Wolpert, 1999]

Die CAM entsteht nach Verschmelzen der Chorion- und Allantoismembran und stellt das respiratorische System des Hühnerembryos dar, welches den Embryo mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Aufgrund der starken Vaskularisierung eignet sich die CAM gut, um Prozesse der Angiogenese im Allgemeinen oder z.B. im Zusammenhang der Tumorangiogenese und Metastasierung *in vivo* zu analysieren [Deryugina & Quigley; 2008; Ribatti et al., 2010, 1999; Schlatter et al., 1997; Wilting et al., 1991]. Des Weiteren können verschiedenen Biomaterialien auf die CAM aufgebracht werden, um angiogene Prozesse detailliert zu beobachten und auszuwerten [Mangir et al., 2019].

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Abzugshaube mc6 R	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen im Allgäu
Analytischer Sieb(Siebgröße 250 µm, 500 µm)	Retsch, Haan
Autoklav 550	ELVC System GmbH, Wettenberg
Brutmaschine Modell 3000	Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg
Becherglas	Vital GmbH, Großostheim
Brutschrank HERACELL 150i Co2 Incubator	Heraeus, Hanau
Binokular	WILD Heerburg
Deckgläser	Diagonal GmbH & Co. KG
Eppendorf Safelock-Tubes 0,5 ml/1 ml/2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
FlowTM Hera Safe	Heraeus Thermo Electron Corporation, Hanau
Olympus BXFM-Intravital Mikroskop	Olympus, Hamburg
Gefrierschrank Forma -20°C	Thermo fisher Scientific, Schwerte

Gefrierschrank -80°C	Heraeus Thermo Electron Corporation, Hanau
Gewebeband (Leukosilk S)	BSN Medical GmbH, Hamburg
Handschuhe sempercare R	SATRA Technolog Centre, UK
Eppendorf-Einkanalpipetten (1000 µl, 200 µl, 20 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Kanüle (G21, G30) Microlance™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Keyence Digital Mikroskop VHX-600	Keyence, Neu-Isenburg
Kühlschrank profi line	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Lichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
White Leghorneier	LSL Rhein-Main, Dieburg
Mikrotom RM 2165	Leica Biosystems, Nussloch
Nalgene filter 0.45 mm Porengröße	Cole-Parmer, Wertheim
Nikon Eclipse TE 2000-K	Nikon GmbH, Düsseldorf
Nikon TMS	Nikon GmbH, Düsseldorf
Objekträger	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
PipetusR	Hirschmann Laborgeräte, Eierstadt
Parafilm „M“ R	Bemis, Wisconsin, USA
Rahmen mit Schwamm	Agilent Technologies, Glostrup, Denmark
Präparierbesteck (Schere, Pinzette, Spatel)	CLS Medizintechnik und Vertrieb, Krebeck-Renshausen

Silver Nitrate Applicator 75% (Silbernitratstäbchen)	Bray Group Ltd., Farngdon, England
Spritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml)	Braun, Kronberg im Taunus

3.1.2 Chemikalien

Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Alkohol/Ethanol (70%) (EtOH)	Carl Roth, Karlsruhe
CaCl ₂	Sigma, Taufkirchen
destilliertes Wasser	(Aqua dest.) aus der Hausanlage
Entellan Mounting Medium	Merck KGaA, Darmstadt
FITC-Dextran	Sigma, Taufkirchen
Formalin (4%)	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Fisher Scientific, Loughborough, England
Mayer's Hämalun	Merck KGaA, Darmstadt
0,9 % NaCl-Lösung	Braun Deutschland GmbH, Melsungen
Na-Polyphosphat	Chemische Fabrik, Budenheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Poly-e-Caprolakton	Polysciences Europe, Hirschberg
Terralin liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt

Wasser (H ₂ O)	(autoklaviert)
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Appllichem, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

3.1.3 Puffer und Lösungen

FITC-Dextran Lösung	5 % (w/v) FITC-Dextran in 0,9 % NaCl-Lösung
PBS (Dulbecco)	8 g/l NaCl, 0,2mg/l KCl, 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Physiologische Kochsalzlösung	0,9 % NaCl

3.1.4 Antikörper

Tabelle 3.1 Auflistung der eingesetzten primären Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	eingesetzte Verdünnung
Anti-CD 31, WM59, Gene Tex	Mouse monoclonal	1:75
Anti-vWF, DAKO	Rabbit polyclonal	1:350
Anti-SMA, 1A4, Sigma	Mouse monoclonal	1:750

Tabelle 3.2 Auflistung des eingesetzten sekundären Antikörpers

Sekundärer Antikörper	Spezies	eingesetzte Verdünnung
EnVision (Agilent, Waldbronn)	Mouse/Rabbit	Ready to use

3.1.5 Software

ImageJ 1.51n

Wayne Rasband, National
Institute of Health, Rockville
Pike Bethesda, USA

bioplotter RP 3.0 software

Envisiontec, Gladbeck

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der PolyP-modifizierten Polycaprolacton-Gerüste

Die PolyP-modifizierten PCL-Gerüste wurden von der AG Müller (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsmedizin Mainz) mittels 3D Drucker hergestellt. Für die Herstellung der Partikel (Sektion 3.2.1.1 – 3.2.1.3) wurden die Protokolle der AG Müller verwendet [Neufurth et al., 2017].

3.2.1.1 Herstellung amorpher Ca-PolyP Mikropartikel

Für die Herstellung der PolyP-modifizierten PCL-Gerüste wurde pulverförmiges Poly-ε-Caprolacton mit einer relativen molekularen Masse von 50.000 und einer Partikelgröße von < 600 µm verwendet. Des Weiteren wurden amorphe Ca-PolyP-Mikropartikel hergestellt. Hierfür wurde eine Mischung aus $\text{Ca}[\text{CaCl}_2]:\text{P}[\text{PolyP}]$ mit einem Gewichtsverhältnis von >2 verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde 2,8 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ gelöst in 50 ml Ethanol tropfenweise zu 1 g Na-PolyP gelöst in 50

ml destilliertem Wasser bei Raumtemperatur zugegeben. Die erhaltene Suspension wurde bei pH 10 für 5 Stunden gerührt. Durch Filtration unter Verwendung eines Nalgene Filters mit einer Porengröße von 0,45 mm wurden die Mikropartikel gesammelt und anschließend mit Ethanol gewaschen und übernacht bei 60°C im Ofen getrocknet.

3.2.1.2 Herstellung des PCL/Ca-PolyP Kompositmaterials

Das Kompositmaterial für die Verwendung im 3D Drucker wurde durch Mischen der PCL und Ca-PolyP Partikel im Verhältnis 2:1 [w/w] hergestellt. Um ein Verklumpen des Komposits später im Drucker zu verhindern, wurden die Partikel durch ein analytisches Sieb mit einer Siebgröße von 250 µm gesiebt. Um eine homogene Mixtur zu erzielen wurde die erhaltene PCL/Ca-PolyP Mischung zusätzlich durch einen 500 µm Sieb gesiebt. Die fertige Partikel Mixtur wurde bei 4°C gelagert.

3.2.1.3 3D-Druck der PolyP-modifizierten PCL-Gerüste

Für das Drucken der PCL-Gerüste wurde der Drucker (EnvisionTEC, Gladbeck) verwendet. Vor dem Drucken wurden die Edelstahl-Patronen des Druckers mit dem Kompositmaterial befüllt und anschließend der Druckkopf auf 100 °C erhitzt. Nach dem Schmelzen wurde die Patrone solange mit dem Kompositpulver aufgefüllt, bis die Patrone fast vollständig gefüllt war. Für die Erstellung der 3D Modelle des PCL-Gerüsts mit einem Durchmesser von 10 mm und 1,5 mm Höhe wurde die Software „The bioplotter 3.0 verwendet. Die Dicke des Druckstrahls aus der Drucknadel wurde auf 400 µm, der Abstand zwischen den Strängen auf 1,4 mm und gemessen vom Zentrum zweier benachbarter Stränge der Abstand auf 1 mm gesetzt. Die Schichtdicke mit der gedruckt wurde, wurde auf 320 µm gesetzt. Während des Druckens wurde die Orientierung der gedruckten Stränge im Gerüst für jede abgeschlossene Schicht um 45° gedreht, was in einer Strangorientierung von 0°, 45°, 90°, 135°, und 180° resultierte. Für die Herstellung der PCL/Ca-PolyP-MP Gerüste, die Betriebssoftware Visualmachines 2.8.115 wurde auf folgende Parameter eingestellt: Druck 7,8 bar, Geschwindigkeit 3 mm/s, pre-flow delay 0.3 s, post-flow delay 0.1 s, Wartezeit zwischen den Schichten 5 s, Nadel offset 0.32 mm. Das Drucken eines Gerüsts nahm ca. 8 min für die Kontrollgerüste aus PCL und 3 min für die PCL/Ca-PolyP Gerüste in Anspruch.

Nach dem Drucken wurden die Gerüste für 2 min abgekühlt. Für die Sterilisation wurden die Gerüste für 30 min in 70 % Ethanol inkubiert. Anschließend wurden sie unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Flow Bank getrocknet, in sterile und luftundurchlässige Behälter überführt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Qualitätskontrolle erfolgten Überprüfungen der Gerüste unter dem Elektronenmikroskop.

3.2.2 Chorionallantoismembran-Assay

3.2.2.1 Versuchsaufbau und Vorbereitung der befruchteten Hühnereier

Die befruchteten Hühnereier wurden vor Versuchsbeginn gründlich mit aqua dest. gereinigt. Bevor die Eier waagrecht in den Bebrüter gelegt wurden, wurde die Oberseite der Eier markiert und für die gesamte Zeit der Bebrütung in derselben Position gehalten. Die Orientierung der Embryoachsen und die Entwicklung der CAM werden durch die Schwerkraft bestimmt, sodass sich die CAM bzw. der Embryo an der bodenabgewandten Seite entwickelt. Die Bebrütung erfolgte im Bebrüter und die Temperatur wurde auf 38,7 °C eingestellt. Die Luftfeuchtigkeit wurde durch regelmäßiges Befüllen der Wasserbehälter im Bebrüter konstant gehalten. In dieser Arbeit wurden die Eier immer an Tag 3 geöffnet und ab diesem Zeitpunkt erfolgte eine tägliche Kontrolle der Vitalität und auf Kontaminationen. Der Versuch startete mit der Positionierung der Biomaterial-Gerüste an Tag 4 und wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen, also Bebrütungstag 11, verfolgt. Während die lichtmikroskopischen Analysen an Tag 1, 3 und 7 erfolgten, wurden die immunhistologischen und intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Angiogenese 7 Tage nach Biomaterial-Inkubation (Bebrütungstag 11) durchgeführt. In Abb. 3.1 ist der zeitliche Ablauf der CAM-Experimente in einem Zeitstrahl dargestellt.

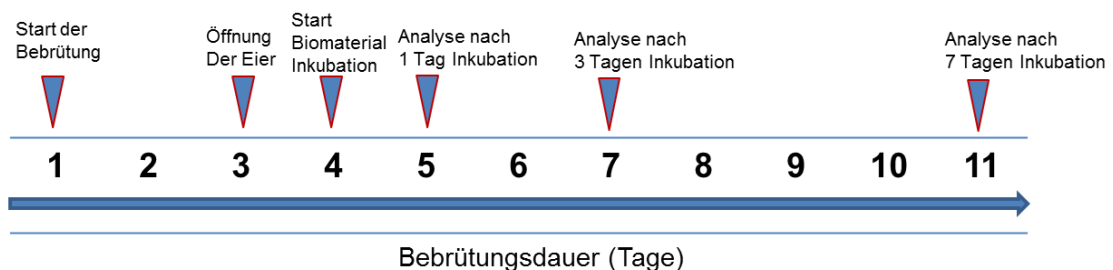


Abbildung 3.1 Zeitlicher Ablauf der CAM-Experimente

3.2.2.2 Präparation der Hühnereier

Das Öffnen der befruchteten Hühnereier erfolgte an Bebrütungstag 3. Hierfür wurden die Eier mit der markierten Seite nach oben aus dem Bebrüter genommen. Um die CAM bzw. den Embryo beim Aufschneiden des Eis nicht zu verletzen, wurde zunächst zwischen 8-10 ml Eiweiß aus dem Ei entnommen, damit sich die CAM bzw. der Embryo von der Oberfläche der Eierschale entfernen konnte. Die Entnahme des Eiweiß erfolgte mit einer 10 ml Spritze und einer 21G-Kanüle, mit der an dem spitzen Pol des Eis vorsichtig eingestochen wurde, dabei war darauf zu achten in einem relativ flachen Winkel zum Pol einzustechen, um keine lebenswichtigen Strukturen zu verletzen. Das Injektionsloch wurde nach Abziehen der Eiweißflüssigkeit mit Tesafilm verschlossen. Als Vorbereitung für das Eröffnen des Eis wurde die markierte Oberseite mit Leukotape Klebeband abgeklebt. Dies sollte verhindern, dass beim Aufschneiden des Eis zum einen Risse im Ei entstehen und zum anderen Teile der Eierschale in das Ei fallen würden. Nach dem Abkleben erfolgte das Einstechen mit einer spitzen Präparationsschere im Bereich der abgeklebten Seite in das Ei. Ausgehend von der Einstichstelle wurde nun eine ca. 1 x 2 cm große ovale Öffnung in das Ei geschnitten. Die Öffnung wurde mit Parafilm verschlossen und die Bebrütung im Inkubator fortgesetzt.

3.2.2.3 Die Inkubation mit Polycaprolacton-Gerüsten

Die Inkubation der CAM mit den PCL-Gerüsten startete an Tag 4 der Bebrütung. Hierfür wurden die Eier aus dem Bebrüter genommen und die PCL-Gerüste (Kontrolle und PolyP-modifizierte PCL-Gerüste) vorsichtig auf die sich entwickelnde CAM aufgelegt. Dabei war darauf zu achten, dass die PCL-Gerüste möglichst zentral auf die CAM aufgelegt wurden, ohne dabei die Gerüste auf den Embryo zu legen. Die Inkubation der Gerüste wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen (Bebrütungstag 11) durchgeführt. Für jeden Versuchsansatz bzw. jede Probencharge wurden Triplettmessungen durchgeführt und in drei unabhängigen Experimenten reproduziert.

3.2.2.4 Beendigung der Inkubation und Entnahme der PCL-Gerüste

Nach 7 Tagen der Inkubation mit den PCL-Gerüsten wurden die Versuche mit der Intravitalmikroskopie bzw. der Entnahme der PCL-Gerüste zusammen mit der

CAM für die immunhistologischen Untersuchungen beendet. Bei der Entnahme war darauf zu achten, dass die Gerüste mit einer Pinzette auf der CAM fixiert wurden, bevor sie vorsichtig mit einer Präparationsschere zusammen mit der CAM herauspräpariert wurden. Beim Herauspräparieren wurde an den Rändern der CAM ein Überstand von ca. 5 - 10 mm zu den Gerüsten herausgeschnitten. Das Heraustrennen des Gerüsts ohne die CAM bedeutete den Verlust und das Verwerfen der Probe.

3.2.2.5 Immunhistologische Analyse der CAM

3.2.2.5.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Für die immunhistologische Analyse der CAM-Präparate wurde die CAM zusammen mit den PolyP-Gerüsten aus den Eiern herauspräpariert und zunächst für 24h in 4 % Formalin fixiert. Das anschließende Einbetten in Paraffin erfolgte in Einbett-Kassetten. Hierfür wurden die CAM-Gewebe zusammen mit den PolyP-Gerüsten zwischen einem saugfähigen Papier aufgespannt und in die Einbett-Kassetten überführt. Das Einbetten erfolgte manuell mittels aufsteigender Alkoholreihe sowie Xylol.

Nach dem Einbetten folgte das Schneiden der Präparate mittels Mikrotom. Dabei wurde die CAM in den Bereichen mittig durch die PCL-Gerüste, d.h. innerhalb der porösen Strukturen geschnitten. Die 5 µm dünnen Querschnitte wurden mit histologischen und immunhistologischen Methoden angefärbt. Vorbereitend wurden die Schnitte zunächst in destilliertes Wasser und anschließend auf Objektträger überführt. Das Glätten der Präparate erfolgte in einem 50 °C warmen Wasserbad. Schließlich wurden die Präparate senkrecht stehend bei 40 °C über Nacht getrocknet.

Tabelle 3.3 Aufsteigende Alkoholreihe während des Einbettens

Zyklus	Substanz	Temperatur	Dauer
1x	Ethanol 50 %	RT	1 Stunde
1x	Ethanol 70 %	RT	1 Stunde
1x	Ethanol 80 %	RT	1 Stunde
1x	Ethanol 90 %	RT	1 Stunde
2x	Ethanol 100 %	RT	1 Stunde
2x	Xylol	RT	1 x 1 Stunde 1x über Nacht
2x	Paraffin	60°C	1 x 1 Stunde 1x über Nacht

3.2.2.5.2 Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung handelt es sich um eine Routine- bzw. Übersichtsfärbung, um eine grobe Beurteilung der verschiedenen Gewebetypen zu ermöglichen. Nach HE-Färbung erscheinen die Zellkerne blau, wohingegen sich Cytoplasma rot darstellen. Für die HE-Färbung wurden die Präparate zunächst entparaffiniert. Nach 2 x 5 min Inkubation in Xylol folgte eine absteigende Alkoholreihe mit je 5 min Inkubation in 100%, 90%, 80%, 70% Isopropanol und einem anschließenden Waschschrift für 5 min in aqua dest. Für die weitere Färbung wurden die Präparate zunächst für 5 min in Mayers Hämalaun (Firma Roth, ready to use) gefärbt und im Anschluss erst für 5 Sekunden mit aqua dest. gespült und dann für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen, gefolgt von einem weiteren Waschschrift in aqua dest. für 2 Minuten. Es folgte die Färbung für 2-3 min in Eosin 0,5 % (Roth/ je 100 ml → 1 Tropfen Eisessig) mit anschließendem Spülen in Leitungswasser für 5 Sekunden. Anschließend wurden die Proben jeweils für 2 Minuten nacheinander in 80 % und 90 % Isopropanol und

dann für 3 min in 100 % Isopropanol inkubiert. Zum Schluss wurden die Präparate 2 x 5 min in Xylol inkubiert und schließlich in Eukitt (Sigma Aldrich) eingedeckt.

3.2.2.5.3 Immunhistologische Färbungen

Für die Identifizierung und morphologische Analyse der Gefäßstrukturen innerhalb der CAM wurden verschiedene Gefäß-spezifische Oberflächenmarker immunhistochemisch gefärbt. Das Prinzip der Färbung basiert auf einer Antikörper-Antigen Reaktion, bei der Antikörper an Gewebe-spezifische Antigene (Epitope) binden und sich durch einen 2. Antikörper, welcher mit einem Farbstoff gekoppelt ist, nachweisen lassen. In dieser Arbeit wurde anstatt des 2. Antikörpers ein spezielles Polymer mit dem Handelsnamen EnVision (Agilent, Waldbronn) verwendet, welches mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase markiert und zusätzlich mit anti-Maus und anti-Rabbit Immunglobulinen konjugiert ist. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen wurden folgende Primärantikörper verwendet:

- CD31
- von Willebrand
- alpha-SMA

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert. Hierfür wurden die Präparate zuerst 2 x für 5 min in Xylol inkubiert. Im Anschluss folgte eine absteigende alkoholische Reihe mit 100%, 90%, 80%, 70% Isopropanol für jeweils 5 min mit einem abschließenden Waschschrift für 5 min in aqua dest.

Für die Färbung wurden die Präparate zunächst für 5 Minuten in TBS/Tween inkubiert und anschließend demaskiert. Die Antigendemaskierung erfolgte für CD31 mit einer 30-minütigen 10 mM Tris/1 mM EDTA (pH: 9,0) Inkubation, für vWF mit einer 10-minütigen Proteinase K (Dako) Inkubation und für alpha-SMA mit einer 30-minütigen 10 mM Citratpuffer (p: 6,0) Inkubation. Nach der Demaskierungsschritt wurden die Präparate für 20 Minuten in Methanol/Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (80 ml Methanol + 2 ml H₂O₂ 30%) inkubiert. Es folgte ein kurzer Waschschrift in aqua dest., gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation in TBS/Tween. Vor der eigentlichen Antikörper Inkubation wurde für 1 Stunde ein

Blockierungsschritt mit Normalserum aus der Ziege (Verdünnung 1:10 in PBS/BSA durchgeführt. Anschließend wurden die Primärantikörper in PBS/BSA verdünnt: CD31 (1:75), vWF (1:350) und alpha-SMA (1:750) und die Proben bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Es folgten zwei 5-minütige Waschschriffe in TBS/Tween bevor mit EnVision (Agilent, ready to use) für 30 min inkubiert wurde. Nach zwei weiteren Waschschriffen für 5 Minuten TBS/Tween folgte die Färbung mit DAB und Hämalaun. Die DAB-Lösung (Dako, ready to use) wurde auf die Präparate gegeben und für 1 min bei RT inkubiert. Nach der anschließenden Hämalaun Färbung (Roth) folgte eine aufsteigende alkoholische Reihe in 70%, 80 % und 90 % Isopropanol und dann für 5 min in 100 % Isopropanol, um anschließend 2 x für 5 min in Xylol zu inkubieren. Schließlich wurden die Präparate in Eukitt (Sigma-Aldrich) eingedeckt und mikroskopisch analysiert. In den ersten Analysen zeigte sich, dass für vWF keine Färbung nachweisbar war, weshalb im weiteren Verlauf dieser Arbeit keine Färbung mit diesem Antikörper durchgeführt wurde.

3.2.2.6 Visualisierung und qualitative Analyse der Angiogenese mittels Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte unter Verwendung des digitalen Lichtmikroskops Keyence Digital Microscope VHX-600. Für die deskriptiv morphologische Analyse der mikrovaskulären Integration der PCL-Gerüste wurden die Proben nach Tag 1, 3 und 7 untersucht, um möglichst eine zeitliche Entwicklung der Gefäßbildung abbilden zu können. Zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten wurde neben einer Übersichtsaufnahme für jede Probe bei 20-facher Vergrößerung eine detailliertere Auswertung der Bereiche innerhalb des Gerüsts bzw. der Randbereiche bei 200-facher Vergrößerung durchgeführt. Für jede Probe wurden 3 Gesichtsfelder aufgenommen und in die Analyse integriert.

3.2.2.7 Visualisierung der Gefäße in der CAM mittels Intravitalmikroskopie

Für die Intravitalmikroskopie war es entscheidend den geeigneten Untersuchungszeitpunkt zu ermitteln, da eine erfolgreiche Injektion des intravitalem Farbstoffs FITC-Dextran erst nach einer ausreichenden Bebrütung und Entwicklung des Gefäßsystems möglich war. Aufgrund der Tatsache, dass in den

lichtmikroskopischen Analysen erst nach 7 Tagen eine sichtbare Interaktion der PCL-Gerüste mit der CAM zu beobachten waren und nach dieser Inkubationszeit (Bebrütungstag 11) die Gefäße optimal für eine Injektion darstellbar waren, erfolgten in dieser Arbeit sämtliche intravitalmikroskopischen Analysen an Tag 7 nach der Biomaterialinkubation. Für die Injektion des Farbstoffes FITC-Dextran in das Gefäßsystem der CAM wurden 1 ml Spritzen und 30G Kanülen verwendet. Vor der Injektion wurde die 5% FITC-Dextran Lösung in 0,9 % NaCl in die Spritze aufgezogen und die Spritze gründlich entlüftet. Anschließend wurde mit der 30G Kanüle ein ausreichend großes und oberflächliches Gefäß punktiert und 50 µl FITC-Dextran-Lösung injiziert. Nach dem Herausziehen der Kanüle musste die Blutung sofort mit einem Silber-Nitrat-Stäbchen gestoppt und geschlossen werden um ein Verbluten des Embryos zu verhindern. Nach erfolgter FITC-Dextran Injektion folgte die Intravitalmikroskopie. Für jede Probencharge wurden Triplett-Messungen durchgeführt. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Durchgängen wiederholt.

3.2.2.8 Quantifizierung angiogener Parameter

Für eine Quantifizierung der mikrovaskulären Integration der PCL-Gerüste wurden angiogene Parameter wie die Anzahl der Verzweigungspunkte, prozentuale Gefäßdichte, mittlere Gefäßdurchmesser und mittlere Gefäßlängen analysiert. Für sämtliche Analysen dieser Parameter wurde auf der Grundlage der intravitalmikroskopischen Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung innerhalb eines jeden Gesichtsfeldes wurden fünf Bildbereiche möglichst gleichmäßig und repräsentativ mit einer Größe von $0,04 \text{ mm}^2$ über die Aufnahme verteilt (Gesamtgröße der Fläche pro Gesichtsfeld $0,2 \text{ mm}^2$) und innerhalb dieser Bereiche die jeweiligen Berechnungen für die verschiedenen Parameter durchgeführt (Abb. 3.2). Für die Analyse der Verzweigungspunkte wurde die Anzahl in jedem definierten Bereich ausgezählt. Für die Analyse der Gefäßdichte wurde die prozentual belegte Fläche der Gefäße innerhalb der fünf definierten Bildbereiche mittels Software ImageJ bestimmt. Hierfür wurde über den Schwellenwert der Graustufen die Gefäße definiert und anschließend die Fläche, welche von Gefäßen bedeckt war, berechnet. Für die Berechnung der Gefäßdurchmesser wurden innerhalb der fünf definierten Bereiche der Gesichtsfelder jeweils fünf Gefäßdurchmesser über die Anzahl der Pixel mittels Software „ImageJ“ bestimmt.

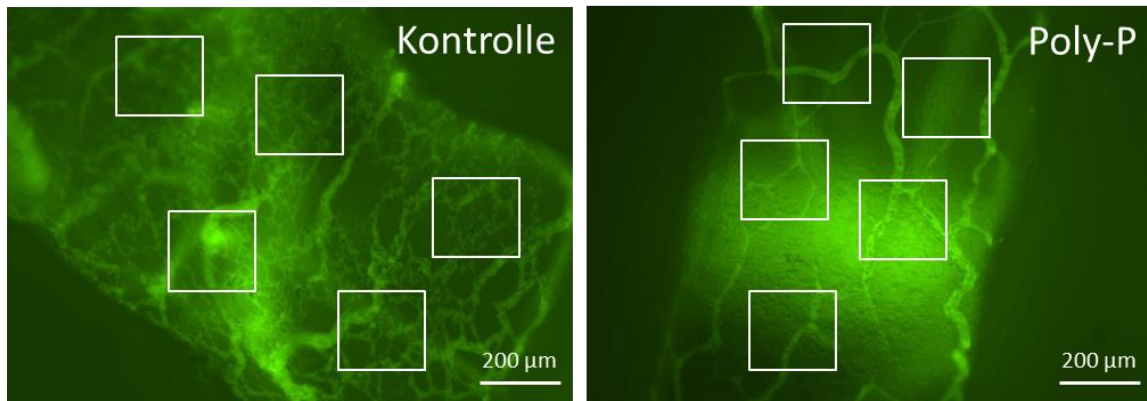


Abbildung 3.2 Analyse der mikrovaskulären Integration. Gezeigt ist die zufällige Definition der fünf Bildbereiche mit jeweils $0,04 \text{ mm}^2$.

Die Anzahl der Pixel wurde anschließend in μm umgerechnet. Für die Bestimmung der Gefäßlängen wurden die Bilddateien zunächst in ein 16 bit Format umgewandelt. Anschließend wurden die Gefäße durch eine integrierte Zeichenfunktion nachgezeichnet, um den Kontrast zu erhöhen. Anschließend konnten die nachgezogenen Gefäße über den Schwellenwert der Graustufen isoliert werden. Nach Umwandlung in eine binäre Datei und mittels der Funktion „Skeletonize“ konnten die Verzweigungspunkte definiert und schließlich die Längen der verschiedenen Gefäßabschnitte innerhalb der definierten Bildbereiche analysiert werden (Abb. 3.3). Für jede Probencharge wurden Triplettmessungen in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt, in denen die verschiedenen angiogenen Parameter bestimmt wurden.

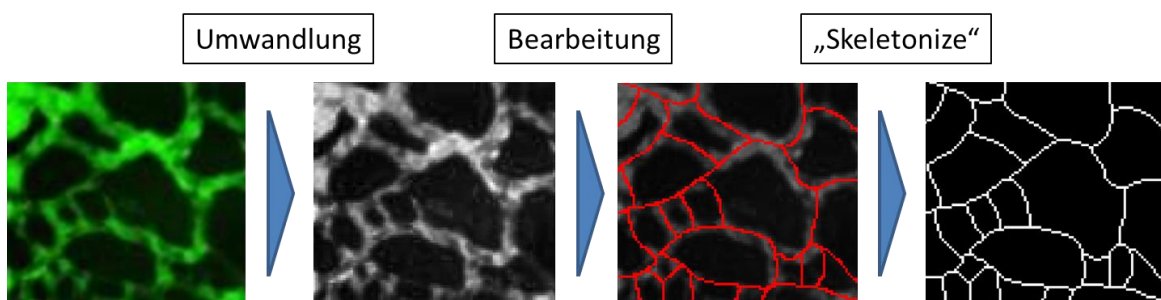


Abbildung 3.3 Software-basierte Bildbearbeitung mittels Software „ImageJ“ zur Berechnung der mittleren Gefäßlängen.

3.2.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung für die Untersuchung der angiogenen Parameter wurde in SPSS Statistics 23 von IBM durchgeführt. Für jeden Versuchstag wurden

mindestens fünf befruchtete Eier angesetzt und mit den Kontroll-Gerüsten bzw. PolyP-modifizierten PCL-Proben einer der insgesamt 3 Chargen für 7 Tage inkubiert. Während der 7-tägigen Inkubation kam es regelmäßig zu einem Verlust von Eiern aufgrund von Entwicklungsstörungen oder einem Verlust der Gerüste innerhalb der Eier. Dennoch konnten für jeden Versuchsdurchgang mindestens eine dreifach-Messung in insgesamt drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) durchgeführt werden. Signifikanzen wurden anhand der Mittelwerte und Standardabweichungen mittels zweiseitigem T-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (* = $p<0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung der Polycaprolacton-Gerüste

Die PCL-Gerüste wurden wie unter 3.2.1.3 beschrieben mit einem Durchmesser von 10 mm und 1,5 mm Höhe gedruckt. Die Dicke der Stränge betrug ca. 400 μm und der Abstand zwischen benachbarten Strängen ca. 1 mm. Wie sich erkennen lässt, sind die Stränge in der horizontalen Ebene in jeder gedruckten Schicht um 45° gedreht, weshalb eine Strangorientierung von 0° , 45° , 90° , 135° , und 180° resultiert (Abb 4.1A). Bei näherer Betrachtung (Abb. 4.1 B) zeigen sich leichtgradige Unregelmäßigkeiten in den Stärken der gedruckten Stränge der Gerüste. Aufgrund der wechselnden Strangorientierung und der beschriebenen Unregelmäßigkeiten ergeben sich poröse Strukturen in unterschiedlicher Größe.

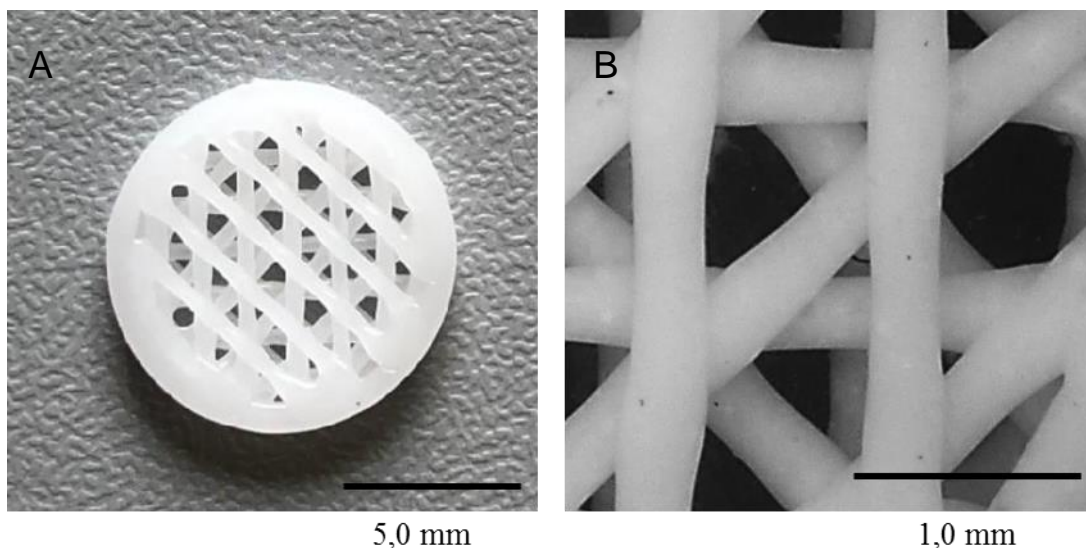


Abbildung 4.1 Darstellung der porösen PCL Gerüste. A) Die 3D gedruckten PCL-Gerüste zeigen eine poröse Struktur aufgrund der wechselnden Orientierung der Stränge in der horizontalen Ebene um 45° . B) Durch die wechselnde Strangorientierung und die unregelmäßige Stärke der gedruckten Stränge ergeben sich poröse Strukturen mit unterschiedlichen Porengrößen.

4.2 Mikroskopische Analyse der Blutgefäße

Die lichtmikroskopische Analyse der PCL-Gerüste wurde durchgeführt, um Veränderungen in der angiogenen Antwort bzw. Unterschiede in der Gefäßmorphologie und somit der mikrovaskulären Integration der Gerüste in die CAM durch PolyP-modifizierte PCL-Gerüste im Vergleich zu den unmodifizierten Kontrollen zu untersuchen. In den lichtmikroskopischen Übersichtsaufnahmen (Abb. 4.2) kann zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein Unterschied zwischen den PolyP-modifizierten Gerüsten und den Kontroll-Proben in Bezug auf die mikrovaskuläre Integration beobachtet werden. Während die Proben nach 24 Stunden und 3 Tagen weitestgehend auf der CAM aufliegen und keine Interaktion zwischen Proben und CAM mikroskopisch zu beobachten ist, zeigt sich nach 7 Tagen, dass sowohl die Kontroll-Proben als auch die PolyP-modifizierten Proben in die CAM eingesunken sind bzw. von ihr umwachsen werden. Hier kann eine deutliche Interaktion zwischen den Gerüsten und der CAM beobachtet werden, was an dem glänzenden CAM-Gewebe innerhalb der porösen Gerüststrukturen zu erkennen ist.

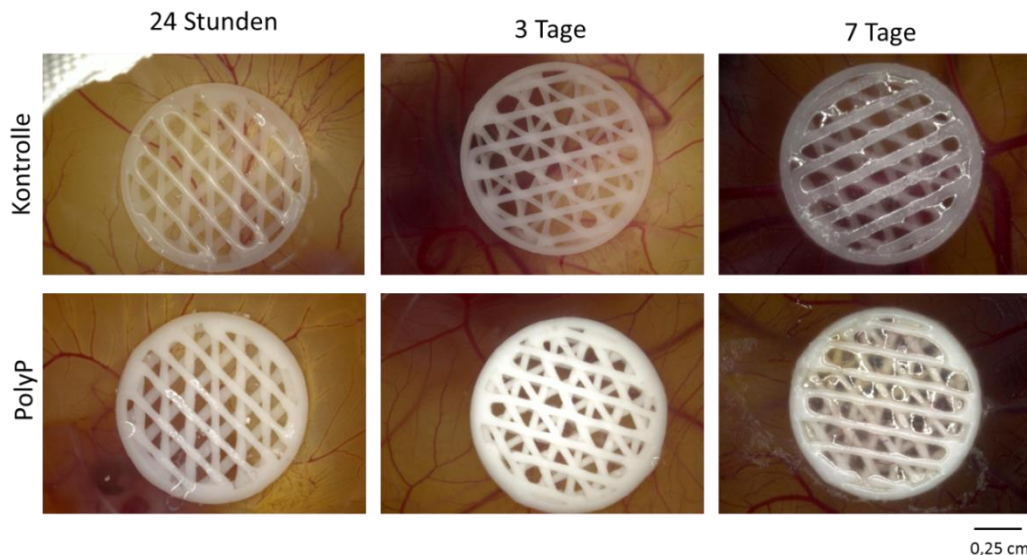


Abbildung 4.2 Übersichtsaufnahmen der PCL-Gerüste (Kontrolle vs. PolyP-modifiziert) nach Inkubation auf der CAM nach 24 Stunden, 3 Tagen und 7 Tagen. Nach 24 Stunden und 3 Tagen erkennt man, dass die PCL-Gerüste auf der CAM aufliegen und es zu keiner erkennbaren Interaktion zwischen Gerüsten und CAM gekommen ist. Auch Unterschiede in der mikrovaskulären Reaktion auf die modifizierten PCL-Gerüste lassen sich nicht erkennen. Nach 7 Tagen zeigt sich, dass sowohl die Kontroll-Probe als auch die PolyP-modifizierte Probe in die CAM integriert wurde. Das Gewebe hat die Gerüste umwachsen, was durch das glänzende Gewebe innerhalb der porösen Strukturen der PCL-Gerüste zu erkennen ist. Vergrößerung: 20-fach.

Um die angiogene Antwort bzw. die mikrovaskuläre Integration der Gerüste weiter zu untersuchen, wurden die Gerüste insbesondere in den Randbereichen (Abb. 4.3) und innerhalb der porösen Strukturen (Abb. 4.4) an den Untersuchungszeitpunkten nach 24 Stunden, 3 Tagen und 7 Tagen genauer untersucht. Bei der Analyse der Randbereiche zeigen sich nach 24 Stunden und 3 Tagen feine mikrovaskuläre Netzwerke, welche nicht in Interaktion mit den Gerüsten treten. Ein Unterschied zwischen den kapillären Netzwerken in den Randbereichen der verschiedenen Proben (Kontrolle und PolyP-modifiziert) lässt sich nicht erkennen. Nach 7 Tagen zeigt sich in Übereinstimmung zu den Übersichtsaufnahmen, dass es zu einer Interaktion zwischen den Gerüsten und der CAM gekommen ist. Es ist deutlich zu erkennen, dass die PCL-Gerüste (Kontrolle und PolyP-modifiziert) von der CAM umwachsen bzw. in die CAM integriert werden.

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Analyse der porösen Strukturen innerhalb der Gerüste. Weder nach 24 Stunden noch nach 3 Tagen zeigt sich eine Interaktion zwischen den PCL-Gerüsten und der CAM. Auch ein Unterschied der mikrovaskulären Strukturen im Vergleich der Kontrollen zu den PolyP-modifizierten Proben lässt sich nicht beobachten. Nach 7 Tagen kann man erkennen, dass eine mikrovaskuläre Integration der PCL-Gerüste in die CAM stattgefunden hat. Diese Integration kann gleichermaßen für die Kontroll-Gerüste wie auch für die PolyP-modifizierten Proben beobachtet werden. In Bezug auf die Gefäßmorphologie bzw. Gefäßdichte zeigt sich jedoch ein Unterschied. Während sich bei den Kontroll-Proben ein dichtes Gefäßnetzwerk darstellt, so erscheinen die mikrovaskulären Gefäße in den porösen Strukturen der modifizierten PCL-Gerüste vergleichsweise weniger verzweigt und somit weniger dicht. Ein Unterschied in der Gefäßdicke bzw. Größe ist im Vergleich der beiden Proben nicht zu erkennen. Bei genauer Betrachtung zeigen sich zudem bei den PolyP-modifizierten Proben blinde Gefäßenden bzw. Gefäßstümpfe.

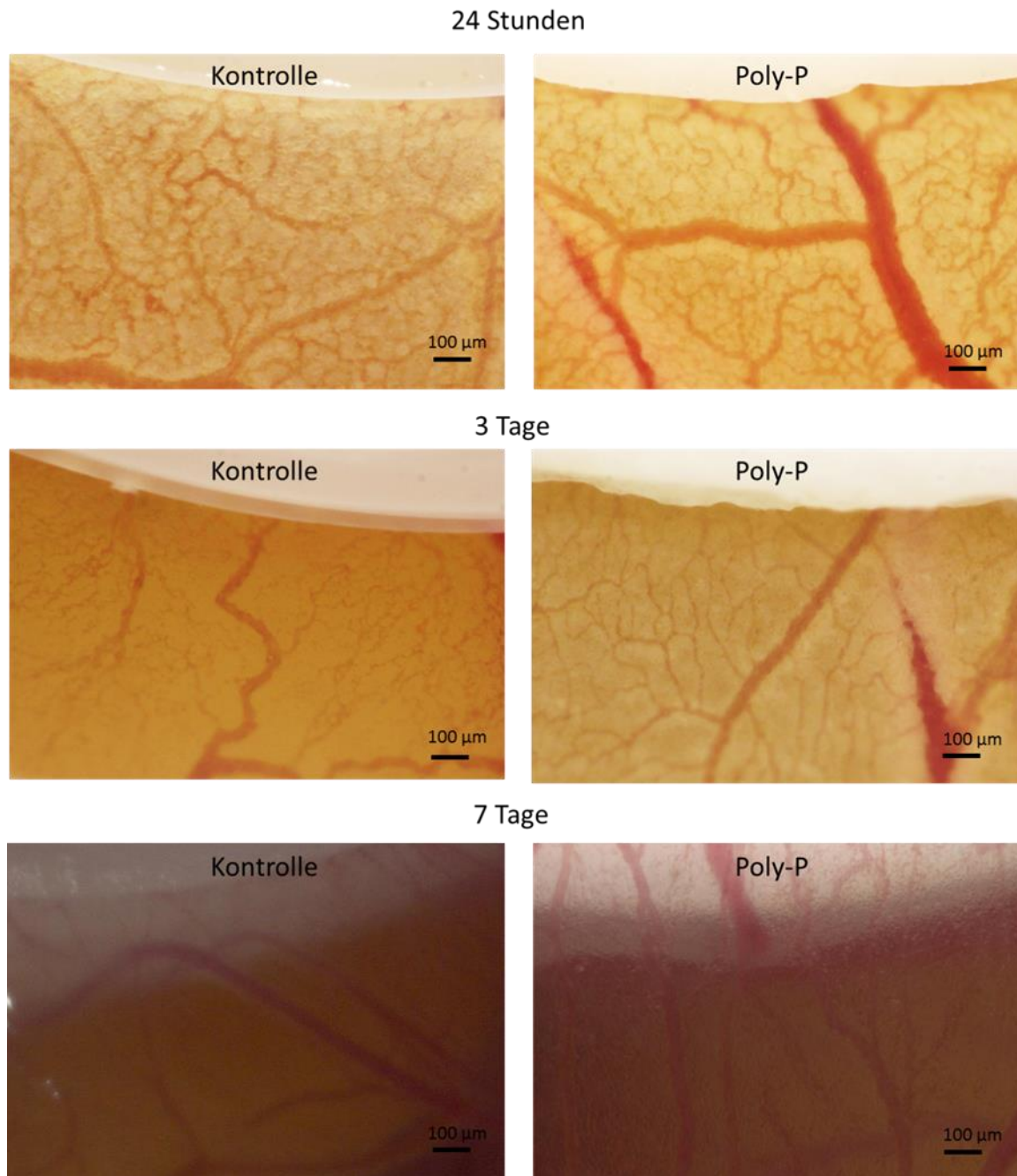


Abbildung 4.3 Analyse der mikrovaskulären Integration der PCL-Gerüste (Kontrolle vs. PolyP) nach 24 Stunden, 3 Tagen und 7 Tagen in den Randbereichen. Es zeigt sich nach 24 Stunden und 3 Tagen in den Kontrollen und PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten ein mikrovaskuläres Netzwerk, welches aber scheinbar nicht mit den Gerüsten interagiert. Es kann kein Unterschied der kapillären Netzwerke im Vergleich der Kontrollen mit den modifizierten Proben beobachtet werden. Nach 7 Tagen zeigt sich eine Interaktion zwischen den Gerüsten und der CAM. Hier hat eine Integration sowohl der Kontrolle als auch der PolyP-modifizierten Probe in die CAM stattgefunden. Vergrößerung: 200-fach.

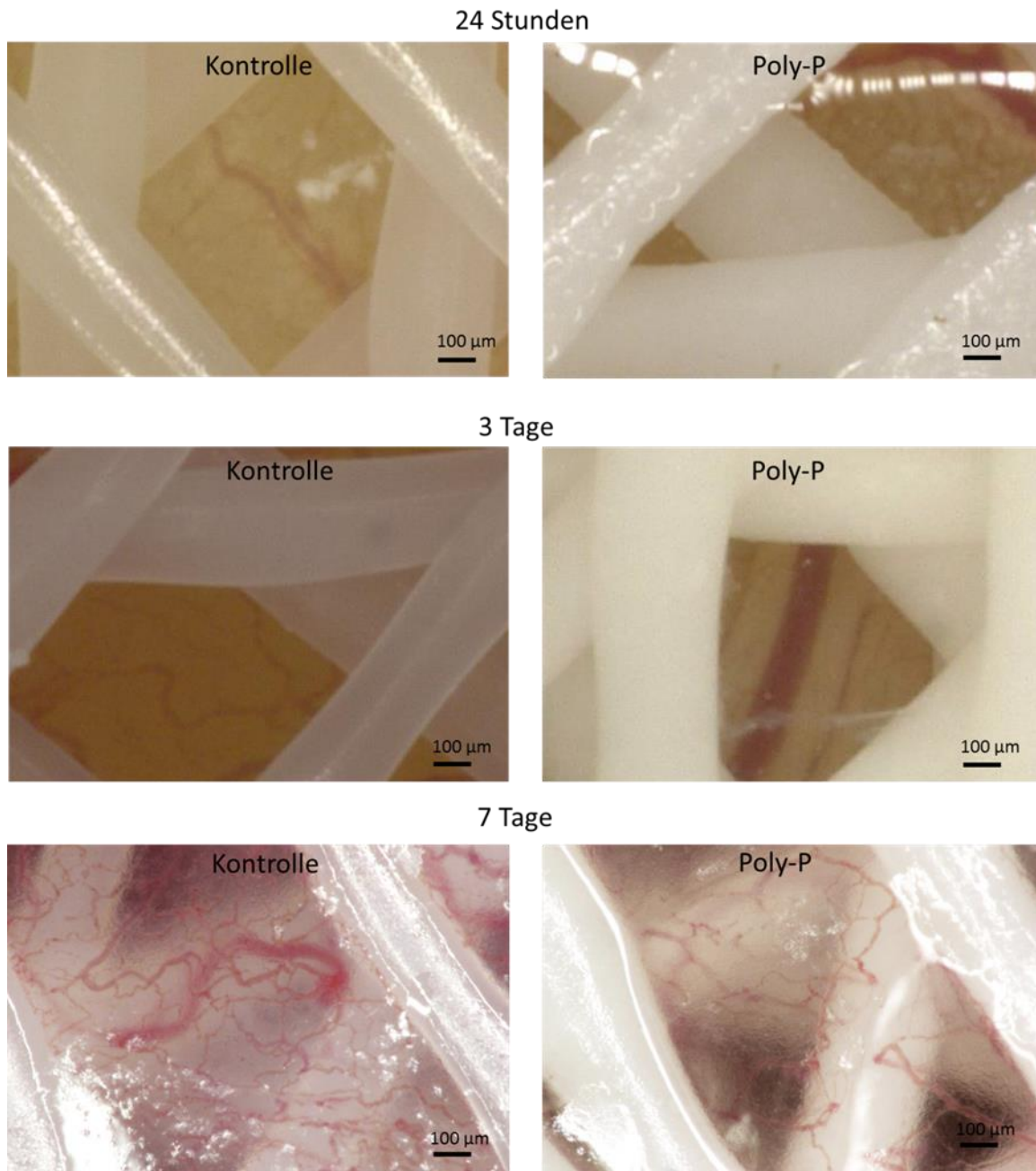


Abbildung 4.4 Analyse der mikrovaskulären Integration der PCL-Gerüste (Kontrolle vs. PolyP) nach 24 Stunden, 3 Tagen und 7 Tagen innerhalb der porösen Strukturen der PCL-Gerüste. Es zeigt sich nach 24 Stunden und 3 Tagen in den Kontrollen und PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten ein mikrovaskuläres Netzwerk, ohne sichtbare Interaktion der Gefäße mit den Gerüsten. Nach 7 Tagen zeigen sich eine Interaktion zwischen den Gerüsten und der CAM und eine sichtbare Integration der Gerüste. In Bezug auf die mikrovaskuläre Integration zeigte sich im Vergleich von Kontrolle und modifizierter Probe, dass in der Kontrolle ein dichteres Gefäßnetzwerk zu sehen ist. Im Gegensatz hierzu sind die Gefäßnetzwerke in den modifizierten Proben vergleichsweise reduziert. Des Weiteren erkennt man teilweise blinde Gefäßenden in den PolyP-modifizierten Proben. Vergrößerung: 200-fach.

4.3 Immunhistologische Analyse der mikrovaskulären Integration

Um die mikrovaskuläre Integration innerhalb der CAM genauer beurteilen zu können, wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden die CAM-Präparate in den Bereichen der porösen Strukturen mittig durch die PCL-Gerüste mittels Mikrotom geschnitten. Für eine erste Beurteilung und Differenzierung der verschiedenen Gewebetypen innerhalb der CAM wurde eine HE-Färbung der Gewebeschnitte nach 7 Tagen durchgeführt.

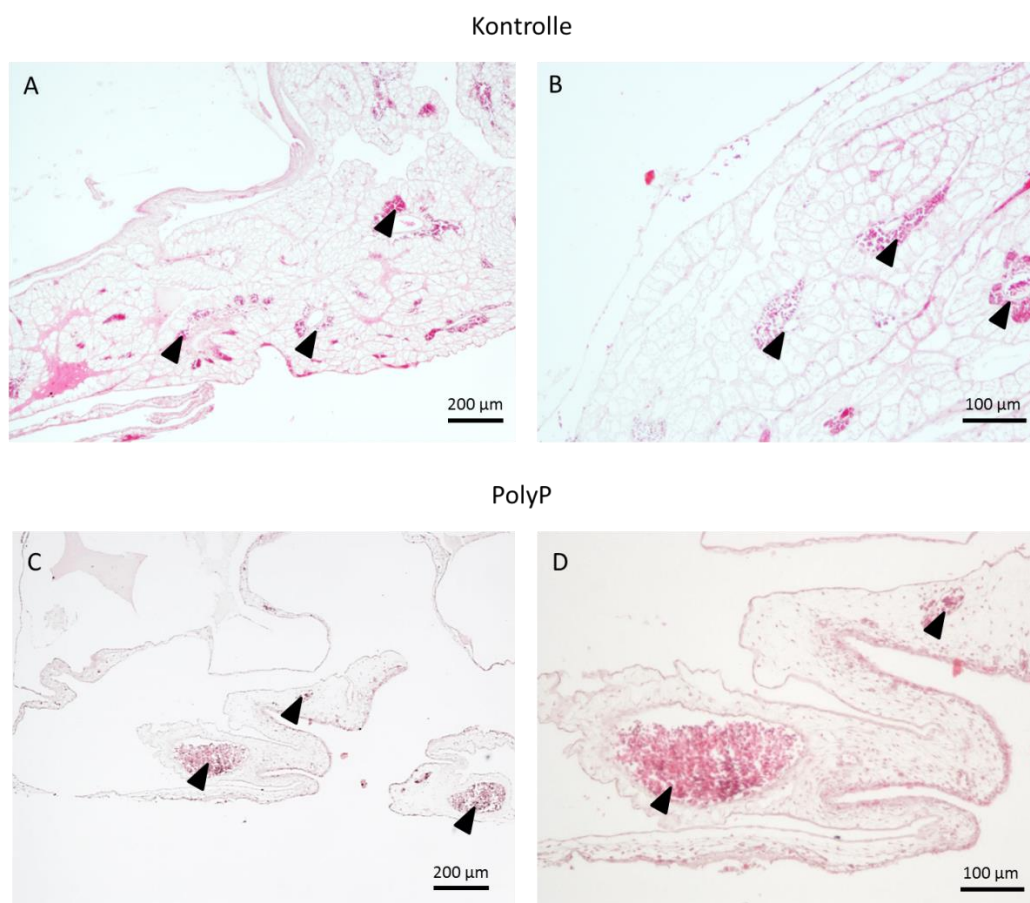


Abbildung 4.5 HE-Färbung histologischer Schnitte von Kontroll-Proben zur qualitativen Analyse der CAM-Gewebe. Die CAM-Präparate wurden in den Bereichen der porösen Strukturen mittig durch die PCL-Gerüste mittels Mikrotom geschnitten. Sowohl in den Kontrollproben (A, B) als auch in den Proben, welche mit PolyP modifiziert sind (C, D) erkennt man Gefäßstrukturen, welche Erythrozyten enthalten und gleichmäßig in der CAM verteilt sind. Vergrößerung: A, C: 40-fach, B, D: 100-fach.

Sowohl in den Kontroll-Proben als auch in den mit PolyP-modifizierten Proben zeigen sich Gefäßstrukturen in der CAM, welche Erythrozyten beinhalten (Abb. 4.5

A, B, schwarze Pfeile). Die Gefäßstrukturen sind gleichmäßig innerhalb der CAM verteilt und in Bindegewebe eingebettet.

Die Gefäß- bzw. Endothelzell-spezifischen Färbungen (CD31 und α -SMA) zeigen Unterschiede in der Intensität und Spezifität der Färbereaktionen der verschiedenen primären Antikörper (Abb. 4.6, HE, schwarze Pfeile). Sowohl die Endothelzell-spezifische CD31 Färbung als auch die Gefäß-spezifische α -SMA Färbung zeigt positiv gefärbte Areale in den Proben.

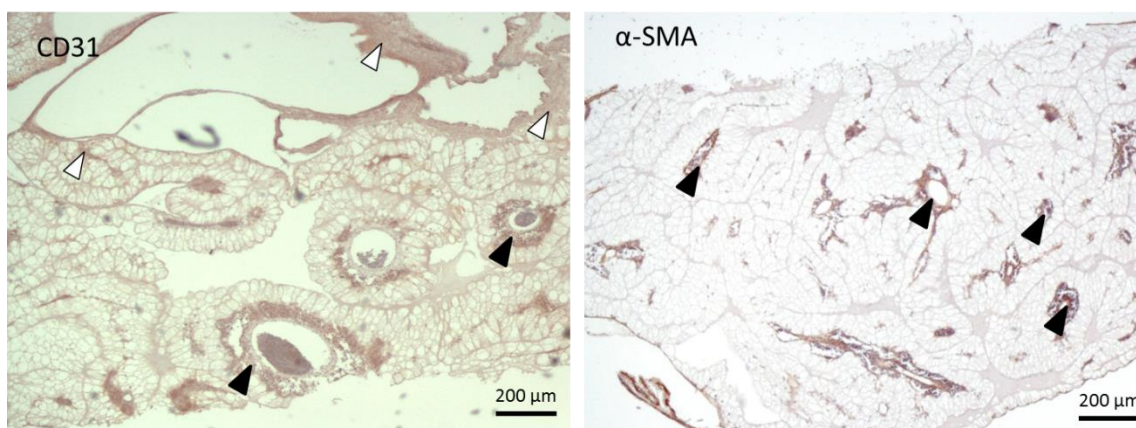


Abbildung 4.6 Endothelzell-spezifische CD31 bzw. Gefäß-spezifische α -SMA Färbung von histologischen CAM-Schnitten zur Beurteilung der Färbung. Für die Testung der verschiedenen Antikörper wurden CAM-Proben verwendet, welche mit unmodifizierten PCL-Gerüsten inkubiert wurden. Die endothelzellspezifische CD31 Färbung und die Gefäß-spezifische α -SMA Färbung zeigen positive Areale (schwarze Pfeile). In den Proben welche mit CD31 gefärbt wurden, erkennt man teilweise auch unspezifische gefärbte Bereiche und eine Hintergrundfärbung (weiße Pfeile). Vergrößerung: 40-fach.

Bei genauerer Betrachtung zeigt sich für CD31, dass einige Gefäßstrukturen angefärbt sind (Abb. 4.6, CD31, schwarze Pfeile). Jedoch lassen sich auch Bereiche erkennen, in denen eine unspezifische Farbreaktion ohne erkennbare Gefäßstrukturen stattgefunden hat (Abb. 4,6, CD31, weiße Pfeile). Die Färbung mit α -SMA zeigt eine deutliche Färbung der Gefäßstrukturen (Abb. 4.6, α -SMA, schwarze Pfeile)

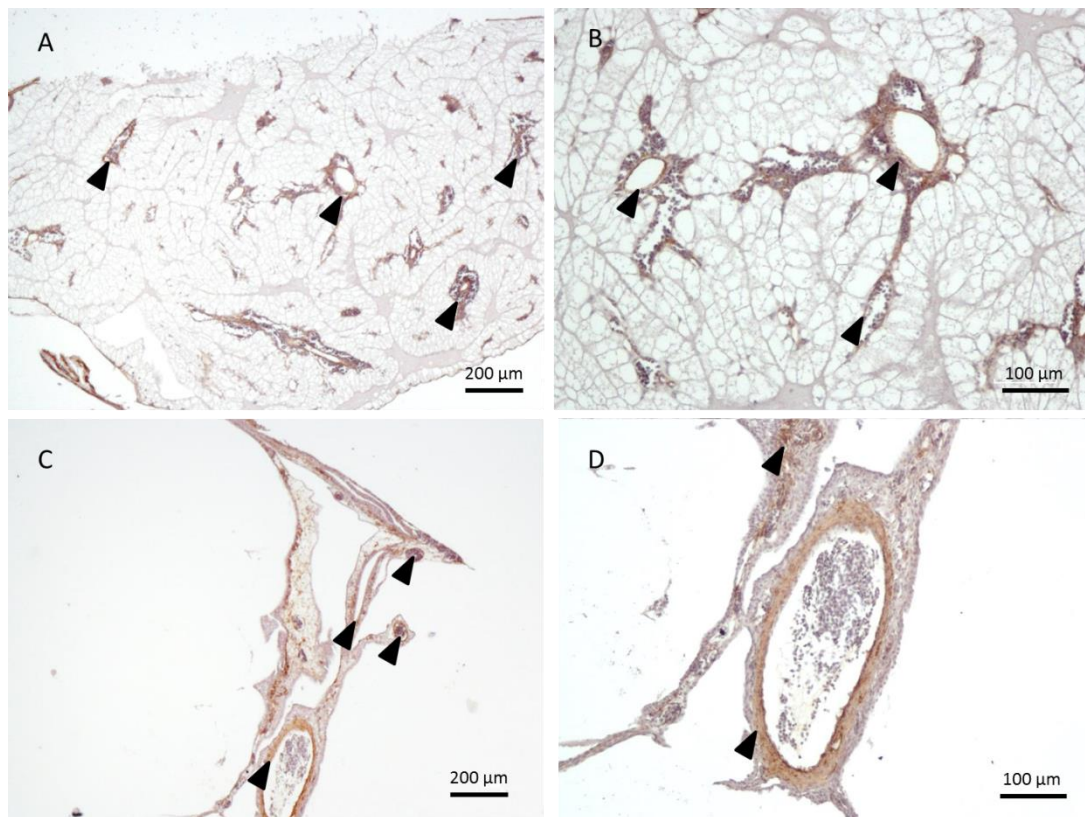


Abbildung 4.7 Färbung der histologischen Präparate mittels anti- α -SMA. Es zeigen sich sowohl in der Kontrolle (A, B) als auch in den Proben welche mit PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten inkubiert wurden (C, D) spezifisch angefärbte Gefäßstrukturen und eine gleichmäßige Verteilung der Gefäße innerhalb der CAM. Vergrößerung: A, C: 40-fach, B, D: 100-fach.

Aufgrund der unspezifisch gefärbten Bereiche durch den Endothelzell-spezifischen CD31 Antikörper, wurden diese Proben in die Auswertung nicht miteinbezogen. Für α -SMA wurden insgesamt aus drei unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Chargen der hergestellten PCL-Gerüste histologische Schnitte angefertigt und ausgewertet. (Abb. 4.7). Es zeigen sich sowohl in den Kontrollen als auch in den PolyP-modifizierten Proben spezifisch angefärbte Gefäßstrukturen. Zudem sind in den verschiedenen Proben sowohl kleine als auch große Gefäße zu sehen, welche gleichmäßig in der CAM verteilt sind. Unterschiede zwischen den Kontrollproben und den modifizierten Proben können nicht beobachtet werden.

4.4 Intravitalmikroskopische Analyse der mikrovaskulären Integration

Integration

Nach der lichtmikroskopischen und immunhistologischen qualitativen Beurteilung der mikrovaskulären Integration der PCL-Gerüste, erfolgte eine quantitative Analyse der angiogenen Parameter mittels Intravitalmikroskopie. Für diese Analyse wurden verschiedene angiogene Parameter wie Anzahl der Verzweigungspunkte, prozentuale Gefäßdichte, mittlere Gefäßdurchmesser und mittlere Gefäßlängen für die Beurteilung herangezogen.

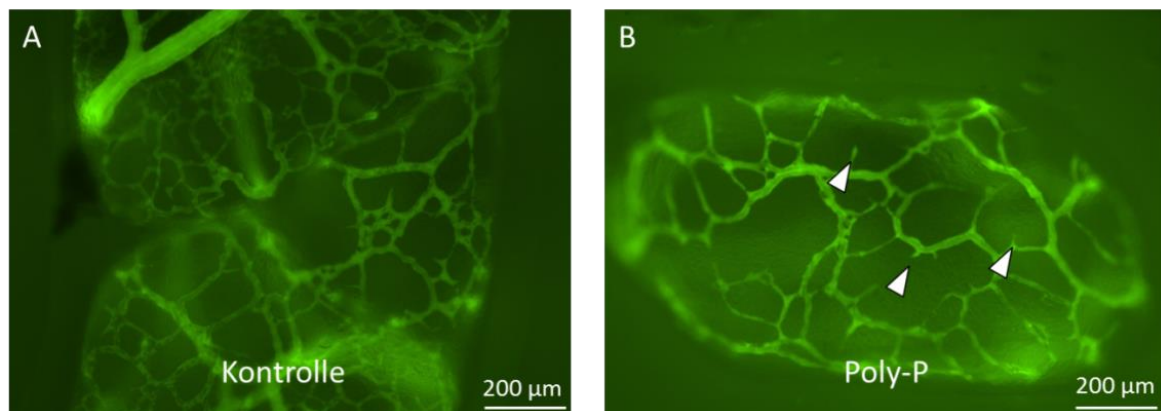


Abbildung 4.8 Intravitalmikroskopische Aufnahmen nach Färbung mit FITC-Dextran. A) In den Kontrollen sieht man ein dicht verzweigtes Gefäßnetzwerk. Im direkten Vergleich zeigt sich in den Proben, welche mit PolyP-modifizierten Gerüsten inkubiert wurden, eine geringere Gefäßdichte, mit einer geringeren Anzahl an Verzweigungspunkten und blinden Gefäßenden. Vergrößerung: 100-fach.

Nach Injektion des fluoreszierenden Farbstoffes FITC-Dextran in das Gefäßsystem der sich entwickelnden CAM, wurden die Gefäßstrukturen innerhalb der porösen Strukturen der PCL-Gerüste evaluiert. Es zeigt sich in einer ersten Übersicht, dass sich sowohl in den Kontrollen als auch in den Proben, welche mit PolyP modifiziert wurden, fein verzweigte Gefäßnetzwerke (Abb. 4.8) ausgebildet haben. In Übereinstimmung mit den lichtmikroskopischen Aufnahmen erkennt man ein dichteres und stärker verzweigtes Gefäßnetzwerk in den Kontrollen im Vergleich zu den Proben, welche mit den PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten inkubiert wurden. Neben der vergleichsweise geringeren Verzweigungsdichte zeigen sich in den PolyP-Proben zudem blinde Gefäßenden (Abb. 4.8, B, weiße Pfeile). Insgesamt erscheint das Gefäßnetzwerk in den Kontrollen unorganisierter

mit einer höheren Anzahl an kleinen Gefäßen im Vergleich zu den PolyP-modifizierten Proben.

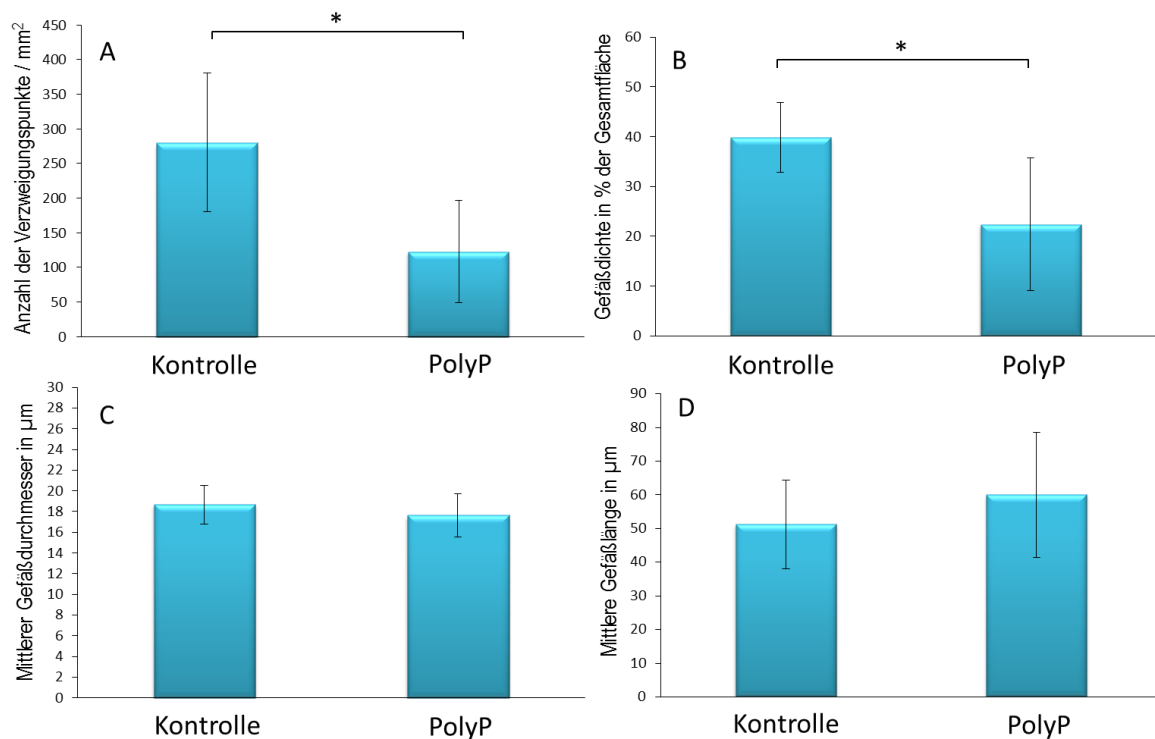


Abbildung 4.9 Analyse der verschiedenen angiogenen Parameter angiogene Parameter wie (A) Anzahl der Verzweigungspunkte, (B) Gefäßdichte, (C) mittlere Gefäßdurchmesser und (D) mittlere Gefäßlängen. Sowohl die Anzahl der Verzweigungspunkte (A) als auch die prozentualen Gefäßdichten (B) waren in den Kontrollproben signifikant höher als in den Proben, die mit PolyP-modifizierten Proben modifiziert wurden. Bei den mittleren Gefäßlängen (C) zeigen sich keine Unterschiede zwischen Kontrolle und Polyp-modifizierten Proben. Die mittlere Gefäßlänge war in den PolyP-modifizierten Proben höher, allerdings ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Bei der quantitativen Analyse der angiogenen Parameter mittels Software „ImageJ“ zeigt sich eine signifikant höhere Anzahl an Verzweigungspunkten ($p=0,002$) in den Kontrollproben mit 280 Verzweigungspunkte/mm² im Vergleich zu den Proben, welche mit PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten inkubiert wurden mit einer Anzahl von ca. 120 Verzweigungspunkte/mm² (Abb 4.9 A).

Auch bei der Analyse der Gefäßdichte zeigt sich eine näherungsweise doppelt so hohe und signifikant höhere prozentuale Gefäßdichte ($p=0,003$) in Bezug auf die Gesamtfläche in den Kontrollproben mit ca. 40 % im Vergleich zu den CAM-Proben, welche mit PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten inkubiert wurden mit ca. 20

%. Bei der Analyse der Gefäßdurchmesser zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Kontrollproben und den modifizierten Proben. In beiden Proben zeigen sich mittlere Gefäßdurchmesser von ca. 18 μm . Für die mittleren Gefäßlängen ergibt sich für die Kontrollproben eine etwas geringere mittlere Gefäßlänge von ca. 50 μm im Vergleich zu den PolyP-modifizierten Proben mit ca. 60 μm ohne Signifikanz.

5 Diskussion

5.1 Problemstellung und Zielsetzung

Die Untersuchung der Angiogenese im Zusammenhang der Biomaterialintegration ist ein Arbeitsfeld, welches in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat. Insbesondere in der regenerativen Medizin stellen angiogene Prozesse im Zusammenhang der Heilung bzw. Einheilung von Biomaterialien nach Implantation einen zentralen Forschungsfokus dar, um die erfolgreiche Integration von Implantaten zu verbessern. So wurde in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von präklinischen *in vitro* Studien durchgeführt, die das Verhalten von Endothelzellen als Reaktion auf verschiedene Materialien untersuchten. Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 dargestellt, gibt es eine Vielzahl von wissenschaftlichen Ansätzen, um sowohl das zelluläre Verhalten von Endothelzellen wie z.B. Adhäsion und Proliferation nach Modifikation von verschiedenen Materialien *in vitro* gezielt zu fördern oder *in vivo* direkt die Angiogenese positiv zu beeinflussen [Kämmerer et al., 2020, 2011; Hessenauer et al., 2018; Heller et al., 2018, 2015; Xu et al., 2018; Zhao et al., 2016; Shen et al., 2015; Koch et al., 2012, 2006; Ito et al., 2005].

Auch in Bezug auf das in dieser Arbeit verwendete Material Polycaprolacton lassen sich eine Vielzahl von Studien finden, welche den Fokus auf die Regeneration von Knochengewebe bzw. die Förderung der angiogenen Antwort gelegt haben [Müller et al., 2018, 2016 (*a, b), 2011; Wang et al., 2017]. Dabei zeigte sich, dass durch anorganisches PolyP die Bildung von vaskulären Strukturen ausgelöst und beschleunigt werden kann. In den genannten Arbeiten wurden HUVEC Zellen verwendet, welche nach Inkubation mit PolyP bereits nach wenigen Stunden vaskuläre Strukturen (tube formation) ausbildeten [Müller et al., 2018; Wang et al., 2017]. Im Widerspruch hierzu konnten Han und Mitarbeiter einen anti-angiogenen Effekt von PolyP sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisen [Han et al., 2007].

Aufgrund der widersprüchlichen Datenlage war das übergeordnete Ziel dieser Arbeit, die Prozesse der Bildung mikrovaskulärer Gefäße nach Inkubation mit PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten in einem geeigneten *in vivo* Modell zu analysieren.

Es stellte sich zu Beginn der Arbeit zunächst die Frage nach einem Tiermodell, welches für die Untersuchung der mikrovaskulären Integration von PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten *in vivo* geeignet war. Für die Untersuchung mikrovaskulärer Prozesse im Rahmen der Einheilung von Biomaterialien kamen für diese Studie verschiedene Modelle wie das Rückenhautkammermodell der Maus und das CAM-Assay in Frage. Nach genauer Prüfung entschieden wir uns für das CAM-Modell. Die Vorteile dieses Tiermodells sind neben der allgemein guten Eignung für die Untersuchung angiogener Prozesse, die kurzen Generationszeiten und das ressourcensparende Konzept bei relativ einfacher Durchführung. Dennoch führten insbesondere zu Beginn der Experimente Beschädigungen der befruchteten Hühnereier beim Transport, vorzeitiges Absterben oder unbefruchtete Eier zu Ausschlussquoten von bis zu 40 %. Nach Optimierung der Bedingungen und erhöhten Vorsichtsmaßnahmen vor allem bei Lieferung und Transport konnte die Ausschlussquote auf ca. 10 % gesenkt werden.

Im Rahmen dieser Dissertation ermöglichte das CAM-Assay eine hohe Anzahl an Versuchsansätzen, welche simultan bearbeitet werden konnten. Des Weiteren erwies sich die Intravitalmikroskopie zur detaillierten Darstellung angiogener Prozesse im Kontext der mikrovaskulären Integration als gut geeignete Methode, die zu untersuchenden angiogenen Parameter zu objektivieren und statistisch auszuwerten.

5.2 Herstellung der Polycaprolacton-Gerüste

Die Herstellung der PCL-Gerüste erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Müller am Institut für Physiologische Chemie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz nach bereits publizierter Methode [Neufurth et al., 2017]. Dabei wurden insgesamt drei Chargen und mindestens jeweils fünf PCL-

Gerüste als Kontrollen bzw. als PolyP-modifizierte Proben in den verschiedenen Ansätzen aller Experimente bereitgestellt.

Schon vor der Verwendung der PCL-Gerüste zeigte sich, dass es trotz definierter Herstellungsparameter bzw. gleicher Druckeinstellungen zu Unterschieden im Aufbau und der Struktur der Gerüste kam (Abb. 5.1). Während der Durchmesser der Gerüste mit 1 cm stets konstant war, zeigte sich bei den mikroskopischen Untersuchungen, dass die Dimensionen der gedruckten Stränge zwischen den Chargen teilweise stark variierten. Die Strangstärke variierte näherungsweise zwischen 500 und 800 μm und zeigte im Verlauf innerhalb einer Probe unregelmäßige bzw. wechselnde Stärken. Hierdurch variierten die Porengrößen der porösen Strukturen der PCL-Gerüste im Vergleich zweier Chargen teilweise erheblich. Um den Einfluss der verschiedenen Porenstrukturen auf die angiogenen Prozesse weitestgehend auszuschließen bzw. zu minimieren, wurden deshalb stets nur die Gerüste einer Charge mit vergleichbaren Porositäten in einem Versuchsdurchgang miteinander verglichen.

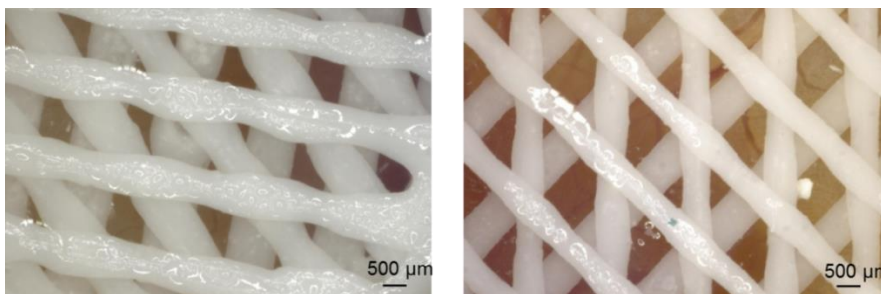


Abbildung 5.1 Die poröse Struktur zweier PCL-Gerüste aus verschiedenen Chargen. Trotz gleicher Druckeinstellungen, kam es während des Druckens zu Unterschieden z.B. bei der Stärke der Gerüststränge und führte somit zu Veränderung der porösen Struktur.

5.3 Polyphosphat führt zu einer reduzierten Gefäßdichte in der CAM

Bei der mikroskopischen Analyse der mikrovaskulären Strukturen wurde zu Beginn einer jeden Bildgebung eine Übersichtsaufnahme bei einer 20-fachen Vergrößerung durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine detailliertere Analyse der Randbereiche bzw. innerhalb der porösen Strukturen der Gerüste bei 200-facher Vergrößerung.

Sowohl bei der Analyse der Randbereiche als auch innerhalb der Poren zeigte sich, dass es weder nach 1 Tag noch nach 3 Tagen zu sichtbaren Interaktionen der untersuchten Gerüste mit der CAM gekommen ist. Auch zeigten sich im Vergleich der modifizierten Proben mit den Kontrollen keine Unterschiede der mikrovaskulären Gefäße weder in den Randbereichen noch innerhalb der porösen Strukturen. Im Gegensatz hierzu zeigte sich nach 7 Tagen, dass sowohl die Gerüste, welche mit PolyP modifiziert wurden als auch die Kontrollproben, in die CAM integriert wurden. Es zeigte sich, dass Blutgefäße sowohl die Randbereich der PCL-Gerüste umwachsen haben bzw. in die porösen Strukturen eingewachsen waren. Es konnte beobachtet werden, dass besonders innerhalb der porösen Strukturen der PolyP-modifizierten Proben im Vergleich zu den Kontrollen eine deutlich reduzierte Anzahl an Gefäßen auftrat, welche zudem blinde Gefäßenden aufwiesen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für eine Interaktion der Gerüste mit der CAM insbesondere der Faktor Zeit eine wichtige Voraussetzung ist. In dieser Arbeit wurde erst nach 7 Tagen eine Interaktion beobachtet. Die reduzierte Gefäßdichte in den PolyP-modifizierten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben lässt darauf schließen, dass es hier möglicherweise zu einem hemmenden Effekt durch das anorganische PolyP gekommen ist. Wie bereits unter 5.1 erwähnt wurde, konnte in der Literatur gezeigt werden, dass es zu einem hemmenden Effekt durch PolyP auf die Proliferation von Endothelzellen *in vitro* und die Angiogenese *in vivo* kommen kann [Han et al., 2007]. In der genannten Studie konnte der anti-angiogene Effekt ebenfalls im CAM-Assay nachgewiesen werden. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass der anti-angiogene Effekt darauf beruht, dass PolyP die Bindung des pro-angiogenen Wachstumsfaktors bFGF an seinen Rezeptor blockiert und auf diese Weise den MAPK Signalweg hemmt. Es existieren zahlreiche Studien, die zeigen, dass insbesondere bFGF bzw. die angeschlossene Signaltransduktion über den MAPK Signalweg einen fördernden Effekt auf die Migration, Proliferation sowie die Bildung von frühen Gefäßstrukturen von Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen haben [Wu et al., Guo et al., 2012; Jeong et al., 2010; Tanaka et al., 1999]. Es ist denkbar, dass eine Hemmung des MAPK-Signalwegs durch die PolyP-modifizierten PCL-

Gerüste zu einer Hemmung der Angiogenese und somit zu einer Reduktion der Gefäßdichte geführt hat.

5.4 Die Reduktion des Gefäßnetzwerkes als potenziell modulatorischer Effekt von Polyphosphat

Bei der quantitativen Analyse der mikrovaskulären Integration mittels Intravitalmikroskopie wurden die verschiedenen angiogenen Parameter wie Anzahl der Verzweigungspunkte, prozentuale Gefäßdichte, mittlerer Gefäßdurchmesser und mittlere Gefäßlängen analysiert. Während sich bei den mittleren Gefäßdurchmessern und Gefäßlängen keine Unterschiede im Vergleich der modifizierten Proben zu den Kontrollen zeigte, so ergaben sich für die Parameter der Anzahl der Verzweigungspunkte und der prozentualen Gefäßdichte signifikante Unterschiede. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Auswertung zeigten sich hier eine signifikant reduzierte Anzahl an Verzweigungspunkten sowie der prozentualen Gefäßdichte in den Proben, welche mit PolyP modifiziert wurden im Vergleich zu den Kontrollen. Wie bereits in Abschnitt 5.3 diskutiert wurde könnte sich diese Reduktion des Gefäßnetzwerkes durch einen inhibierenden Effekt des PolyP auf die Angiogenese erklären lassen.

Im Widerspruch zur ausschließlichen Hemmung durch PolyP stehen Literaturdaten, welche eine durch PolyP beschleunigte Bildung von Gefäßstrukturen (tube formation) *in vitro* nachweisen konnten [Müller et al., 2018]. Als Erklärung wurde eine durch PolyP direkte oder indirekte Bereitstellung von Energie in Form von ATP und eine zelluläre Stimulation über die alkalische Phosphatase angeführt. Demzufolge wäre eine reine Hemmung der Angiogenese als Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen unzureichend. Während üblicherweise eine erhöhte Anzahl an Gefäßen eine Stimulation der Angiogenese suggerieren, finden sich insbesondere bei der Gefäßreorganisation auch Situationen, durch welche eine Reduktion der Gefäße zu einer verbesserten Perfusion und Sauerstoffversorgung führen kann. Zu nennen in diesem Zusammenhang ist die sog. „Normalisierung“ von Gefäßen innerhalb eines Krebstumors nach Gabe von anti-angiogenen Substanzen. Im

Allgemeines kommt es bei einer Gefäßnormalisierung zwar zu einer Reduktion des Gefäßnetzwerkes und der Gefäßgröße, durch eine vermehrte Anlagerung von Perizyten kommt es jedoch auch zu einer Stabilisierung bzw. Reifung der Gefäße [Sun et al., 2015]. In Studien konnte gezeigt werden, dass es nach Applikation von z.B. Avastin - ein Antikörper gegen den pro-angiogenen Wachstumsfaktor VEGF - zwar zu einer Reduktion der Gefäße innerhalb des Tumors kam, die verbleibenden Gefäße aber im Vergleich zu den relativ unphysiologischen und „undichten“ Tumorgefäßen wieder zu funktionellen Gefäßen umgewandelt und die Tumorperfusion gesteigert werden konnte [Jain et al., 2006].

Im Zusammenhang einer möglichen Hemmung durch PolyP, wie sie in der Studie von Han und Mitarbeitern postuliert wurde [Han et al., 2007], konnte aufgrund fehlender Untersuchungen der Perfusion keine Aussage zur Funktion der Gefäße gemacht werden. Es ist möglich, dass es durch PolyP zwar zu einer Reduktion der Gefäßdichte gekommen ist, jedoch auch wie im Falle der anti-angiogenen Krebstherapie auch zu einer Gefäßnormalisierung und einer geförderten Gefäßreifung während der Angiogenese.

Bei der Angiogenese kommt es während der Entstehung eines Gefäßnetzwerkes zu verschiedenen Prozessen, welche den späteren Aufbau der Gefäße bzw. der Gefäßnetzwerke und deren Funktion determinieren. Dabei definiert man grundsätzlich vier wesentliche Prozesse, welche an der Angiogenese beteiligt sind: (1) Aussprossen, (2) Intussuszeption und (3) Elongation und (4) Inkorporation von endothelialen Vorläuferzellen in die Gefäßwand [Chung et al., 2011]. Während das Aussprossen aus bereits bestehenden Gefäßen und die Intussuszeption durch eine Teilung eines Gefäßes zu einer größeren Anzahl an Gefäßen bzw. einer erhöhten Dichte des Gefäßnetzwerkes, können regulatorische Prozesse dazu führen, dass es zu einer Reduktion der Verzweigungen innerhalb eines Gefäßnetzwerkes kommt [Chung et al., 2011; Risau 1997]. Angiogenese wird reguliert durch ein streng abgestimmtes Gleichgewicht aus pro- und anti-angiogenen Faktoren [Logsdon 2014]. Während Faktoren wie VEGF, FGF oder PDGF eher als Promotoren fungieren, sorgen Faktoren wie Angiopoetin, Interferone oder Endostatin für eine Hemmung der Angiogenese. Kommt es zu einem Ungleichgewicht z.B. der pro-angiogenen Faktoren, kann es zu einer überschießenden Gefäßbildung kommen, wie es z.B. auch im Tumor beobachtet

werden kann [Logsdon et al., 2014]. Im Umkehrschluss kann dies bedeuten, dass es unter physiologischen Bedingungen im Falle einer initial überschießenden Gefäßbildung zu einer Reduktion der Gefäßdichte durch anti-angiogene Faktoren kommt, um die Funktion des neu gebildeten Gefäßnetzwerkes zu gewährleisten. So könnte es möglicherweise durch die Inkubation der PCL-Gerüste zunächst zu einem Überschießen der Gefäßbildung gekommen sein, welches durch die Zugabe von PolyP reduziert wurde. Tatsächlich zeigte sich in den intravitalmikroskopischen Analysen nach Inkubation mit der Kontrolle ein deutlich dichteres Gefäßnetz mit einer signifikant erhöhten Anzahl an Verzweigungspunkten und einer höheren Gefäßdichte. Aus dieser Betrachtung könnte eine reduzierte Dichte der Gefäße nach Inkubation mit PolyP als modulatorischer Effekt interpretiert werden, welcher in einer beschleunigten Gefäßreifung resultierte und für die Funktion der Gefäße von Bedeutung ist.

Sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus spielen Angiogenese und Vaskulogenese eine wichtige Rolle. Im adulten Organismus kommt es vor allem im Rahmen der Wundheilung, Wachstum, Hypoxie, während des weiblichen Menstruationszyklus zu Angiogenese [Secomb et al., 2013; Chung et al., 2011]. Im Embryo laufen beide Prozesse permanent und parallel nebeneinander ab, jedoch herrscht hier die Vaskulogenese vor. Während der Gefäßreifung laufen die verschiedenen komplexen Vorgänge oft simultan ab. Dabei beginnt der Prozess der Vaskulogenese mit der Entwicklung mesodermaler Stammzellen zu Hämangioblasten, welche sich zu Angioblasten und hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Die blutbildenden hämatopoetischen Stammzellen entwickeln sich zentral weiter zu den verschiedenen Untergruppen der hämatopoetischen Zellreihe, wohingegen die Angioblasten peripher zunächst zu endothelialen Progenitorzellen und schließlich zu Endothelzellen differenzieren [Schmidt et al., 2007, Carmeliet 2000; Risau 1997]. Während Endothelzellen an der Bildung tubulärer Strukturen und einer Basalmembran maßgeblich beteiligt sind [Patel-Hett et al., 2011; Schmidt et al., 2007], wirken Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) und Angiopoetin synergistisch in den weiteren Gefäßreifungsprozessen und sorgen für eine Strukturierung, Stabilisierung und das Überleben der Gefäße [Lee et al., 2007; Ash et al., 2000; Carmeliet et al., 1996]. Auf zellulärer Ebene spielen neben

den bereits genannten Endothelzellen als Triebfeder vor allem auch Perizyten, glatte Muskelzellen und Fibroblasten eine entscheidende Rolle. Dabei nehmen vor allem Perizyten eine wichtige Stellung ein, als stabilisierende und Gefäßwandbildende Zellen. Des Weiteren sind sie zusammen mit den Endothelzellen an der Bildung der Basalmembran beteiligt und sezernieren zusammen mit den Fibroblasten angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF und weitere essenzielle Mediatoren [Carmeliet et al., 2011].

In den immunhistologischen Analysen zeigte sich im Falle von alpha-SMA eine Gefäß-spezifische Färbereaktion. Sowohl in den Kontrollproben als auch in den Proben, welche mit PolyP modifiziert wurden, zeigten sich angefärbte Gefäßstrukturen. In den untersuchten Proben (Kontrolle und PolyP) zeigten sich jeweils gleichmäßige Verteilungen der Gefäßstrukturen.

Während der Embryonalentwicklung herrscht insbesondere die Vaskulogenese vor, wodurch ein entsprechender Anteil der Gefäße noch nicht vollständig ausgereift ist [Jeltsch et al., 2013; Schmidt et al., 2007; Carmeliet 2000; Risau 1997]. Alpha-SMA ist ein Molekül, welches in sich differenzierenden glatten Muskelzellen der reifenden Gefäßwand nachgewiesen werden kann [Skalli et al., 1989]. Auch während der Embryonalentwicklung des Huhns kommt es innerhalb der CAM zunächst zu einer Reifung der Gefäße. Da sich in diesem Reifungsprozess erst Perizyten anlagern, welche sich dann zu glatten Muskelzellen differenzieren, kann angenommen werden, dass unreife Gefäße zunächst nicht durch Antikörper gegen alpha-SMA erfasst werden können. Die Tatsache, dass in der Intravitalmikroskopie in beiden Gruppen keine Unterschiede bezüglich des Gefäßdurchmessers beobachtet werden, könnte auf eine in etwa gleich grosse Anzahl reifer Gefäße hindeuten. Entsprechend konnten in der Intravitalmikroskopie in der Kontrollgruppe eine höhere Gefäßdichte nachgewiesen werden, obwohl in der alpha-SMA-Färbung keine Unterschiede zu beobachten waren.

5.5 Analyse des gewählten *in vivo* Modells

Wie bereits im Abschnitt 5.1. ausführlich dargestellt wurde, konnte für anorganisches PolyP als ubiquitärer Energielieferant ein deutliches osteogenes

und angiogenes Potenzial belegt werden. Um die mikrovaskuläre Integration der PCL-Gerüste unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das CAM-Assay als *in vivo* Modell gewählt, welche als etablierte Methode zur Untersuchung der Angiogenese vielfach belegt ist [Nowak-Sliwinska et al., 2014; Ribatti 2010; Tanaka et al., 1986]. Im CAM-Assay können detaillierte Analysen der Angiogenese am lebenden Organismus ohne größeren präparativen Aufwand durchgeführt werden. Dabei besteht der Vorteil darin, dass dieses Modell nach deutschem Recht kein Tierversuch darstellt, sich aber präklinisch physiologische Bedingungen in einem lebenden Organismus erzeugen lassen, welche in Zellkultur nicht möglich sind [Kunzi-Rapp et al., 2000; Nowak-Sliwinska et al., 2014]. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente musste zunächst ein geeigneter Zeitpunkt für die Biomaterial-Inkubation gewählt werden um zum einen eine ausreichende Stabilität der CAM für die PCL Gerüste zu bieten und zum andern, einen Zeitpunkt zu wählen, der eine intravitalmikroskopische Untersuchung zulässt.

Die vollständige Entwicklung vom befruchteten Ei bis zum Schlüpfen eines Huhnes geschieht innerhalb von 21 Tagen [Hamburger & Hamilton, 1992]. Dabei beginnt die Entwicklung der Chorionallantoismembran (CAM) am 2. Tag und endet etwa am 6. Bruttag [Rizzo et al., 1995]. Da die verwendeten PCL-Gerüste eine Größe von etwa 1 cm Durchmesser aufwiesen, zeigte sich in Vorversuchen, dass ein Beginn der Inkubation am 3. Tag der Bebrütung zu einem vermehrten Verlust der Gerüste führte. Aufgrund der zu geringen Größe und Stabilität der CAM nach 3 Tagen, rutschten die Gerüste von der CAM herunter und waren für die weiteren Experimente verloren. Bereits nach 4 Tagen kam es zu einer deutlichen Stabilitäts- und Größenzunahme der CAM, weshalb für sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Experimente der Startzeitpunkt für die Inkubation auf den 4. Tag festgelegt wurden.

Nach Start der Inkubation wurde der Effekt der mikrovaskulären Integration der PCL-Gerüste nach 1, 3 und 7 Tagen untersucht. Während in den ersten drei Tagen keine Interaktion der Biomaterialien mit der CAM zu beobachten war, zeigte sich nach 7 Tagen ein deutliches Umwachsen der CAM um die PCL-Gerüste. Die erfolgreiche Integration der Gerüste nach 7 Tagen weist darauf hin, dass es zu einer Akzeptanz der Hühnerembryonen gegenüber den PCL-Gerüsten gekommen

ist. Aufgrund der erfolgreichen Inkubation über 7 Tage konnten negative bzw. toxische Effekte der PCL-Gerüste auf den Embryo ausgeschlossen werden. Es ist zudem denkbar, dass das Eigengewicht der Gerüste ein Einsinken in die CAM bewirkt und somit die Integration bzw. das Einwachsen der Gerüste gefördert haben. In Bezug auf eine mögliche immunologische Fremdkörperreaktion ist anzumerken, dass die Hühnerembryos bis zu ihrem 10. Entwicklungstag noch kein vollständig entwickeltes Immunsystem besitzen [Ribatti et al., 2008] und eine Abstoßung der PCL-Gerüste aus diesem Grund ausgeschlossen werden kann.

Auch für die intravitalmikroskopische Untersuchung war ein optimaler Zeitpunkt der Embryo- bzw. CAM-Entwicklung erforderlich, da für diese Untersuchung FITC-Dextran in das Gefäßsystem des Embryos injiziert werden musste. Dabei erwies sich der Zeitpunkt nach 7 Tagen der PCL-Gerüst Inkubation als optimal, da die Gefäße zu diesem Zeitpunkt groß genug waren, um eine Injektion durchzuführen. Aufgrund der Tatsache, dass es zu früheren Zeitpunkten (1 und 3 Tage) zu keiner sichtbaren Interaktion der PCL-Gerüste mit der CAM gekommen ist, wurden in dieser Arbeit sämtliche intravitalmikroskopischen Untersuchungen nach 7 Tagen durchgeführt. Ein entscheidender Schritt nach Injektion der Färbelösung war die Blutstillung. Hier erwies sich besonders das Verschließen der Punktionsstellen mit Silbernitrat als geeignet. Andere Methoden wie z. B. ein transparentes Sprühpflaster führten zu einer Persistenz der Blutung und somit zu einer erhöhten Ausfallquote.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nach erfolgreicher Etablierung der in dieser Arbeit verwendeten Methoden, das CAM-Assay gut geeignet war, um die mikrovaskuläre Integration sowohl morphologisch-deskriptiv als auch quantitativ zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die Untersuchungen von angiogenen Prozessen im Zusammenhang der Biomaterialintegration komplex und vielfältig sind und Ergebnisse von *in vitro* Experimenten keine Rückschlüsse auf die Situation im lebenden Organismus erlauben.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mikrovaskuläre Integration durch PolyP-modifizierte PCL Gerüste *in vivo* beeinflusst werden kann. Während innerhalb der ersten drei Tage lichtmikroskopisch keine Unterschiede zwischen Kontrollproben und modifizierten Proben zu erkennen war, zeigte sich eine Veränderung des mikrovaskulären Gefäßnetzwerkes durch den Einfluss von PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten, welcher mit einer Verringerung der Gefäßdichte einherging. In den immunhistologischen Untersuchungen, konnte für alpha-SMA eine Gefäß-spezifische Färbung nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Gefäße sowohl in der Kontrollprobe als auch in den PolyP-modifizierten Proben. Die Ergebnisse der Lichtmikroskopie konnten mittels intravitalmikroskopischer Analysen quantitativ bestätigt werden. Sowohl bei der Anzahl der Verzweigungspunkte als auch bei der prozentualen Gefäßdichte zeigten sich signifikant reduzierte Werte in den PolyP-Proben im Vergleich zu den unmodifizierten Kontrollen. Im Gegensatz hierzu konnten keine Unterschiede bei der Analyse der mittleren Gefäßdurchmesser und Gefäßlängen festgestellt werden.

Die Verwendung von PolyP-modifizierten PCL-Gerüsten könnte möglicherweise die Blutgefäßversorgung nach Implantation dahingehend verändern, dass eine veränderte Gefäßreorganisation bzw. beschleunigte Gefäßreifung während der Angiogenese ein Überschießen der Gefäßbildung verhindert und so das Einheilen verbessert werden könnte.

Des Weiteren werden zusätzlich molekulare Parameter der Angiogenese und insbesondere der Einfluss von PolyP auf die Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen notwendig sein, um die genauen Mechanismen der Angiogenese-Modulation durch PolyP zu verstehen. In diesem Zusammenhang wäre zunächst eine Identifizierung der relevanten angiogenen Wachstumsfaktoren mittels Multi-Zytokin-ELISA denkbar. Mit dieser Methode ist es möglich simultan eine Vielzahl relevanter angiogener Wachstumsfaktoren und Zytokine zu analysieren. Im Anschluss können dann die identifizierten Faktoren genauer untersucht werden. Dabei wäre zunächst eine *in vitro* Analyse in

Zellkultur denkbar, in der der Einfluss der bestimmten angiogenen Faktoren bzw. deren Kombination auf die zelluläre Antwort analysiert werden könnte. Zu bestimmende Parameter in einer Zellkultur aus Endothelzellen wären Proliferation, Migration, Differenzierung sowie Bildung von vaskulären Strukturen (tube formation). Im Anschluss an die *in vitro* Experimente wären weitere *in vivo* Experimente sinnvoll, welche mit den hier erlangten Ergebnissen in einer vergleichenden Studie analysiert werden könnten. Ein mögliches weiteres *in vivo* Modell-System wäre das transparente Rückenhautkammer-Modell in der Maus. In diesem Modell können nach Entfernung der Hautschichten und Freilegung der Muskulatur die Blutgefäße des darunterliegenden Gewebes dargestellt werden. In einer Titankammer, welche mit einem Deckglas abgedeckt werden kann, ist es möglich Biomaterialien und deren Einfluss auf die Angiogenese über einen längeren Zeitraum in dem gut vaskularisierten Maus-Gewebe zu untersuchen.

7 Zusammenfassung

Die angiogene Modifikation des Biomaterials Polycaprolacton kann genutzt werden, um die vaskuläre Integration des Materials und somit das Einheilen nach Implantation zu verbessern. Ein vielversprechender Faktor zur Förderung der Angiogenese und Geweberegeneration nach Implantation ist anorganisches Polyphosphat (PolyP), welches natürlicherweise in Thrombozyten vorkommt und aus den elektronendichten Granula freigesetzt wird. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass insbesondere anorganisches PolyP eine entscheidende Rolle sowohl bei der Knochenmineralisation/-regeneration als auch für den gesamten Metabolismus und die Angiogenese eine entscheidende Rolle spielt. Im Kontext der knöchernen Einheilung von Biomaterialien sind in besonderem Maße die Knochenregeneration und Angiogenese vielversprechende Ansatzpunkte. Deshalb war das Ziel der Arbeit, das angiogene Potenzial von PolyP-modifizierten Polycaprolacton-Gerüsten im Zusammenhang der vaskulären Integration *in vivo* mittels CAM-Assay zu analysieren.

Die Herstellung der PCL-Gerüste erfolgte mittels 3D-Druck unter Verwendung eines 3D Bioplotters. Für die Modifizierung der Gerüste wurde ein Gemisch aus Calcium-PolyP Mikropartikeln und PCL Partikeln im Verhältnis 1:2 [w/v] hergestellt, welches direkt für die Herstellung der Gerüste verwendet wurde. Für die Analyse der mikrovaskulären Integration wurden die modifizierten PCL-Gerüste über einen Zeitraum von einer Woche im CAM-Assay inkubiert und anschließend qualitativ und quantitativ analysiert. Die qualitative Analyse erfolgte zunächst Lichtmikroskopisch anhand der Gefäßvernetzung, Gefäßarchitektur und Morphologie. Zudem wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt, um anhand von gefäßspezifischen Färbungen (CD31, vWF, alpha-SMA) den Einfluss von PolyP auf die Verteilung der Gefäße innerhalb der CAM beurteilen zu können. Die quantitativen Analysen der angiogenen Parameter erfolgte intravitalmikroskopisch unter Verwendung einer FITC-Dextran Lösung, welche direkt in das Gefäßsystem der CAM injiziert wurde. Dabei wurden die angiogenen Parameter wie Anzahl der Verzweigungspunkte, prozentuale Gefäßdichte, mittlere Gefäßdurchmesser und mittlere Gefäßlängen mittels Software „ImageJ“ analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass innerhalb der ersten 3 Tage nach Inkubation der Gerüste kein deutlicher Effekt auf die Angiogenese durch die PolyP-Modifikation im Vergleich zu den unmodifizierten Proben erreicht wird. Im Gegensatz hierzu kann nach 7 Tagen eine geringere Anzahl an Gefäßen nach Inkubation mit den PolyP-modifizierten Gerüsten im Vergleich zu den Kontrollproben beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu zeigt sich in den immunhistologischen Analysen nach 7 Tagen in beiden untersuchten Proben eine gleichmäßige Verteilung der Gefäße in der CAM, mittig unterhalb der PCL-Gerüste, ohne erkennbare Unterschiede zwischen Kontrolle und PolyP-modifizierten Proben. Dies wird auf eine durch alpha-SMA bedingte Färbung der ausschließlich reifen Gefäße zurückgeführt, wodurch es zu einer verzerrten Darstellung der tatsächlichen Gefäßsituation innerhalb der CAM gekommen ist. Die intravitalmikroskopischen Analysen bestätigen die Beobachtungen einer reduzierten Gefäßdichte in der Lichtmikroskopie mit einer Anzahl von Verzweigungspunkten von $280/\text{mm}^2$ in der Kontrolle im Vergleich zu den PolyP-modifizierten Proben mit $120/\text{mm}^2$. Mittlere Gefäßdurchmesser und mittlere Gefäßlängen zeigten keine Unterschiede im Vergleich der PolyP-modifizierten Proben zu den Kontrollen. Möglicherweise könnte die Reduktion der Gefäßanzahl mit einer Gefäßreorganisation im Sinne einer „Gefäßnormalisierung“ und der Bildung funktioneller Gefäße zusammenhängen. Eine weitere mögliche Erklärung könnte auch ein anti-angiogener Effekt von PolyP sein, welcher allerdings im Gegensatz zur bisher ausschließlich *in vitro* gewonnenen Datenlage in der Literatur stünde.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die in dieser Arbeit durchgeführte Modifikation von PCL-Gerüsten mittels PolyP ein primär anti-angiogener Effekt *in ovo* beschrieben werden konnte. Es wird in zukünftigen Arbeiten notwendig sein, die sich widersprechenden Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse weiter zu untersuchen und die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären.

8 Referenzen

Agrawal, C. M., & Ray, R. B. (2001). Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(2), 141-150.

Alani, A., Knowles, J. C., Chrzanowski, W., Ng, Y. L., & Gulabivala, K. (2009). Ion release characteristics, precipitate formation and sealing ability of a phosphate glass–polycaprolactone-based composite for use as a root canal obturation material. *Dental Materials*, 25(3), 400-410.

Amabili, M., Balasubramanian, P., Ferrari, G., Franchini, G., Giovanniello, F. et al. (2020). Identification of viscoelastic properties of Dacron aortic grafts subjected to physiological pulsatile flow. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 103804.

Anderson, J. M., Rodriguez, A., & Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. In *Seminars in immunology* (Vol. 20, No. 2, pp. 86-100). Academic Press.

Ash, J. D., & Overbeek, P. A. (2000). Lens-specific VEGF-A expression induces angioblast migration and proliferation and stimulates angiogenic remodeling. *Developmental Biology*, 223(2), 383-398.

Ayoub, A., & Al-Fotawei, R. (2015). Biomaterials in the reconstruction of the oral and maxillofacial region. In *Biomaterials for Oral and Craniomaxillofacial Applications* (Vol. 17, pp. 101-114). Karger Publishers.

Bauer, S. M., Bauer, R. J., & Velazquez, O. C. (2005). Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vascular and Endovascular Surgery*, 39(4), 293-306.

Cao, T., Ho, K. H., & Teoh, S. H. (2003). Scaffold design and in vitro study of osteochondral coculture in a three-dimensional porous polycaprolactone scaffold fabricated by fused deposition modeling. *Tissue Engineering*, 9(4, Supplement 1), 103-112.

Carmeliet, P., Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298–307.

- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), 389–395.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), 435–439.
- Chang, D. T., Jones, J. A., Meyerson, H., Colton, E., Kwon, I. K., Matsuda, T., Anderson, J. M. (2008). Lymphocyte/macrophage interactions : Biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. *Juornal of Biomedical Materials Research*, 87(3), 676-687.
- Chumnanklang, R., Panyathanmaporn, T., Sitthiseripratip, K., & Suwanprateeb, J. (2007). 3D printing of hydroxyapatite: effect of binder concentration in pre-coated particle on part strength. *Materials Science and Engineering: C*, 27(4), 914-921.
- Chung, A. S., Ferrara, N. (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27: 563–584.
- Dalton, P. D., Woodfield, T., & Hutmacher, D. W. (2009). Snapshot: Polymer scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 30(4), 701.
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2008). Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(6), 1119-1130.
- Dombre, C., Guyot, N., Moreau, T., Monget, P., Da Silva, M., Gautron, J., & Réhault-Godbert, S. (2017). Egg serpins: The chicken and/or the egg dilemma. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 62, pp. 120-132). Academic Press.
- Facchini, L., Magalini, E., Robotti, P., & Molinari, A. (2009). Microstructure and mechanical properties of Ti-6Al-4V produced by electron beam melting of pre-alloyed powders. *Rapid Prototyping Journal*.
- García-Gareta, E., Hua, J., Orera, A., Kohli, N., Knowles, J. C., & Blunn, G. W. (2017). Biomimetic surface functionalization of clinically relevant metals used as orthopaedic and dental implants. *Biomedical Materials*, 13(1), 015008.

Georgescu, A. V., Matei, I. R., Bumbasirevic, M., & Soucacos, P. N. (2019). Why, when and how propeller perforator flaps in reconstructive surgery. *Injury*, 50, S3-S7.

Guo, S., Yu, L., Cheng, Y., Li, C., Zhang, J., An, J., et al., (2012). PDGFR β triggered by bFGF promotes the proliferation and migration of endothelial progenitor cells via p-ERK signalling. *Cell Biology International*, 36(10), 945-950.

Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, 195(4), 231-272.

Han, K. Y., Hong, B. S., Yoon, Y. J., Yoon, C. M., Kim, Y. K., Kwon, Y. G., & Gho, Y. S. (2007). Polyphosphate blocks tumour metastasis via anti-angiogenic activity. *Biochemical Journal*, 406(1), 49-55.

Heller, M., Kumar, V. V., Pabst, A., Brieger, J., Al-Nawas, B., Kämmerer, P. W. (2018). Osseous response on linear and cyclic RGD-peptides immobilized on titanium surfaces in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(2), 419-427.

Heller, M., Bauer, H. K., Goetze, E., Gielisch, M., Ozbolat, I. T., Moncal, K. K., et al. (2016). Materialien und gerüste im medizinischen 3-D-druck und bioprinting im kontext der knochenregeneration. *International Journal of Computerized Dentistry*, 19(4), 301-321.

Heller, M., Kämmerer, P. W., Al-Nawas, B., Luszpinski, M. A., Förch, R., & Brieger, J. (2015). The effect of extracellular matrix proteins on the cellular response of HUVECS and HOBS after covalent immobilization onto titanium. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(6), 2035-2044.

Heller, M. (2009). Der Einfluss oberflächenimmobilisierter Adhäsionspeptide auf die zelluläre Antwort [Diplomarbeit]. Mainz: Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität.

Hessenauer, M. E., Lauber, K., Zuchtriegel, G., Uhl, B., Hussain, T., et al. (2018). Vitronectin promotes the vascularization of porous polyethylene biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 82, 24-33.

Huh, J.-B., Lee, J.-Y., Lee, K.-L., Kim, S.-E., Yun, M.-J, Shim, J.-S., Shim, J.-S., and Shin, S.-W. (2011). Effects of the immobilization of heparin and rhPDGF-BB to titanium surfaces for the enhancement of osteoblastic functions and anti-inflammation. *The Journal of Advanced Prosthodontics* 3(3), 152-160.

Hull, C. (1986). Apparatus for production of 3D printing by stereolithography. US Patent, 4, 3330.

Ito, Y., Hasuda, H., Terai, H., & Kitajima, T. (2005). Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 74(4), 659-665.

Jain, R. K., Duda, D. G., Clark, J. W., & Loeffler, J. S. (2006). Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 3(1), 24-40.

Jeltsch, M., Leppänen, V. M., Saharinen, P., & Alitalo, K. (2013). Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a009183.

Jensen, L. P., Lepäntalo, M., Fossdal, J. E., Røder, O. C., Jensen, B. S., Madsen, M. S., et al. (2007). Dacron or PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. a multicenter randomised study. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 34(1), 44-49.

Jeong, A., Lee, H. J., Jeong, S. J., Lee, H. J., Lee, E. O., Bae, H., & Kim, S. H. (2010). Compound K inhibits basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis via regulation of p38 mitogen activated protein Kinase and AKT in human umbilical vein endothelial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(6), 945-950.

Kanczler, J. M., & Oreffo, R. O. (2008). Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*, 15(2), 100-114.

Kaur, M., & Singh, K. (2019). Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. *Materials Science and Engineering C*, 102, 844-862.

Kämmerer, P. W., Pabst, A. M., Dau, M., Staedt, H., Al-Nawas, B., & Heller, M. (2020). Immobilization of BMP-2, BMP-7 and alendronic acid on titanium surfaces: Adhesion, proliferation and differentiation of bone marrow-derived stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(2), 212-220.

Kämmerer, P. W., Heller, M., Brieger, J., Klein, M. O., Al-Nawas, B., & Gabriel, M. (2011). Immobilisation of linear and cyclic RGD-peptides on titanium surfaces and their impact on endothelial cell adhesion and proliferation. *Eur Cell Mater*, 21, 364-372.

- Klopfleisch, R., & Jung, F. (2017). The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(3), 927-940.
- Koch, S., & Claesson-Welsh, L. (2012). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), a006502.
- Koch, S., Yao, C., Grieb, G., Prevel, P., Noah, E. M., & Steffens, G. C. (2006). Enhancing angiogenesis in collagen matrices by covalent incorporation of VEGF. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(8), 735-741.
- Kunzi-Rapp, K., Akgün, N., Beck, G., Genze, F., Bachor, R., & Rück, A. (2000). Testsystem zur Pharmakosensibilität von Tumorsystemen auf der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereies. In *Forschung ohne Tierversuche 2000* (pp. 163-170). Springer, Vienna.
- Labet, M., & Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, 38(12), 3484-3504.
- Lam, C. X., Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Woodruff, M. A., & Teoh, S. H. (2009). Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90(3), 906-919.
- Lee S, Chen T T, Barber C L, et al. (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*, 130(4), 691–703.
- Lee, D. W., Shim, J. C., Yang, S. J., Cho, S. I., & Kim, J. G. (2019). Functional effects of single semitendinosus tendon harvesting in anatomic anterior cruciate ligament reconstruction: comparison of single versus dual hamstring harvesting. *Clinics in Orthopedic Surgery*, 11(1), 60-72.
- Li, D., Ferguson, S. J., Beutler, T., Cochran, D. L., Sittig, C., Hirt, H. P., & Buser, D. (2002). Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(2), 325-332.
- Logsdon, E. A., Finley, S. D., Popel, A. S., et al. (2014). A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(8), 1491–1508.

Luttikhuisen, D. T., Harmsen, M. C., & Luyn, M. J. V. (2006). Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Engineering*, 12(7), 1955-1970.

Mangir, N., Dikici, S., Claeysens, F., & MacNeil, S. (2019). Using ex Ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay to evaluate the biocompatibility and angiogenic response to biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(7), 3190-3200.

Melchels, F. P., Feijen, J., & Grijpma, D. W. (2010). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, 31(24), 6121-6130.

Mellor, L. F., Nordberg, R. C., Huebner, P., Mohiti-Asli, M., Taylor, M. A., Efirid, W. et al. (2020). Investigation of multiphasic 3D-bioprinted scaffolds for site-specific chondrogenic and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells for osteochondral tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 108(5), 2017-2030.

Miyaguchi, S. I., Horii, A., Kambara, R., Takemoto, N., Akazawa, H., Takahashi, N. et al. (2016). Effects of covering surgical wounds with polyglycolic acid sheets for posttonsillectomy pain. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 155(5), 876-878.

Müller, W. E., Ackermann, M., Wang, S., Neufurth, M., Muñoz-Espí, R., Feng, Q., et al. (2018). Inorganic polyphosphate induces accelerated tube formation of HUVEC endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(1), 21-32.

Müller, W. E., Schröder, H. C., Tolba, E., Diehl-Seifert, B., & Wang, X. (2016). Mineralization of bone-related Sa OS-2 cells under physiological hypoxic conditions. *The FEBS Journal*, 283(1), 74-87. * (a)

Müller, W. E., Tolba, E., Schröder, H. C., Muñoz-Espí, R., Diehl-Seifert, B., & Wang, X. (2016). Amorphous polyphosphate–hydroxyapatite: A morphogenetically active substrate for bone-related SaOS-2 cells in vitro. *Acta Biomaterialia*, 31, 358-367. *(b)

Müller, W. E., Tolba, E., Schröder, H. C., & Wang, X. (2015). Polyphosphate: a morphogenetically active implant material serving as metabolic fuel for bone regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 15(9), 1182-1197.

Müller, W. E., Wang, X., Diehl-Seifert, B., Kropf, K., Schloßmacher, U., Lieberwirth, I., et al. (2011). Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an

inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular Ca²⁺ level in osteoblasts (SaOS-2 cells) in vitro. *Acta Biomaterialia*, 7(6), 2661-2671.

Neufurth, M., Wang, X., Wang, S., Steffen, R., Ackermann, M., Haep, N. D., et al. (2017). 3D printing of hybrid biomaterials for bone tissue engineering: Calcium-polyphosphate microparticles encapsulated by polycaprolactone. *Acta Biomaterialia*, 64, 377-388.

Ng, K. W., Achuth, H. N., Mochhala, S., Lim, T. C., & Hutmacher, D. W. (2007). In vivo evaluation of an ultra-thin polycaprolactone film as a wound dressing. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(7), 925-938.

Noguchi, H., Koda, M., Funayama, T., Kumagai, H., Abe, T., Nagashima, K., et al. (2019). Bone bonding, displacement, and absorption in cases of double-door laminoplasty with unidirectional porous hydroxyapatite spacers. *Journal of Clinical Neuroscience*, 62, 46-52.

Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 17(4), 779–804.

Onal, L., Cozien-Cazuc, S., Jones, I. A., & Rudd, C. D. (2008). Water absorption properties of phosphate glass fiber-reinforced poly-ε-caprolactone composites for craniofacial bone repair. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(6), 3750-3755.

Ottria, L., Lauritano, D., Andreasi Bassi, M., Palmieri, A., Candotto, V., Tagliabue, A., & Tettamanti, L. (2018). Mechanical, chemical and biological aspects of titanium and titanium alloys in implant dentistry. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 32(2 Suppl. 1), 81-90.

Pang, X., Zhuang, X., Tang, Z., & Chen, X. (2010). Polylactic acid (PLA): research, development and industrialization. *Biotechnology Journal*, 5(11), 1125-1136.

Parry, J. A., Wagner, E. R., Kok, P. L., Dadsetan, M., Yaszemski, M. J., van Wijnen, A. J., & Kakar, S. (2018). A combination of a polycaprolactone fumarate scaffold with polyethylene terephthalate sutures for intra-articular ligament regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 24(3-4), 245-253.

Patel-Hett, S., D'Amore, P. A. (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(4-5), 353–363.

- Pitt, C. G. (1990). Poly- ϵ -caprolactone and its copolymers. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 45, 71-120.
- Pitt, C. G., Chasalow, F. I., Hibionada, Y. M., Klimas, D. M., & Schindler, A. (1981). Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly (ϵ -caprolactone) in vivo. *Journal of Applied Polymer Science*, 26(11), 3779-3787.
- Puleo, D. A., Nanci, A. (1999). Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, 20(23-24), 2311-2321.
- Ratner, B.D., Bryant, S.B. (2004). Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 6, 41-75.
- Ribatti, D. (2010). *The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis: The CAM assay in the study of angiogenesis and metastasis*. Springer Science & Business Media.
- Ribatti, D. (2008). The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*, 49(2), 131-135.
- Ribatti D., Nico B., Vacca A .et al (1999). Endogenous and exogenous fibroblast growth factor-2 modulate wound healing in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis*, 3, 89-95.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671–674.
- Risau, W.; Flamme, I. (1995): Vasculogenesis. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11, 73–91.
- Rizzo, V., Kim, D., Durán, W. N., & DeFouw, D. O. (1995). Ontogeny of microvascular permeability to macromolecules in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. *Microvascular Research*, 49(1), 49-63.
- Rodriguez, A., & Elliott, D. C. (2020). Open Repair of Traumatic Thoracic Aortic Injury Without Shunt, and Using a Woven Dacron Graft. In *Atlas of Trauma* (pp. 19-22). Springer, Cham.
- Saleh, M. M., Touny, A. H., Al-Omair, M. A., & Saleh, M. M. (2016). Biodegradable/biocompatible coated metal implants for orthopedic applications. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 27(1), 87-99.

- Schlatter, P., König, M. F., Karlsson, L. M., & Burri, P. H. (1997). Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo. *Microvascular Research*, 54(1), 65-73.
- Schmidt, A., Brixius, K., Bloch, W. (2007). Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circulation Research*, 101(2), 125–136.
- Schwarz, F., Hegewald, A., Sahm, N., & Becker, J. (2014). Long-term follow-up of simultaneous guided bone regeneration using native and cross-linked collagen membranes over 6 years. *Clinical Oral Implants Research*, 25(9), 1010-1015.
- Secomb, T. W., Alberding, J. P., Hsu, R., et al. (2013). Angiogenesis: An adaptive dynamic biological patterning problem. *PLoS Computational Biology*, 9(3).
- Shen, C., Lie, P., Miao, T., et al. (2015). Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 20–30.
- Silva, J. C., Udangawa, R. N., Chen, J., Mancinelli, C. D., Garrudo, F. F., Mikael, P. E., et al. (2020). Kartogenin-loaded coaxial PGS/PCL aligned nanofibers for cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110291.
- Singla, A., Singla, A., Lai, E., & Caminer, D. (2017). Subcutaneously Placed Breast Implants after a Skin-Sparing Mastectomy: Do We Always Need ADM?. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*, 5(7).
- Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., & Trehan, A. (2004). Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1), 1-23.
- Skalli, O., Pelte, M. F., Pecllet, M. C., Gabbiani, G., Gugliotta, P., Bussolati, G., et al. (1989). Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 37(3), 315-321.
- Spath, S., & Seitz, H. (2014). Influence of grain size and grain-size distribution on workability of granules with 3D printing. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 70(1-4), 135-144.
- Suchanek, W., Yashima, M., Kakihana, M., & Yoshimura, M. (1997). Hydroxyapatite ceramics with selected sintering additives. *Biomaterials*, 18(13), 923-933.

Sun, X., Evren, S., & Nunes, S. S. (2015). Blood vessel maturation in health and disease and its implications for vascularization of engineered tissues. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 43(5-6).

Sun, H., Mei, L., Song, C., Cui, X., & Wang, P. (2006). The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials*, 27(9), 1735-1740.

Tanaka, K., Abe, M., & Sato, Y. (1999). Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. *Japanese Journal of Cancer Research*, 90(6), 647-654.

Tanaka, N. G., Sakamoto, N., Tohgo, A., Nishiyama, Y., & Ogawa, H. (1986). Inhibitory effects of anti-angiogenic agents on neovascularization and growth of the chorioallantoic membrane (CAM).—The possibility of a new CAM assay for angiogenesis inhibition. *Experimental Pathology*, 30(3), 143-150.

Unger, R. E., Dohle, E., Kirkpatrick, C. J. (2015). Improving vascularization of engineered bone through the generation of pro-angiogenic effects in co-culture systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 94, 116–125.

Vandenbroucke, B., & Kruth, J. P. (2007). Selective laser melting of biocompatible metals for rapid manufacturing of medical parts. *Rapid Prototyping Journal*.

van der Ven, D. J., Timmers, T. K., Broeders, I. A., & van Olden, G. D. (2019). Displaced clavicle fractures in cyclists: return to athletic activity after anteroinferior plate fixation. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 29(6), 465-469.

Vert, M. (2009). Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(2), 437-446.

Wang, X. H., Ackermann, M., Neufurth, M., Wang, S. F., Li, Q., Feng, Q. L., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. (2017). Restoration of impaired metabolic energy balance (ATP pool) and tube formation potential of endothelial cells under “high glucose”, diabetic conditions by the bioinorganic polymer polyphosphate. *Polymers*, 9, 575.

Wang, X., Schröder, H. C., Diehl-Seifert, B., Kropf, K., Schlossmacher, U., Wiens, M., & Müller, W. E. (2013). Dual effect of inorganic polymeric

phosphate/polyphosphate on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(10), 767-776.

Whitaker, M. (2014). The history of 3D printing in healthcare. *The Bulletin of the Royal College of Surgeons of England*, 96(7), 228-229.

Wilting, J., Christ, B., & Bokeloh, M. (1991). A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. *Anatomy and Embryology*, 183(3), 259-271.

Wolpert, L. (1999). *Entwicklungsbiologie*. Spektrum Akad. Verl..Heidelberg, Berlin

Xu, K., Zhu, C., Xie, J., Li, X., Zhang, Y., Yao, F., et al. (2018). Enhanced vascularization of PCL porous scaffolds through VEGF-Fc modification. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(27), 4474-4485.

Zalfen, A. M., Nizet, D., Jérôme, C., Jérôme, R., Frankenhe, F., Foidart, J. M., et al. (2008). Controlled release of drugs from multi-component biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 4(6), 1788-1796.

Zdolsek, J., Eaton, J. W., & Tang, L. (2007). Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. *Journal of Translational Medicine*, 5(1), 31.

Zein, I., Huttmacher, D. W., Tan, K. C., & Teoh, S. H. (2002). Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23(4), 1169-1185.

Zhao, L., Ma, S., Pan, Y., Zhang, Q., Wang, K., Song, D., et al. (2016). Functional modification of fibrous PCL scaffolds with fusion protein VEGF-HGF1 enhanced cellularization and vascularization. *Advanced Healthcare Materials*, 5(18), 2376-2385.

Internetquellen

<https://www.protec3d.de/3d-drucken/> (Stand 15.07.2020)

9 Anhang

9.1 Originale Datensätze

9.1.1 Anzahl der Verzweigungspunkte

Tabelle 9.1 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes A1

A1	Kontrolle	Anzahl Verzweigung	PolyP	Anzahl Verzweigung
	Messung 1	25	Messung 1	3
	Messung 2	27	Messung 2	2
	Messung 3	9	Messung 3	2
	Messung 4	16	Messung 4	4
	Messung 5	14	Messung 5	1
	Gesamt	91	Gesamt	12
	MW	18,2	MW	2,4
	SD	7,59605161	SD	1,14017543

Tabelle 9.2 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes A2

A2	Kontrolle	Anzahl Verzweigung	PolyP	Anzahl Verzweigung
	Messung 1	3	Messung 1	2
	Messung 2	8	Messung 2	4
	Messung 3	3	Messung 3	2
	Messung 4	6	Messung 4	0
	Messung 5	4	Messung 5	5
	Gesamt	24	Gesamt	13
	MW	4,8	MW	2,6
	SD	2,16794834	SD	1,94935887

Tabelle 9.3 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes A3

A3	Kontrolle	Anzahl Verzweigung	PolyP	Anzahl Verzweigung
	Messung 1	8	Messung 1	1
	Messung 2	11	Messung 2	0
	Messung 3	15	Messung 3	5
	Messung 4	20	Messung 4	2
	Messung 5	24	Messung 5	2
	Gesamt	78	Gesamt	10
	MW	15,6	MW	2
	SD	6,50384502	SD	1,87082869

Tabelle 9.4 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes B1

B1	Kontrolle	Anzahl Verzweigung	PolyP	Anzahl Verzweigung
	Messung 1	9	Messung 1	2
	Messung 2	11	Messung 2	4
	Messung 3	10	Messung 3	2
	Messung 4	14	Messung 4	0
	Messung 5	11	Messung 5	5
	Gesamt	55	Gesamt	13
	MW	11	MW	2,6
	SD	16,700442	SD	4,24084448

Tabelle 9.5 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes B2

B2	Kontrolle	Anzahl Verzweigung	PolyP	Anzahl Verzweigung
	Messung 1	6	Messung 1	4
	Messung 2	11	Messung 2	9
	Messung 3	10	Messung 3	9
	Messung 4	13	Messung 4	9
	Messung 5	6	Messung 5	3
	Gesamt	46	Gesamt	34
	MW	9,2	MW	6,8
	SD	14,1396437	SD	10,5747228

Tabelle 9.6 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes B3

B3	Kontrolle	Anzahl Verzweigung	PolyP	Anzahl Verzweigung
	Messung 1	7	Messung 1	10
	Messung 2	11	Messung 2	3
	Messung 3	14	Messung 3	8
	Messung 4	12	Messung 4	3
	Messung 5	11	Messung 5	4
	Gesamt	55	Gesamt	28
	MW	11	MW	5,6
	SD	16,7602137	SD	8,86265573

Tabelle 9.7 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes C1

C1	Kontrolle	Anzahl Verzweigung	PolyP	Anzahl Verzweigung
	Messung 1	12	Messung 1	11
	Messung 2	13	Messung 2	6
	Messung 3	10	Messung 3	12
	Messung 4	3	Messung 4	13
	Messung 5	12	Messung 5	10
	Gesamt	50	Gesamt	52
	MW	10	MW	10,4
	SD	15,4780951	SD	15,8773274

Tabelle 9.8 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes C2

C2	Kontrolle	Anzahl Verzweigung	PolyP	Anzahl Verzweigung
	Messung 1	9	Messung 1	3
	Messung 2	7	Messung 2	6
	Messung 3	7	Messung 3	2
	Messung 4	8	Messung 4	4
	Messung 5	9	Messung 5	4
	Gesamt	40	Gesamt	19
	MW	8	MW	3,8
	SD	12,1223917	SD	5,8713185

Tabelle 9.9 Anzahl der Verzweigungspunkte des Versuchsansatzes C3

C3	Kontrolle	Anzahl Verzweigung	PolyP	Anzahl Verzweigung
	Messung 1	10	Messung 1	8
	Messung 2	11	Messung 2	9
	Messung 3	14	Messung 3	13
	Messung 4	15	Messung 4	6
	Messung 5	15	Messung 5	4
	Gesamt	65	Gesamt	40
	MW	13	MW	8
	SD	19,747212	SD	12,4077549

9.1.2 Bestimmung der prozentualen Gefäßdichte

Tabelle 9.10 Originaldaten der prozentualen Gefäßdichte der verschiedenen Versuchsansätze

Gefäßdichte in % Fläche							
Probe/Gesichtsfeld	1	2	3	4	5	MW	SD
Kontrolle A1	57,2	51,7	44,9	33,6	41,2	39,83255	10,18169
Kontrolle A2	34,5	35,3	29,3	49,1	-		
Kontrolle A3	52,8	38,5	-	32,6	48,4		
Kontrolle B1	53,8	56,8	63,9	41,9	51,2		
Kontrolle B2	26,3	27,8	44,7	41,6	29,8		
Kontrolle B3	39,9	40,9	30,8	45,9	44,7		
Kontrolle C1	34,9	46,3	32,2	31,9	39,8		
Kontrolle C2	32,5	30,6	38,8	35,3	10,2		
Kontrolle C3	25,9	39,1	48,6	36,6	41		
Probe/Gesichtsfeld	1	2	3	4	5		
PolyP A1	6,4	12,3	10,9	18,3	14,8	22,39511	14,77821
PolyP A2	7,8	17	21	14,4	22,6		
PolyP A3	13,5	4,9	6,1	8,7	5,7		
PolyP B1	17,9	16,9	-	9,5	-		
PolyP B2	42,6	21	28,1	32,2	22,2		
PolyP B3	20,9	17,5	14,8	10,8	39		
PolyP C1	64	54	39,2	39,4	68,3		
PolyP C2	28,3	11,2	16,4	12,7	18,9		
PolyP C3	31,9	22,5	18,39	30,5	29,5		

9.1.3 Bestimmung der Gefäßdurchmesser

Tabelle 9.11 Originaldaten für die Bestimmung der mittleren Gefäßdurchmesser der Kontrollproben

Gefäßdurchmesser in px									
Messpunkte	1	2	3	4	5	MW in px	SD in px	MW in μm	SD in μm
Kontrolle A1	21,2	7,5	11,6	8	5	8,31	3,23	18,67	7,2674
	8,3	10,2	9,5	5	3,4				
	6,9	9,1	6,4	3	6,9				
	6,3	9,8	7,3	6,7	5,1				

	7,7	6,2	5	3,9	5,5
Kontrolle A2	9,2	9,3	9,5	13,3	8,5
	6,7	7,9	11,7	5,6	12,5
	22,9	10,3	8,4	6,2	11,3
Kontrolle A2	11,3	4,5	-	-	-
	14,5	14	11,4	6,8	7,8
Kontrolle A3	8,3	8,3	8,6	12,1	6
	10,6	6,4	-	-	-
	4,4	4	13	-	-
	3,4	5,9	-	-	-
	12,7	6,8	5,9	7,8	6,5
Kontrolle B1	7,1	7,1	7,5	9	9,6
	8,3	6,2	9,3	9,6	4,2
	9,6	5,9	7,3	8,2	20,3
	4,9	10,5	5,6	6,8	7,9
	3,5	9	9,8	6	7,3
Kontrolle B2	9	10,2	2,9	4,2	7,4
	10,3	13,6	4,8	7,2	6
	8,8	5,8	6,7	11,6	9,2
	9,8	7,5	13,8	3,8	6,9
	10,1	16	7,6	4,8	6,4
Kontrolle B3	15,7	5,5	7,6	14,7	9,3
	11,1	5,4	12,4	9,2	7,3
	4,7	11,2	10	6,3	9,1
	12,9	6,6	6,7	8,7	7,8
	20,4	5,4	7,1	5,6	6,3
Kontrolle C1	8,9	7,6	7,2	8,4	5,6
	8	8,8	10,6	7,2	9,2
	12,9	11,2	7,5	6,8	7,3
	5,3	5,6	6,4	7,2	7,8
	6,2	8,7	10,7	6,8	7
Kontrolle C2	10,7	8,8	7,4	8,6	6,3
	15,7	6,3	3,7	7,8	9,9
	12,4	9,7	7	5,8	7,8
	4,7	6,3	8,4	8,2	9,7
	6,3	7,5	7,6	-	-
Kontrolle C3	16,7	16,5	5,5	7,3	6,4
	7,8	8,2	7,5	9,6	6,9

	7,4	5,4	5,9	5,7	5,7
	7,7	9,9	14,2	6,4	6
	6,4	8,1	7,7	9,2	6,5

9.1.4 Bestimmung der Gefäßdurchmesser

Tabelle 9.12 Originaldaten für die Bestimmung der mittleren Gefäßdurchmesser der PolyP-modifizierten PCL-Proben

Gefäßdurchmesser in px									
Messpunkte	1	2	3	4	5	MW in px	SD in px	MW in μm	SD in μm
PolyP A1	15,2	16,2	9,2	-	-	7,84	2,71	17,63	6,095
	9,3	7,3	13,4	6,1	10,6				
	6,4	9,9	9,4	11,5	9,4				
	3,2	5,4	5,6	7,7	12,3				
	11	11,3	11,6	7,3	-				
PolyP A2	6,7	5,2	5,8	5,6	-				
	7,6	9,5	3,3	6,7	6,8				
	4,2	4,4	8,4	4,9	7,7				
	9	6,1	8,6	7,4	4,4				
	3,1	4,4	6,2	8,1	7,9				
PolyP A3	8,4	7,2	2,6	-	-				
	9,6	-	-	-	-				
	7,9	3	3,5	5	-				
	9,9	8,1	11,3	7,1	-				
	9,1	8	5,5	-	-				
PolyP B1	14,9	7,1	-	-	-				
	9,2	7,3	-	-	-				
	-	-	-	-	-				
	4,3	9,2	11,1	-	-				
	9,8	6,6	4,9	7	-				
PolyP B2	8,2	8,6	15,9	5,7	10,3				
	6,1	5,5	11,7	10,6	7,9				
	7,9	5,8	6,5	10,5	7,8				
	7,7	5,8	4,7	6,5	5,1				
	7,9	5,3	4,2	10,5	7,2				
PolyP B3	9,4	6,9	4,3	5,4	7,6				

	7,4	4,9	6,8	5,9	6,2
	8,2	7,3	6	4,4	5,7
	5,4	10,7	8,3	10,4	-
	7,9	8,1	-	-	-
PolyP C1	10,9	10,5	6,7	11,5	9,4
	7,9	8	9	5,1	6,2
	6,7	9,9	4,7	5,6	7,1
	14,1	10,7	7,8	10,4	10,6
	7,2	7,4	8,2	6,3	6
PolyP C2	6,3	13,1	10,2	4,3	11,8
	7,7	6,8	11,2	3,1	7,3
	7,3	10,2	8,9	11,2	10,4
	4,9	9,3	8,3	3,9	11,9
	13,5	5,3	6	6,2	7,3
PolyP C3	8,1	9,6	7,4	6,1	7
	9,7	9,4	8,3	4,6	18,6
	8,5	4,2	4,5	9,1	5,8
	8,5	8,2	4,9	11,2	8,1
	9,3	10,1	6	6,2	7,3

9.1.5 Bestimmung der Gefäßlängen

Tabelle 9.13 Originaldaten für die Bestimmung der mittleren Gefäßlängen

Gefäßlänge in px					
Probe/Gesichtsfeld	1	2	3	4	5
Kontrolle A1	35,7	55.870	43.647	39.042	38.971
	34,4	37.899	30.213	27.899	37.314
	32,7	30.556	27.314	27.314	35.728
	28,8	24.385	26.971	26.479	34.828
	27,1	24.385	24.657	24.142	34.042
	25,9	18.243	24.314	22.485	31.870
	22,1	14.314	23.556	22.485	31.385
	20,4	5.243	23.142	22.485	26.142
	20,1	-	21.485	21.314	25.971
	19,3	-	20.899	20.899	24.657
	18,8	-	17.728	20.414	24.243
	14,4	-	17.071	17.657	20.071
	14,4	-	16.899	17.485	18.899

	13,7	-	15.071	17.243	17.648
	-	-	14.899	16.899	15.071
	-	-	14.243	15.485	13.485
	-	-	13.537	14.828	12.828
	-	-	12.828	14.485	11.899
	-	-	12.828	14.243	9.414
	-	-	12.828	14.071	6.243
	-	-	12.414	10.243	5.414
	-	-	12.071	8.243	-
	-	-	11.657	4.414	-
	-	-	11.485	-	-
	-	-	11.071	-	-
	-	-	11.071	-	-
	-	-	10.899	-	-
	-	-	10.828	-	-
	-	-	10.414	-	-
	-	-	9.657	-	-
	-	-	9.485	-	-
	-	-	8.071	-	-
	-	-	7.657	-	-
	-	-	7.657	-	-
	-	-	6.828	-	-
	-	-	6.657	-	-
	-	-	6.000	-	-
	-	-	5.828	-	-
	-	-	5.828	-	-
	-	-	5.828	-	-
	-	-	3.414	-	-
Kontrolle A2	71,23	52.728	47.284	63,84	85,9
	17,4	49.627	46.426	23,12	-
	-	49.627	42.556	-	-
	-	46.698	32.698	-	-
	-	37.870	17.243	-	-
	-	27.971	10.657	-	-
	-	24.485	6.414	-	-
	-	17.314	-	-	-
	-	16.243	-	-	-
Kontrolle A3	38.314	38.698	39.385	47.355	40.971

	33.799	30.142	38.213	42.042	33.728
	31.728	26.627	28.971	38.971	32.456
	28.142	25.971	26.621	38.385	29.314
	26.385	23.385	26.485	35.142	28.314
	22.971	22.385	25.657	32.792	27.799
	20.071	21.142	21.142	24.971	27.556
	19.728	20.971	20.485	24.385	26.971
	19.485	20.828	19.899	22.556	26.971
	19.243	16.728	19.819	21.314	25.728
	18.728	16.064	18.971	18.314	24.828
	17.728	15.721	16.414	16.893	23.899
	17.243	13.657	16.314	14.485	23.556
	15.728	12.657	16.142	13.485	23.071
	15.657	12.071	16.062	12.828	22.142
	15.243	8.071	15.819	12.071	21.556
	14.314	4.243	13.650	10.262	20.899
	13.243	-	13.314	7.414	16.485
	12.485	-	12.848	4.243	15.899
	12.485	-	10.485	-	15.485
	11.657	-	8.414	-	15.071
	11.485	-	8.071	-	14.899
	11.243	-	7.414	-	14.728
	9.243	-	6.064	-	14.485
	8.657	-	4.243	-	13.243
	8.657	-	-	-	12.899
	8.243	-	-	-	12.071
	7.414	-	-	-	11.657
	6.828	-	-	-	11.485
	6.657	-	-	-	11.071
	6.650	-	-	-	9.828
	4.828	-	-	-	8.893
	4.414	-	-	-	7.657
	3.828	-	-	-	6.243
	-	-	-	-	5.243
	-	-	-	-	3.828
Kontrolle B1	56.255	64.142	38.941	50.792	56.770
	40.971	51.213	28.971	37.071	39.527
	31.799	47.627	28.627	24.899	32.890

	27.385	36.284	26.728	22.071	28.657
	25.627	32.627	25.142	21.556	25.828
	18.071	31.385	21.899	20.243	24.385
	13.899	30.042	19.728	19.899	24.142
	11.485	26.314	19.556	14.314	20.243
	-	26.071	19.071	13.314	20.071
	-	25.094	18.899	11.485	15.728
	-	17.971	18.243	7.064	15.728
	-	15.314	17.890	4.414	13.314
	-	15.314	16.899	-	11.485
	-	10.243	15.485	-	10.899
	-	9.657	15.314	-	10.657
	-	7.657	15.071	-	9.657
	-	7.657	14.728	-	8.657
	-	7.071	13.314	-	6.414
	-	6.243	12.485	-	-
	-	-	12.485	-	-
	-	-	11.899	-	-
	-	-	11.485	-	-
	-	-	11.243	-	-
	-	-	10.657	-	-
	-	-	5.414	-	-
Kontrolle B2	47.728	53.355	44.042	38.142	33.042
	38.627	42.698	41.728	35.449	27.556
	35.385	18.657	34.627	35.243	25.971
	12.000	15.899	30.828	33.890	22.971
	7.414	-	26.621	33.870	16.485
	-	-	14.828	24.136	11.899
	-	-	10.262	22.243	10.485
	-	-	10.071	17.728	4.414
	-	-	-	14.485	-
	-	-	-	9.414	-
	-	-	-	7.414	-
Kontrolle B3	60.770	39.449	46.456	35.142	38.792
	57.905	35.485	32.556	33.971	26.385
	44.213	31.385	31.042	33.556	24.385
	43.698	27.485	15.243	25.627	21.142
	34.142	26.213	14.314	24.657	19.062

	18.728	25.142	14.314	22.385	16.728
	13.314	24.728	13.485	22.314	16.485
	7.657	22.657	13.314	22.314	15.899
	-	21.207	8.243	21.899	15.728
	-	20.071	7.657	21.899	15.414
	-	19.314	4.243	19.886	14.071
	-	18.728	-	19.728	13.899
	-	18.071	-	18.243	12.657
	-	16.485	-	17.657	11.899
	-	14.485	-	15.657	11.243
	-	12.414	-	15.657	9.657
	-	11.899	-	14.000	9.657
	-	10.899	-	13.657	9.414
	-	8.071	-	10.485	8.657
	-	4.828	-	5.243	6.414
	-	3.828	-	-	-
Kontrolle C1	45.142	36.556	40.556	33.627	47.086
	40.870	36.071	39.243	33.142	37.799
	36.870	32.314	26.142	31.728	28.544
	28.314	28.213	21.728	25.728	27.556
	25.207	27.971	18.728	17.828	27.385
	20.556	23.728	17.728	16.485	26.728
	20.485	23.071	13.728	16.485	25.385
	18.899	21.485	-	15.243	20.550
	18.556	20.728	-	11.899	19.858
	18.142	20.314	-	11.657	19.728
	17.899	17.485	-	-	19.485
	16.314	13.828	-	-	19.233
	16.243	10.071	-	-	18.142
	14.485	6.414	-	-	14.243
	11.657	-	-	-	13.899
	11.243	-	-	-	13.314
	10.899	-	-	-	12.657
	10.657	-	-	-	12.071
	9.414	-	-	-	11.657
	-	-	-	-	11.243
	-	-	-	-	10.485
	-	-	-	-	9.485

	-	-	-	-	7.071
	-	-	-	-	6.828
	-	-	-	-	6.414
	-	-	-	-	6.243
	-	-	-	-	3.414
Kontrolle C2	48.385	39.113	44.213	40.799	36.799
	33.728	31.385	28.657	25.071	34.556
	28.385	24.385	28.314	19.556	18.485
	20.828	23.657	28.142	18.243	14.657
	18.243	18.728	27.243	18.142	-
	16.243	13.071	26.556	4.828	-
	14.650	12.899	17.243	-	-
	12.071	-	17.071	-	-
	9.414	-	16.243	-	-
	-	-	15.899	-	-
	-	-	15.728	-	-
	-	-	10.414	-	-
Kontrolle C3	31.142	65.304	49.456	30.243	37.314
	31.074	44.621	34.278	28.485	34.385
	28.314	32.556	23.657	28.385	30.627
	27.071	28.893	22.657	27.899	28.385
	24.213	28.657	21.556	24.314	24.828
	23.307	26.971	21.136	23.728	24.828
	22.485	25.071	20.650	23.314	22.213
	19.385	24.899	20.556	22.799	20.728
	16.556	23.971	20.142	21.071	17.485
	14.314	23.142	19.479	20.314	16.071
	13.899	20.142	19.071	20.243	15.728
	12.899	18.899	18.650	19.071	15.657
	-	16.142	18.556	18.485	15.314
	-	15.728	18.485	14.071	13.485
	-	14.314	18.314	12.485	13.314
	-	9.064	18.071	12.071	13.071
	-	-	17.314	9.243	12.485
	-	-	16.550	9.243	12.314
	-	-	14.657	8.000	11.828
	-	-	14.243	7.243	11.485
	-	-	8.828	6.414	6.243

	-	-	7.071	6.414	6.000
	-	-	5.828	5.828	5.828
	-	-	-	3.828	3.828
	-	-	-	-	3.828
	-	-	-	-	3.414

Tabelle 9.14 Berechnung der mittleren Gefäßlängen

	Kontrolle	PolyP
MW in px	22,7883458	26,7077907
SD in px	5,89730323	8,28395162
	Kontrolle	PolyP
MW in μm	51,2097658	60,0175071
SD in μm	13,2523668	18,6156216

Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei meinem Betreuer und allen Personen bedanken, die mich bei der Umsetzung dieser Arbeit unterstützt haben. Ohne diese Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank.

Curriculum Vitae