

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

Albumin-Nanopartikel als Drug Delivery System zur Oberflächenmodifikation poröser
Polyethylenimplantate

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Niklas Hoormann
aus Fulda

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:



1. Gutachter:



2. Gutachter:



Tag der Promotion:

08. Dezember 2020

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Abbildungsverzeichnis	3
3. Einleitung	5
4. Literaturdiskussion	7
4.1 Materialien der rekonstruktiven Chirurgie	7
4.2 Poröses Polyethylen	7
4.3 Angiogenese	9
4.4 Tissue Engineering	11
4.5 Drug Delivery Systeme	12
4.6 Hydrogele	13
4.7 Mikro- und Nanopartikel	14
4.8 Albumin	16
4.9 Albumin-Nanopartikel als DDS für PPE	18
4.10 Die transparente Rückenhautkammer	19
5. Material und Methoden	20
5.1 Versuchstiere und Tierhaltung	20
5.2 MSA-Nanopartikel	21
5.3 PPE	22
5.4 Präparation der Rückenhautkammer	24
5.5 Intravitalmikroskopie	27
5.6 Versuchsgruppen und Versuchsprotokoll	28
5.7 Statistik	30
6. Ergebnisse	33
6.1 Absolute Fluoreszenzintensität	33
6.1.1 ROI 1	33
6.1.2 ROI 2-5	35

6.1.3 ROI 6-9	36
6.1.4 Absolute Fluoreszenzintensität 10 ms	36
6.2 Sulforhodamin 101	37
6.2.1 Fluoreszenzintensität über 10 Tage 50 ms	37
6.2.2 Fluoreszenzintensität über 10 Tage 10 ms	40
6.2.3 Fluoreszenzintensität in Stunde 1	41
6.3 Etanercept	43
6.3.1 Fluoreszenzintensität über 10 Tage 50 ms	43
6.3.2 Fluoreszenzintensität über 10 Tage 10 ms	45
6.4 Sulforhodamin 101 und Etanercept	46
6.5 Überblick.....	46
7. Diskussion	49
7.1 Absolute Messwerte der Fluoreszenzintensität.....	49
7.2 Albumin-Nanopartikel beladen mit Sulforhodamin 101	50
7.2.1 Effekte der Nanopartikel über zehn Tage nach PPE-Implantation.....	50
7.2.2 Effekte der Nanopartikel in der ersten Stunde nach PPE-Implantation.....	52
7.2.3 Mikro- und Nanopartikel aus Albumin als DDS	52
7.2.4 Mikro- und Nanopartikel aus anderen Materialien als DDS	56
7.3 Albumin-Nanopartikel beladen mit Etanercept.....	59
7.4 Ausblick	61
8. Zusammenfassung.....	63
9. Literaturverzeichnis	65
10. Anhang	77
11. Danksagung.....	100
12. Tabellarischer Lebenslauf	101

1. Abkürzungsverzeichnis

AU	arbitrary units
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP-2	bonemorphogenetic protein 2
CAM	chorio-allantoic membrane
CMV	Cytomegalovirus
DDS.....	Drug Delivery System
EGF	epidermal growth factor
EPR.....	enhanced permeability and retention
FGF	fibroblast growth factor
IGF-1	insulin-like growth factor 1
MIA.....	Multi-Image-Array
MSA	murines Serumalbumin
Nab-Paclitaxel	nanoparticle albumin bound paclitaxel
PCL	Polycaprolacton
PDGF	platelet-derived growth factor
PEG.....	Polyethylenglycol
PGA.....	Polyglycolsäure (polyglycolic acid)
PLA	Polylactid (polylactic acid)
PLG/PLGA.....	Polylactid-co-Glycolid (polylactic-co-glycolic acid)
PPE	Poröses Polyethylen
ROI.....	region of interest
SR 101	Sulforhodamin 101
TET	4-(2-phenyl-2H-tetrazol-5-yl)Benzoessäure
TGF- β	transforming growth factor β

TNF Tumornekrosefaktor

VEGFvascular endothelial growth factor

2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ablauf der Angiogenese	10
Abb. 2: Bindungsformen in Drug Delivery Systemen.....	13
Abb. 3: Verschiedene Gruppen von Nanopartikeln	14
Abb. 4: MSA-Nanopartikel	18
Abb. 5: Etanerceptstruktur	19
Abb. 6: Synthese der MSA-Nanopartikel.....	22
Abb. 7: PPE-Beschichtung per Dip-Coating	23
Abb. 8: Aufbau der Rückenhautkammer	24
Abb. 9: Anbringen der Haltefäden	25
Abb. 10: Transparente Rückenhautkammer.....	26
Abb. 11: Intravitalmikroskopie	27
Abb. 12: Anordnung der ROIs	28
Abb. 13: Schema zum Versuchsablauf	29
Abb. 14: Boxplots ROI 1, 50 ms	34
Abb. 15: Boxplots ROI 2-5, 50 ms	35
Abb. 16: Boxplots ROI 6-9, 50 ms	36
Abb. 17: Intravitalmikroskopische Aufnahmen SR 101 (50 ms).....	37
Abb. 18: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 1, 50 ms.....	38
Abb. 19: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 2-5, 50 ms.....	39
Abb. 20: Intravitalmikroskopische Aufnahmen SR 101 (10 ms).....	40
Abb. 21: Intravitalmikroskopische Aufnahmen SR 101 (50 ms) in Stunde 1	41
Abb. 22: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 1, 50 ms, Stunde 1... 41	
Abb. 23: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 2-5, 50 ms, Stunde 1	42
Abb. 24: Intravitalmikroskopische Aufnahmen Etanercept (50 ms)	43
Abb. 25: Fluoreszenzverlauf „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ in ROI 1, 50 ms	44
Abb. 26: Fluoreszenzverlauf „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ in ROI 2-5, 50 ms	45
Abb. 27: Intravitalmikroskopische Aufnahmen Etanercept (10 ms)	45
Abb. 28: Fluoreszenzverlauf aller vier Versuchsgruppen in ROI 1 (50 ms)	47
Abb. 29: Fluoreszenzverlauf aller vier Versuchsgruppen in ROI 2-5 (50 ms).....	48
Abb. 30: Boxplots ROI 1, 10 ms	78
Abb. 31: Boxplots ROI 2-5, 10 ms	78

Abb. 32: Boxplots ROI 6-9, 10 ms	79
Abb. 33: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 1, 10 ms	79
Abb. 34: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 2-5, 10 ms.....	80
Abb. 35: Fluoreszenzverlauf „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ in ROI 1, 10 ms	80
Abb. 36: Fluoreszenzverlauf „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ in ROI 2-5, 10 ms	81
Abb. 37: Fluoreszenzverlauf aller vier Versuchsgruppen in ROI 1 (10 ms)	81
Abb. 38: Fluoreszenzverlauf aller vier Versuchsgruppen in ROI 2-5 (10 ms).....	82

3. Einleitung

Im Gesicht und am Hals können durch Traumata, Tumore und kongenitale Dysplasien chirurgische Rekonstruktionen mit dem Einsatz von Implantaten notwendig sein. Neben natürlichen Substanzen werden auch alloplastische Materialien verwendet. (Sclafani et al., 1997)

Poröses Polyethylen (PPE) wird seit mehreren Jahrzehnten bei diversen Indikationen zur Rekonstruktion von Knochen- und Knorpelgewebe im Kopf-Hals-Bereich eingesetzt. Probleme in der klinischen Praxis treten vor allem bei schlechter Vaskularisation des Implantats und einer starken Entzündungsreaktion auf. Daher wird die Oberfläche des PPE für eine bessere Integration in den Körper beispielsweise mit Zellen oder Wachstumsfaktoren aus der Angiogenese modifiziert. (Strieth, 2013) Angesichts der geringen Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren und der komplexen Abläufe der Angiogenese ist jedoch eine präzise Kontrolle der Pharmakokinetik erforderlich, um eine bessere biologische Wirksamkeit zu gewährleisten (Sabini et al., 2000, Biondi et al., 2008). Als Systeme zur kontrollierten Freisetzung werden Hydrogele sowie Mikro- und Nanopartikel aus synthetischen und biologischen Substanzen untersucht (Chu and Wang, 2012).

Albumin ist das häufigste Plasmaprotein im menschlichen Körper und bietet hervorragende Eigenschaften wie Biokompatibilität, Stabilität, kommerzielle Verfügbarkeit und eine lange Halbwertszeit. Aus diesen Gründen werden Drug Delivery Systeme aus Albumin zur Modulation der Pharmakokinetik und Biodistribution von Arzneistoffen in vielen medizinischen Bereichen genutzt. Albumin-Nanopartikel werden als Nab-Paclitaxel (Abraxane®) in der Tumorthherapie angewandt. (Kratz, 2008, Elsadek and Kratz, 2012)

Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass sich Albumin-Nanopartikel auch als Drug Delivery Systeme zur Optimierung von Implantaten aus PPE eignen.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde in dieser Arbeit die Oberfläche poröser Polyethylenimplantate mit Albumin-Nanopartikeln modifiziert und die Effekte auf die Pharmakokinetik enkapsulierter Substanzen *in vivo* untersucht.

Die Auswirkungen der Nanopartikel auf Substanzen unterschiedlicher molekularer Masse wurden getestet, indem zwei verschiedene Substanzen zum Einsatz kamen. Als niedermolekulare Substanz wurde der Fluorophor Sulforhodamin 101 (SR 101) und als hochmolekulare Substanz das Immunsuppressivum Etanercept gewählt, das vorher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde. Über eine inverse

Miniemulsionstechnik wurden Albumin-Nanopartikel hergestellt und SR 101 oder Etanercept enkapsuliert.

Im weiteren Verlauf wurden die PPE-Implantate entweder mit den jeweiligen Nanopartikeln oder als Kontrollgruppen nur mit den nativen Substanzen SR 101 oder Etanercept beschichtet. Die vier unterschiedlich beschichteten Implantatgruppen wurden zur *In vivo*-Betrachtung in transparente Rückenhautkammern von Mäusen eingesetzt.

Zur Untersuchung der Effekte der Nanopartikel auf die Pharmakokinetik der Substanzen wurde die Fluoreszenzintensität am Modell der transparenten Rückenhautkammer über einen Zeitraum von zehn Tagen gemessen und der Verlauf der einzelnen Gruppen statistisch analysiert sowie miteinander verglichen. Dies erfolgte sowohl im PPE-Implantat selbst als auch in direkter Umgebung des Implantats und in weiter entfernten Bereichen der Rückenhautkammer, um Auswirkungen einer Beschichtung auf das Gewebe um das PPE zu ermitteln.

4. Literaturdiskussion

4.1 Materialien der rekonstruktiven Chirurgie

Für Implantate in der rekonstruktiven Chirurgie sind bestimmte Eigenschaften der jeweiligen Materialien grundlegend für eine erfolgreiche Therapie:

Sie müssen für den chirurgischen Einsatz individuell anpassbar, formstabil, biologisch verträglich für das Gewebe und zur Sterilisation geeignet sein sowie durch den Körper nicht oder kaum resorbiert werden. (Berghaus et al., 1984)

Prinzipiell kommen als Materialien autogene, allogene oder alloplastische Substanzen in Frage, wobei jede Gruppe – wie beispielsweise bei Sclafani et al. (1997), Cenzi et al. (2005) sowie Berghaus und Stelter (2006) beschrieben – unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweist:

Autogene Materialien bieten die beste biologische Verträglichkeit, sind allerdings nicht immer in ausreichender Menge verfügbar, müssen in die gewünschte Form gebracht werden, weisen eine erhöhte Morbidität aufgrund der Entnahme von körpereigenem Material auf und werden teilweise resorbiert.

Allogene und alloplastische Implantate können hingegen in benötigtem Umfang bereitgestellt werden und die Operationszeit sowie die operative Morbidität reduzieren, da kein körpereigenes Gewebe zur Rekonstruktion entnommen wird. Nachteile der allogenen Implantate sind die Antigenität des Materials, das Risiko der Übertragung einer Infektion vom Spender auf den Empfänger sowie ebenfalls die Resorption durch den Körper.

Alloplastische Materialien bieten in Größe und Form optimale Bedingungen, allerdings sind erhöhte Infektionsraten, eine mögliche Inkompatibilität mit dem körpereigenen Gewebe sowie eine Dislokation und Verformung des Implantats möglich.

Bei alloplastischen Substanzen muss zwischen kompakten und porösen Werkstoffen unterschieden werden. Poröse Implantate weisen in der frühen Phase nach der Operation ein höheres Infektionsrisiko aufgrund der größeren Oberfläche auf, spätere Infektionen sind weniger wahrscheinlich. Kompakte Materialien bedingen eine stärkere Ausbildung einer fibrösen Kapsel, sodass diese leichter dislozieren mit möglicher Folge einer Infektion und Abstoßung des Implantats. (Sclafani et al., 1997, Cenzi et al., 2005, Berghaus and Stelter, 2006)

4.2 Poröses Polyethylen

Poröses Polyethylen (PPE) ist ein thermoplastischer Kunststoff, der bei verschiedenen Indikationen als Knochen- und Knorpelersatz dient (Berghaus et al., 1984, Berghaus,

1985).

PPE wird bei Operationen im Kopf-Hals-Bereich unter anderem zur Ohrmuschelplastik (Berghaus et al., 1983, Berghaus et al., 2010), zur Rekonstruktion der Orbita (Patel et al., 2003, Lee et al., 2005, Mohammadi et al., 2012) sowie zur Rhinoplastik (Mendelsohn, 2005, Berghaus and Stelter, 2006, Cho et al., 2013, Scopelliti and Amodeo, 2016) verwendet. Es zeichnet sich durch hohe individuelle Anpassungsmöglichkeiten aufgrund seiner thermoplastischen Eigenschaften und Stabilität aus, wird kaum resorbiert und fördert durch seine Porenstruktur das Gewebewachstum (Wellisz, 1993, Cenzi et al., 2005, Scopelliti and Amodeo, 2016). Die Bildung neuer Blutgefäße im Implantat, die Vaskularisation, wird entscheidend von der Porosität des Materials beeinflusst (Homsy, 1970, Klawitter et al., 1976, Ehrmantraut et al., 2010, Chiu et al., 2011). PPE weist mit einer Porengröße zwischen 100 µm und 200 µm optimale Bedingungen auf (Berghaus, 1985, Wellisz, 1993, Goldberg et al., 1994, Berghaus et al., 2010). Es wird in einer Langzeitstudie von Niechajev als das beste alloplastische Knochenersatzmaterial im Gesicht aufgrund der genannten Eigenschaften, einer hohen Patientenzufriedenheit sowie einer niedrigen Komplikationsrate beschrieben (Niechajev, 2012). Komplikationen treten je nach Literaturangabe in der Regel in fünf bis zehn Prozent der Fälle auf und können eine Explantation des PPE erfordern (Yaremchuk, 2003, Cenzi et al., 2005, Lee et al., 2005, Niechajev, 2012). Ursachen hierfür stellen Infektionen, Dislokationen und Extrusionen des Implantats sowie ästhetische Gründe dar (Goldberg et al., 1994, Yaremchuk, 2003, Cenzi et al., 2005, Lee et al., 2005, Gosau et al., 2006, Niechajev, 2012, Kim et al., 2014, Scopelliti and Amodeo, 2016, Fanous et al., 2017). Diese treten vor allem bei Implantaten mit ungenügender Weichteildeckung und schlechter Vaskularisation auf (Wellisz, 1993, Cenzi et al., 2005, Gosau et al., 2006, Stelter et al., 2007, Niechajev, 2012).

Nach Implantation des PPE findet im umgebenden Gewebe eine Entzündungsreaktion, auch Fremdkörperreaktion genannt, statt und das Implantat kommt in Kontakt mit inflammatorischen Molekülen, Proteinen der extrazellulären Matrix und Wachstumsfaktoren (Anderson et al., 2008, Strieth, 2013). Fibrovaskuläre Zellen infiltrieren das PPE, neue Gefäße bilden sich ausgehend von den Kapillaren des umgebenden Gewebes zuerst peripher im Implantat und wachsen im Verlauf in die Tiefe (Spector et al., 1975, Goldberg et al., 1994, Steinhart et al., 1996, Patel et al., 2003).

Das Implantat ist dabei physiologischem Gewebe umso ähnlicher, je besser das

fibrovaskuläre Gewebe in das PPE einwächst und je schwächer die Fremdkörperreaktion ausfällt (Sclafani et al., 1997, Anderson et al., 2008, Strieth, 2013).

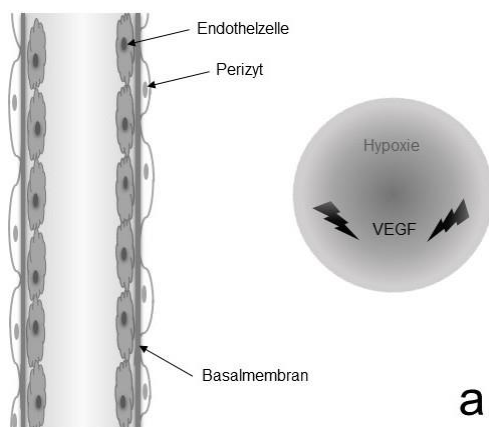
Ansätze zur Verbesserung des klinischen Erfolgs bei PPE-Implantaten stellen folglich eine Optimierung der Oberfläche und ferner die Förderung der Vaskularisation dar.

4.3 Angiogenese

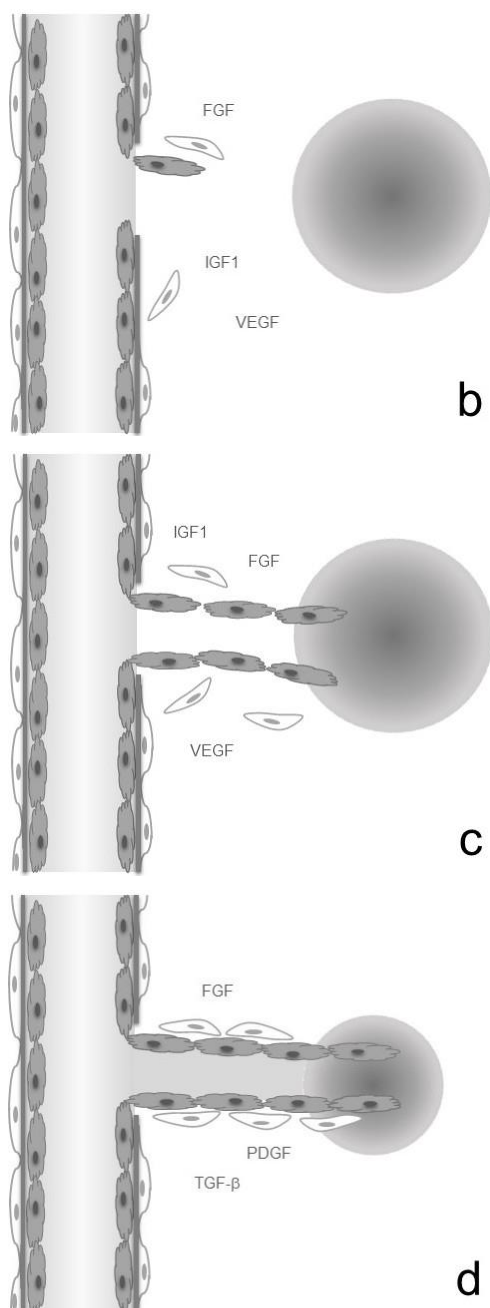
Die Vaskularisation von Implantaten ist für eine Integration in den Körper zwingend notwendig, da Zellverbände lediglich über eine Distanz von 150-200 µm durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt werden können und daher nur eine Anbindung an die Blutversorgung ein weiteres Wachstum ermöglicht (Folkman and Hochberg, 1973). Im Zusammenhang der Vaskularisation, die allgemein die Bildung von Blutgefäßen beschreibt (Chu and Wang, 2012), existieren verschiedene Begriffe, die kurz erklärt werden müssen:

Neovaskularisation ist die Formation eines neuen Gefäßnetzwerks mit Perfusion roter Blutzellen und wird bei Implantaten oft synonym zur Vaskularisation verwendet (Auger et al., 2013).

Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese beziehen sich auf die zellulären Mechanismen der Entstehung von Blutgefäßen. Vaskulogenese beschreibt die Differenzierung von Stammzellen (Angioblasten) zu Endothelzellen und findet insbesondere im Embryo statt. Angiogenese ist definiert als die Aussprossung von Kapillaren aus bestehenden Gefäßen. Arteriogenese bezeichnet kollaterales Gefäßwachstum, indem sich Perizyten oder glatte Muskelzellen an Endothelzellkanäle anlagern und diese stabilisieren, um die Perfusion zu kontrollieren, beispielsweise bei der Vergrößerung von Kollateralgefäßen bei Gefäßokklusionen. (Carmeliet, 2000, Carmeliet and Jain, 2011)



Die molekularen Mechanismen der Angiogenese (s. Abb. 1), wie sie auch in Implantaten stattfinden, werden von Carmeliet sowie Carmeliet und Jain beschrieben: Durch Hypoxie oder Entzündung wird ein angiogenes Signal wie VEGF (vascular endothelial growth factor) ausgelöst, das die vaskuläre Permeabilität steigert (a).



Plasmaproteine, beispielsweise Fibrinogen und Fibronectin, extravasieren und bilden ein Grundgerüst für später migrierende Endothelzellen.

Matrixmetalloproteinasen bauen die Basalmembran proteolytisch ab, setzen Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor), VEGF und IGF-1 (insulin-like growth factor 1) frei und destabilisieren die Gefäße (b). Die Endothelzellen wandern ins Interstitium, lagern sich strangförmig zusammen und bilden ein Lumen aus (c). Perizyten und glatte Muskelzellen stabilisieren die Endothelzellen unter Einfluss von PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor β) sowie FGF und benachbarte Kapillaren fusionieren (d). (Carmeliet, 2000, Carmeliet and Jain, 2011)

Abb. 1: Ablauf der Angiogenese adaptiert aus: (Carmeliet and Jain, 2011, Van Hove and Benoit, 2015)

Die Vaskularisation von Implantaten beruht dementsprechend auf einer koordinierten Abfolge diverser humoraler und zellulärer Mechanismen über einen längeren Zeitraum (Clowes et al., 1985, Laschke and Menger, 2012). Abhängig vom jeweiligen Implantat werden in diversen Studien nach drei bis fünf Tagen erste Gefäße beschrieben und eine komplette Vaskularisation erfolgt frühestens nach zwei Wochen (Menger et al., 1990, Steinhart et al., 1996, Druecke et al., 2004, Laschke et al., 2005, Lindhorst et al., 2010).

Zur Verbesserung der Vaskularisation erscheint eine Nutzung der molekularen Mechanismen der Angiogenese unter Verwendung der beteiligten Wachstumsfaktoren und Zellen sinnvoll.

4.4 Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein hochaktuelles, breit aufgestelltes Forschungsgebiet und beschreibt die Entwicklung von Materialien und Techniken, um Gewebe bestmöglich und nach individuellen Anforderungen ersetzen zu können (Langer and Vacanti, 1993, Vacanti and Langer, 1999, Khademhosseini and Langer, 2016).

Strategien zur Verbesserung der Integration von Implantaten in den Körper umfassen hierbei die Modifikation der Oberfläche, die Transplantation von Zellen, die Prävascularisation des Materials und die Applikation von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Laschke et al., 2006, Santos and Reis, 2010, Novosel et al., 2011, Chu and Wang, 2012, Laschke and Menger, 2012, Strieth, 2013).

Die Oberfläche wird beispielsweise mit Proteinen (Unger et al., 2005) und Komponenten der extrazellulären Matrix (Laschke et al., 2008b) beschichtet. Endothelzellen (Nor et al., 2001), hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen (Moioli et al., 2008, Schumann et al., 2009, Sterodimas et al., 2009, Laschke et al., 2013, Temple et al., 2014) oder eine Kombination aus diesen (Koike et al., 2004) werden vor Implantation auf das Material transferiert. Eine Prävascularisation des Implantats mit konsekutivem Anschluss an die körpereigenen Gefäße, Inoskulation genannt, ist ebenfalls möglich (Laschke et al., 2008a, Auger et al., 2013). Faktoren aus der Angiogenese wie VEGF (Eckardt et al., 2005, Gbureck et al., 2007) und FGF (Bigam et al., 1999) werden genauso wie Faktoren der Blutgerinnung (Reichel et al., 2015, Sclafani et al., 2005) verwendet, sowohl separat als auch kollektiv (Sabini et al., 2000, Gerard et al., 2010, Wilkins et al., 2014). Diese vier genannten Strategien werden für eine bessere Integration von Implantaten in den Körper auch untereinander kombiniert (Ma et al., 2005, Schoen et al., 2009, Lindhorst et al., 2010, Strieth et al., 2010, Schumann et al., 2014, Laschke et al., 2010, Weger, 2011).

Obwohl teils Erfolge hinsichtlich Vaskularisation und Integration der Materialien erzielt werden, bleiben die Ergebnisse insbesondere bei der Verwendung von angiogenetischen Faktoren hinter den Erwartungen zurück. Da Angiogenese und Gewebewachstum über eine zeitlich und räumlich präzise kontrollierte Freisetzung dieser Faktoren gesteuert werden und die Halbwertszeiten der meisten dieser Faktoren nur einige Stunden betragen, muss dies auch im Tissue Engineering berücksichtigt werden. (Sabini et al., 2000, Yancopoulos et al., 2000, Gbureck et al., 2007, Santos and Reis, 2010, Chu and Wang, 2012, Auger et al., 2013)

4.5 Drug Delivery Systeme

Drug Delivery Systeme (DDS) sollen die Freisetzung eines Pharmakons im Körper kontrollieren und so die Pharmakokinetik und Biodistribution modifizieren (Allen and Cullis, 2004). Die kontrollierte Freisetzung soll die biologisch wirksame Substanz in einer adäquaten Dosis über einen gewünschten Zeitraum am Zielort bereitstellen (Langer, 1990, Langer, 1998, Holland and Mikos, 2006, Nair and Laurencin, 2006, Biondi et al., 2008). Durch eine stärkere lokale Wirkung werden die gewünschten Effekte verstärkt und systemische Nebenwirkungen reduziert (Langer, 1990, Langer, 1998, Biondi et al., 2008).

Entgegengesetzt zur kontrollierten Freisetzung steht die Bolusgabe einer Substanz mit einem Burst, der abrupten Freisetzung einer großen Menge mit kurzzeitigen biologischen Effekten (Chu and Wang, 2012).

Da Wachstumsfaktoren schnell vom eigentlichen Zielort diffundieren und rasch abgebaut oder deaktiviert werden, muss ein DDS diese vor Abbau schützen und deren Bioaktivität langfristig erhalten (Biondi et al., 2008, Quaglia, 2008, Chu and Wang, 2012).

Ein DDS besteht aus dem Pharmakon und dem Carrier, der ersteres stabilisiert und eine zu frühe Metabolisierung verhindert (Allen and Cullis, 2004, Quaglia, 2008). Die Toxizität der Carriersubstanz und ihrer Abbauprodukte sowie der Metabolismus und die Elimination dieser müssen bedacht werden (Langer, 1998, Allen and Cullis, 2004). Ein DDS im Allgemeinen kann auch oral oder per Injektion appliziert werden, im Tissue Engineering wird jedoch primär an depotbasierten Systemen gearbeitet, da eine direkte Wirkung am Zielort und minimale Nebenwirkungen gewünscht sind (Van Hove and Benoit, 2015). Typische Systeme stellen Hydrogele sowie Mikro- und Nanopartikel dar (Biondi et al., 2008, Chu and Wang, 2012, Van Hove and Benoit, 2015). Außerdem werden Nanofasern, tubuläre Netzwerke, die durch Electrospinning erzeugt werden, auf ihr Potential als DDS untersucht (Dror et al., 2008, Fu et al., 2008, Regev et al., 2010).

Die Kopplung des Pharmakons an den Carrier und die resultierende Freisetzung im Körper kann über unterschiedliche Formen der Bindung erfolgen, die die Pharmakokinetik bestimmen (s. Abb. 2).

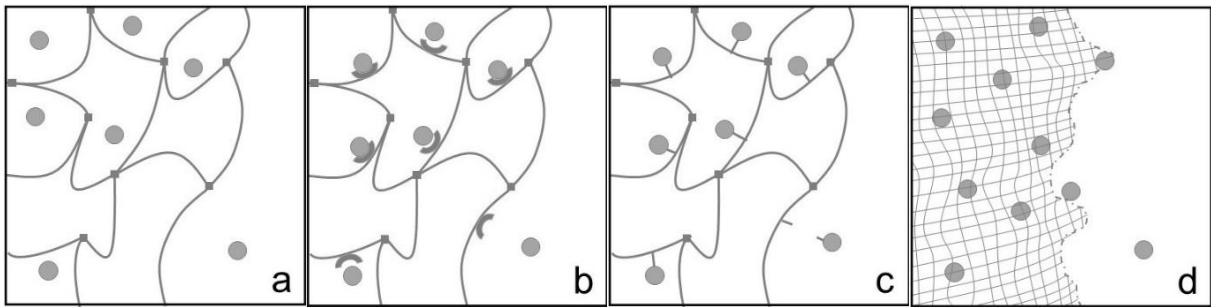


Abb. 2: Bindungsformen in Drug Delivery Systemen
adaptiert aus: (Van Hove and Benoit, 2015)

Erstens kann das Pharmakon löslich in der Carriermatrix verteilt vorliegen, die Freisetzung findet durch Diffusion statt (a). Zweitens ist eine affinitätsbasierte Freisetzung über reversible nichtkovalente Bindungen an den Carrier möglich, die Diffusion wird verlangsamt (b). Drittens wird eine kovalente Bindung verwendet, die enzymatisch gespalten werden muss, um das Pharmakon freizusetzen (c). Viertens umschließt der Carrier das Pharmakon in Form eines Partikels und muss für dessen Freisetzung ebenfalls abgebaut werden (d). (Biondi et al., 2008, Chu and Wang, 2012, Van Hove and Benoit, 2015, Pakulska et al., 2016)

Neben den genannten Optionen stellt auch die Applikation von Plasmiden, welche die Expression angiogenetischer Faktoren steigern, eine Variante zur besseren Vaskularisation im Tissue Engineering dar (Shea et al., 1999, Geiger et al., 2007, Biondi et al., 2008, Mao et al., 2009).

4.6 Hydrogele

Ein Hydrogel besteht aus hydrophilen Polymeren, die dreidimensional miteinander verbunden sind (Chu and Wang, 2012). Es werden sowohl synthetische Polymere wie Polyethylenglycol (PEG) als auch natürliche Polymere wie Fibrin, Gelatine, Hyaluronsäure und Kollagen verwendet (Biondi et al., 2008, Chu and Wang, 2012, Van Hove and Benoit, 2015).

Die kontrollierte Freisetzung von Pharmaka aus Hydrogelen kann analog zu den oben beschriebenen Bindungsformen über die Spaltung kovalenter Bindungen erfolgen (Zisch et al., 2003). Eine affinitätsbasierte Freisetzung ist in Hydrogelen ebenfalls möglich, beispielsweise über die Bindung an Heparin (Pike et al., 2006, Biondi et al., 2008, Ghanaati et al., 2009, Pakulska et al., 2016, Janse van Rensburg et al., 2017). Affinitätsbasierte DDS können auch gemeinsam mit DDS aus Partikeln in Hydrogelen eingesetzt werden (Chung et al., 2010, Anderson et al., 2011). Wie bei den bereits besprochenen Techniken im Tissue Engineering erfolgt auch in diesem Falle nur eine systematische Abgrenzung, die simultane Anwendung ist gegeben.

4.7 Mikro- und Nanopartikel

Mikro- und Nanopartikel werden als DDS zur Kontrolle der Freisetzung, Stabilisation, Verzögerung des Abbaus, Optimierung der Biokompatibilität und Verbesserung der Löslichkeit von Pharmaka eingesetzt (Singh and Lillard, 2009, Zhang and Uludag, 2009, Shi et al., 2010, Santo et al., 2012, Monteiro et al., 2015, Lee et al., 2016). Prinzipiell gehören zur Gruppe der Mikro- und Nanopartikel auch Dendrimere, Mizellen und Liposomen (s. Abb. 3) (Zhang and Uludag, 2009, Monteiro et al., 2015). Im Folgenden werden aber lediglich Mikro- und Nanokapseln und -sphären auf Polymerbasis thematisiert, da diese den größten Anteil bilden (Santo et al., 2012) und viele Vorzüge bieten, die nachstehend aufgeführt sind.

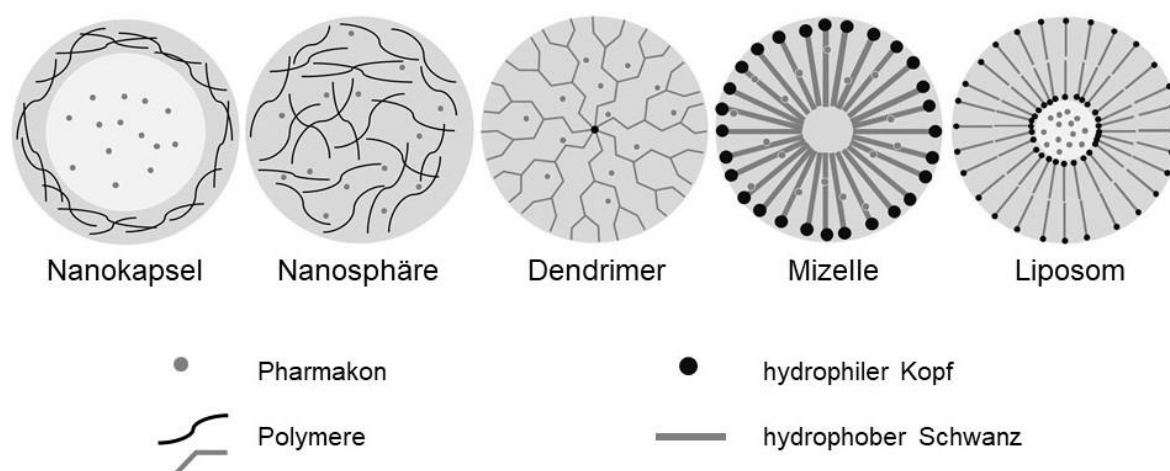


Abb. 3: Verschiedene Gruppen von Nanopartikeln
adaptiert aus: (Zhang and Uludag, 2009, Monteiro et al., 2015)

Sphären und Kapseln unterscheiden sich darin, dass in einer Sphäre das Pharmakon gleichmäßig in der Carriermatrix verteilt ist und die Kapsel ein vesikuläres System darstellt, in dem der Carrier das Pharmakon umschließt (Singh and Lillard, 2009, Zhang and Uludag, 2009). In der Literatur wird dieser Nomenklatur jedoch nicht immer gefolgt und die Begriffe werden oft synonym verwendet.

Die Freisetzung des Pharmakons wird je nach Architektur der Partikel und der resultierenden Bindung wie oben beschrieben durch Diffusion, affinitätsbasierte Interaktionen, enzymatische Spaltung oder Abbau des Carriers beeinflusst (Amass et al., 1998, Singh and Lillard, 2009, Lee et al., 2016). Es ist auch eine induzierte Freisetzung durch externe Stimuli wie beispielsweise Temperatur oder pH-Wert möglich (Hu et al., 2012, Santo et al., 2012, Monteiro et al., 2015).

Mikro- und Nanopartikel werden durch ihren Durchmesser definiert und zeigen unterschiedliche Eigenschaften, die von diesem abhängen (Singh and Lillard, 2009).

Nanopartikel besitzen einen Durchmesser zwischen 1 und 1000 nm, größere Partikel werden den Mikropartikeln zugeordnet (Arshady, 1990, Santo et al., 2012). Mikropartikel sind folglich ähnlich groß wie einzelne Zellen und können sich gut im Gewebe verteilen (Chu and Wang, 2012), Nanopartikel hingegen werden durch Phago- oder Endozytose von Zellen aufgenommen sowie in Kapillaren und durch Epithelien transportiert (Singh and Lillard, 2009, Monteiro et al., 2015). Sie verfügen aufgrund ihres größeren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses über eine höhere Reaktivität (Santo et al., 2012, Monteiro et al., 2015). Der Durchmesser bestimmt auch die Halbwertszeit im Blutkreislauf, Partikel größer als 200 nm werden schnell durch das retikuloendotheliale System aufgenommen und Partikel kleiner als 5,5 nm leichter in der Niere filtriert (Zhang and Uludag, 2009, Loureiro et al., 2016). Die Oberflächenladung der Nanopartikel, das Zeta-Potential, wirkt sich ebenfalls auf das Verhalten *in vivo* aus und kann beispielsweise zu einer Aggregation führen. Optimal sind ungefähr neutral geladene Partikel mit einem Zeta-Potential zwischen 10 mV und -10mV. (Loureiro et al., 2016)

Die Oberfläche von Nanopartikeln kann mit einer Schutzschicht wie PEG verändert werden, um die Zirkulationszeit im Blutkreislauf zu erhöhen und unspezifische Interaktionen zu reduzieren (Schoonen and van Hest, 2014, Wurm and Weiss, 2014, Loureiro et al., 2016).

Nanopartikel können auch zum „Targeting“ verwendet werden, der selektiven Therapie bestimmter Gewebe oder Zellen. Die Oberfläche der Partikel wird mit Liganden modifiziert, die einen spezifischen Transport zum Zielort ermöglichen. Dies wird unter anderem in der Tumorthherapie oder zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke eingesetzt (Singh and Lillard, 2009, Zhang and Uludag, 2009, Santo et al., 2012, Schoonen and van Hest, 2014, Monteiro et al., 2015, Lee et al., 2016).

Zur Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln existieren verschiedene Verfahren, am häufigsten werden die Emulsions- und die Koazervationstechnik, auch Desolvationstechnik genannt, genutzt (Arshady, 1990, Weber et al., 2000, Landfester, 2009, Landfester et al., 2010, Elzoghby et al., 2012, Liu et al., 2015, Karimi et al., 2016, Lee and Youn, 2016, Loureiro et al., 2016, Bhushan et al., 2017).

Als Materialien steht eine Vielzahl von sowohl synthetischen als auch natürlichen Polymeren zur Verfügung (Zhao et al., 2003, Nair and Laurencin, 2006, Ulery et al., 2011, Wurm and Weiss, 2014, Song et al., 2018). Wie bereits beschrieben sind bei der Wahl eines DDS die Toxizität des Carriers und seiner Abbauprodukte zu

berücksichtigen (Langer, 1998, Allen and Cullis, 2004). Das Material muss mechanisch geeignet sowie biokompatibel sein und sollte möglichst vollständig im Gewebe abgebaut werden (Nair and Laurencin, 2006, Liu et al., 2008, Wurm and Weiss, 2014). Als synthetische Substanzen werden vor allem die aliphatischen Polyester PLA (Polylactid), PGA (Polyglycolsäure), PLG (Polylactid-co-Glycolid, auch als PLGA bezeichnet) und PCL (Polycaprolacton) verwendet (Amass et al., 1998, Sinha et al., 2004, Holland and Mikos, 2006). Da deren saure Abbauprodukte jedoch ein azidotisches Milieu erzeugen, können die biologische Aktivität der transportierten Pharmaka sowie das Zellwachstum im Gewebe beeinträchtigt werden (Kim and Burgess, 2002, Zhang and Uludag, 2009, Luckachan and Pillai, 2011, Wurm and Weiss, 2014).

Unter den natürlichen Polymeren für die Mikro- und Nanopartikelsynthese sind Polysaccharide wie Stärke, Alginat und Chitosan sowie Proteine wie Gelatine und Albumin in Gebrauch (Liu et al., 2008, Ulery et al., 2011, Schoonen and van Hest, 2014, Wurm and Weiss, 2014, Song et al., 2018).

4.8 Albumin

Albumin ist das Protein mit der höchsten Konzentration im Plasma. Sein Molekulargewicht beträgt 66,5 kDa und seine Halbwertszeit im Blutkreislauf 19 Tage. Albumin zeigt bei einem pH-Wert zwischen 4 und 9 eine stabile Struktur, kann bis zu 10 Stunden Temperaturen von 60 Grad tolerieren und ist robust gegenüber organischen Lösungsmitteln. Es dient im Blut zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und fungiert als Transportprotein unter anderem für langkettige Fettsäuren, Bilirubin, Calcium, Kupfer und Arzneistoffe wie Penicillin. Der Abbau von Albumin findet durch intrazelluläre Aufnahme und Zersetzung in Lysosomen in die einzelnen Aminosäuren statt, die zur Energiegewinnung genutzt werden. (Peters, 1985, Kratz, 2008)

Albumin wird vermehrt von entzündetem Gewebe und von Tumoren aufgenommen (Kratz, 2008, Loureiro et al., 2016). Außerdem verfügt Albumin über viele Bindungsmöglichkeiten in Form von reaktiven Amino-, Carboxyl- und Thiolgruppen sowie einen hohen Anteil geladener Aminosäuren (Peters, 1985, Fasano et al., 2005, Liu et al., 2015, Loureiro et al., 2016).

Aufgrund der genannten Eigenschaften wird Albumin als DDS zur nichtkovalenten und kovalenten Bindung von Substanzen, als Mikro- und Nanopartikel, als Fusionsprotein und zum Targeting verwendet (Reddy et al., 1990, Dennis et al., 2002, Kratz, 2008,

Elsadek and Kratz, 2012, Elzoghby et al., 2012, Liu et al., 2015, Lee and Youn, 2016, Loureiro et al., 2016, Bhushan et al., 2017, Zhang et al., 2018). Auch eine Kombination mit synthetischen Polymeren ist möglich (Lin et al., 1997, Jiang and Stenzel, 2016).

Albumin-basierte DDS sind in der Therapie des Diabetes mellitus als Insulin detemir und Insulin degludec (Home and Kurtzhals, 2006, Heise and Mathieu, 2017) und als GLP-1-Rezeptor-Agonisten Albiglutid (Trujillo and Nuffer, 2014, Trietley and Skef, 2017), Liraglutid und Semiglutid (Knudsen and Lau, 2019) zugelassen. In der Hämophilie B kommt das Fusionsprotein Albutrepenonacog Alfa zum Einsatz (Lyseng-Williamson, 2017) und auch in der Szintigraphie werden DDS aus Albumin verwendet (Wang et al., 2007, Gommans et al., 2009, Yang et al., 2012, Gandhi et al., 2013). Das bekannteste DDS aus Albumin stellt vermutlich Nab-Paclitaxel (nanoparticle albumin bound paclitaxel) dar, das Nanopartikel als Carrier für Paclitaxel nutzt und so eine höhere Akkumulation im Tumorgewebe sowie eine verringerte Toxizität erzielen kann (Desai et al., 2006, Gradishar, 2006, Hawkins et al., 2008, Desai et al., 2009, Yardley, 2013). Mittlerweile ist Nab-Paclitaxel (Abraxane®) in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms, des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und des metastasierten Pankreaskarzinoms zugelassen (Kundranda and Niu, 2015).

Zusätzlich zu den bereits bestehenden klinischen Anwendungen wird in vielen weiteren Bereichen an der Entwicklung neuer DDS mit Albumin geforscht. In der medikamentösen Tumorthherapie werden Zytostatika wie 5-Fluoruracil (Santhi et al., 2002), Gemcitabin (Li et al., 2009), Cabazitaxel (Zhou et al., 2016) und Doxorubicin (Cranmer, 2019), aber auch Trastuzumab (Wartlick et al., 2004a, Steinhauser et al., 2006) und Tamoxifen (Martínez et al., 2011) mit Albumin kombiniert.

Einen hohen Stellenwert in der Tumorthherapie mit Albumin-Nanopartikeln nimmt das aktive Targeting per Oberflächenmodifikation der Partikel mit Liganden ein (Bae et al., 2012, Chen et al., 2015a, Yhee et al., 2015, Karimi et al., 2016). Insbesondere die Bindung von Folsäure als Oberflächenmerkmal konnte Erfolge erzielen (Zhao et al., 2010, Shen et al., 2011) und wird auch mit magnetischen Nanopartikeln kombiniert (Tang et al., 2011, Li et al., 2015a, Li et al., 2015b).

Neben der Tumorthherapie wird Albumin eingesetzt, um die Halbwertszeit von Methotrexat zu verlängern und dessen Aufnahme in entzündetem Gewebe zu steigern (Stehle et al., 1997, Santhi et al., 2000, Wunder et al., 2003, Fiehn et al., 2004). Außerdem kann es Nukleinbasen und -säuren (Arnedo et al., 2002, Arnedo et al.,

2004, Wartlick et al., 2004b, Gayakwad et al., 2009, Okoroukwu et al., 2010, Son et al., 2013) oder Arzneistoffe auf deren Basis (Merodio et al., 2001, Merodio et al., 2002, Irache et al., 2005) vor enzymatischem Abbau schützen.

Schließlich werden DDS aus Albumin noch im Transport über die Blut-Hirn-Schranke (Dadparvar et al., 2011), im Design von Impfstoffen (Liu et al., 2014) und in der Theranostik, der nuklearmedizinischen Verbindung aus Therapie und Diagnostik, untersucht (Chen et al., 2015b, Khandelia et al., 2015, An and Zhang, 2017).

Drug Delivery Systeme auf Albuminbasis und insbesondere Albumin-Nanopartikel sind folglich bereits im medizinischen Einsatz und bieten einen vielversprechenden Ansatz in diversen Forschungsbereichen.

4.9 Albumin-Nanopartikel als DDS für PPE

Da im Tissue Engineering eine kontrollierte Freisetzung bioaktiver Substanzen benötigt wird und DDS aus Albumin erfolgreich angewandt werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit Albumin-Nanopartikel als DDS zur Oberflächenmodifikation von PPE *in vivo* eingesetzt.

Die Synthese der Nanopartikel aus murinem Serumalbumin (MSA) erfolgte nach Piradashvili et al., die über eine inverse Miniemulsionstechnik empfindliche bioaktive Moleküle verkapseln konnten. Es wurde eine Beladungseffizienz von 91 %, eine durchschnittliche Größe von 300 nm und ein Zeta-Potential von ca. -30 mV gemessen. Bei den *in vitro* Analysen wiesen die Partikel keine Zytotoxizität, keine Aggregation im Blutplasma und keine Leckage der enkapsulierten Substanz auf. Sie konnten von dendritischen Zellen aufgenommen und durch Trypsin enzymatisch abgebaut werden. (Piradashvili et al., 2017, Piradashvili, 2018)

Zur Untersuchung der pharmakokinetischen Effekte der MSA-Nanopartikel *in vivo* wurde als niedrigmolekulare Substanz der Fluorophor Sulforhodamin 101 (606,71 Dalton, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 2019)) und als hochmolekulare Substanz das Immunsuppressivum Etanercept (ca. 150 kDa, (Pfizer Pharma GmbH, 2019)), das im Voraus mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde, in den Partikeln enkapsuliert (s. Abb. 4).

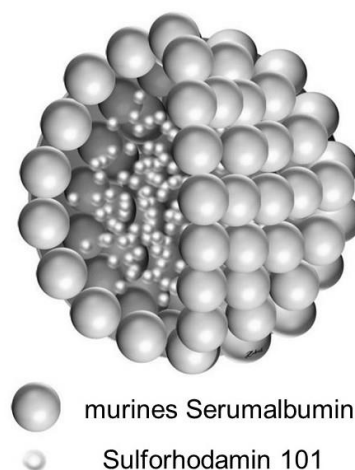


Abb. 4: MSA-Nanopartikel*

*alle entsprechend markierten Abb. wurden freundlicherweise von [REDACTED] bereitgestellt

Etanercept ist ein antiinflammatorisch wirkendes Fusionsprotein aus dem Rezeptor des Tumornekrosefaktors (TNF) und der F_C-Untereinheit des Immunglobulins IgG1 (s. Abb. 5) und wird zur Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt (Zalevsky et al., 2007, Tracey et al., 2008, Meroni and Valesini, 2014). Es wurde bereits als Beschichtung für PPE eingesetzt und konnte die inflammatorische Reaktion im Gewebe reduzieren (Ditz, 2018).

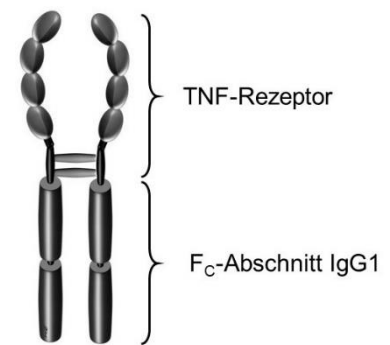


Abb. 5: Etanerceptstruktur*

Als Tiermodell wurde die transparente Rückenhautkammer der Maus gewählt.

4.10 Die transparente Rückenhautkammer

Die erste Version einer transparenten Rückenhautkammer bei Mäusen wurde bereits im Jahr 1943 von Algire beschrieben (Algire, 1943).

Eine modifizierte Variante dieses Modells, das eine geschlossene Kammer nutzt, wurde im Jahre 1970 von Cardon et al. an der Maus etabliert (Cardon et al., 1970). 1979 wurde die Technik auch von Papenfuss et al. an Ratten (Papenfuss et al., 1979) und 1980 von Endrich et al. an Goldhamstern (Endrich et al., 1980) eingesetzt. Die transparente Rückenhautkammer wird zur nichtinvasiven, longitudinalen *in vivo* Beurteilung hämodynamischer, immunologischer und angiogenetischer Vorgänge am nicht anästhesierten Lebewesen über einen Zeitraum von bis zu mehreren Wochen verwendet (Lehr et al., 1993). Sie kann beispielsweise zur Analyse der Mikrozirkulation bei Tumoren (Asaishi et al., 1981) oder auch zum Studium von Wundheilung (Machado and Mitchell, 2011) oder Thrombosen (Boulaftali et al., 2012) benutzt werden.

Durch die Möglichkeit der wiederholten Messungen der Vaskularisation und der Immunantwort bei Biomaterialien stellt sie daher auch ein hervorragendes Modell zur Evaluation von Strategien des Tissue Engineerings dar (Druecke et al., 2004, Laschke et al., 2005, Laschke et al., 2006, Rucker et al., 2006, Laschke et al., 2009, Staton et al., 2009, Ehrmantraut et al., 2010, Laschke et al., 2011).

5. Material und Methoden

Sämtliche aufgeführten Experimente wurden mit Genehmigung des zuständigen Landesuntersuchungsamts im Forschungslabor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin Mainz von März 2016 bis April 2017 durchgeführt.

Das Studienprotokoll basierte auf dem 3R-Prinzip (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2020) und wurde vor Beginn der Versuche durch eine unabhängige Kommission begutachtet und genehmigt. Die Arbeit mit den Versuchstieren erfolgte nach dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ des National Research Council (USA) (National Research Council (US), 2011).

Sämtliche Versuche folgten außerdem den „Principles of Good Laboratory Practice“ der OECD (Organization for Economic Cooperation and Development, 2020).

Alle Tierexperimente fanden unter Supervision durch den Versuchsleiter oder den stellvertretenden Versuchsleiter statt.

5.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Experimente wurden männliche C57BL/6J Mäuse (Janvier Labs, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) mit einem Alter von mindestens sechs Wochen und einem Minimalgewicht von 25 g verwendet.

Haltung und Pflege der Tiere erfolgten in den Räumen des Translational Animal Research Centers (TARC) der Universitätsmedizin Mainz. Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere in Gruppen von je fünf Mäusen pro Käfig gehalten. Den Mäusen wurde freier Zugang zu Wasser und speziellem Futter (ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) gewährt und ein fester Tag-Nacht-Rhythmus sowie eine konstante Raumtemperatur von 21°C wurden eingehalten. Für die Implantation der Rückenhautkammer sowie die intravitale Mikroskopie wurden die Tiere temporär in das Labor der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde überführt.

Nach Implantation der transparenten Rückenhautkammer wurden die Mäuse isoliert und unter den oben beschriebenen Haltungsbedingungen fortan in Einzelkäfigen versorgt, um Verletzung der Tiere durch intraspezifische Aggressionen zu verhindern und die Kontaminationsgefahr zu reduzieren. Es erfolgte eine tägliche Gewichtsmessung, eine Überprüfung des Allgemeinzustandes der Tiere sowie eine Kontrolle der Rückenhautkammer und des umliegenden Gewebes.

Unmittelbar nach Anlage der Rückenhautkammer wurde eine Einmaldosis 3 µg/g Körpergewicht Flunixin-Meglumin (Finadyne RPS 83 mg/ml, MSD Animal Health Innovation GmbH, Schwabenheim an der Selz, Deutschland) s.c. appliziert. Weiterhin wurde zur postoperativen Analgesie über den weiteren Versuchszeitraum dem Trinkwasser 0,1 mg/ml Tramadol (Tramadol-ratiopharm 100 mg/ml, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) hinzugefügt. Außerdem wurde den Tieren für fünf Tage postoperativ täglich 2 µg/g Körpergewicht Marbofloxacin (Marbocyl 2 %, Vetoquinol GmbH, Ismaning, Deutschland) s.c. verabreicht.

Als Ausschlusskriterien wurden ein Gewichtsverlust von mehr als 20 Prozent im Vergleich zum postoperativen Körpergewicht, Entzündungszeichen oder Verhaltensänderungen, die auf Schmerz oder Krankheit hindeuten, festgelegt. Zu letzteren zählten Änderungen des normalen Fress- und Putzverhaltens oder des Schlaf- und Wachrhythmus.

Auch eine Ablösung der Haut oder eine Blutung im Kammerfenster sowie eine fehlende Vaskularisation, resultierend in eingetrockneten Arealen der Kammer, führten zum Ausschluss der jeweiligen Maus aus dem Versuch.

Am Versuchsende oder bei Ausschluss aus dem Versuch wurden die Mäuse mit einer intraperitoneal injizierten Überdosis von >0,2 mg/g Ketamin (Ketanest, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) und >0,02 mg/g Xylazin (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert und dann zervikal disloziert.

5.2 MSA-Nanopartikel

Nanopartikel aus murinem Seroalbumin (MSA, Albumin from mouse serum, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurden erfolgreich durch eine inverse Miniemulsionstechnik wie von Piradashvili et al. vorbeschrieben synthetisiert (s. Abb. 6; Synthese der Nanopartikel durchgeführt von [REDACTED] und [REDACTED] [REDACTED] aus dem Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPIP) Mainz):

Vor der Nanopartikelsynthese wurde MSA über eine Steglich-Veresterung mit TET (4-(2-phenyl-2H-tetrazol-5-yl)Benzoessäure), einem Signalmolekül zur bioorthogonalen Markierung, modifiziert. Das modifizierte MSA wurde zusammen mit SR 101 in der hydrophilen Phase mit der lipophilen Phase aus Cyclohexan und dem Surfactant P((E/B)-b-EO) vermischt (a). Dann wurde durch Ultraschall eine inverse (Wasser-in-Öl) Miniemulsion erzeugt (b). Der Crosslinker Dinorbornen wurde hinzugefügt und die Miniemulsion zur Vernetzung der MSA-Moleküle mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt (c). Schließlich wurde die Nanopartikelsuspension durch Zentrifugation aufgereinigt und

überschüssiger Surfactant und Crosslinker entfernt (d). (Kersten, 2016, Piradashvili et al., 2017, Piradashvili, 2018)

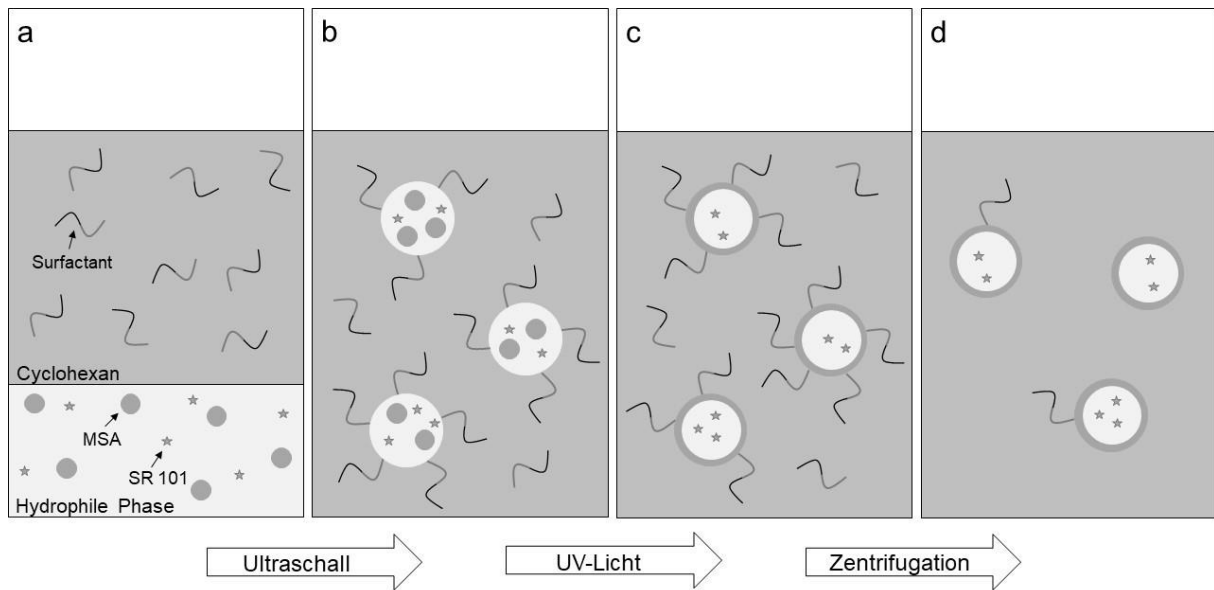


Abb. 6: Synthese der MSA-Nanopartikel
adaptiert aus: (Piradashvili et al., 2015)

Die Nanopartikelsynthese für Etanercept erfolgte analog nach der beschriebenen Technik mit 100 µl einer Lösung aus Etanercept (Enbrel®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 594 (Alexa Fluor™ 594 NHS-Ester (Succinimidylester), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Die Konjugation von Etanercept mit Alexa Fluor® 594 erfolgte nach Angaben des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, 2013) über eine NHS-Ester-Markierung (Konjugation durchgeführt von [REDACTED] und [REDACTED] aus dem MPIP Mainz).

5.3 PPE

Die PPE-Implantate (MEDPOR, Stryker Craniomaxillofacial, Portage, Michigan, USA) mit einer Porengröße von 100 – 200 µm wurden vor Beginn der Experimente bei 121°C und 2,05 Bar für 20 min dampfsterilisiert (Tuttnauer systec 5050 ELVD, Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande). Nach der Sterilisation wiesen die Implantate keine Strukturveränderungen auf und stichprobenartige Kontrollen zeigten keine Kontamination mit Endotoxinen (QCL-1000™ Endpoint Chromogenic LAL Assay, Lonza Group, Basel, Schweiz).

Die PPE-Implantate wurden per Dip-Coating mit unterschiedlichen Lösungen je nach Versuchsgruppe beschichtet (s. Abb. 7).

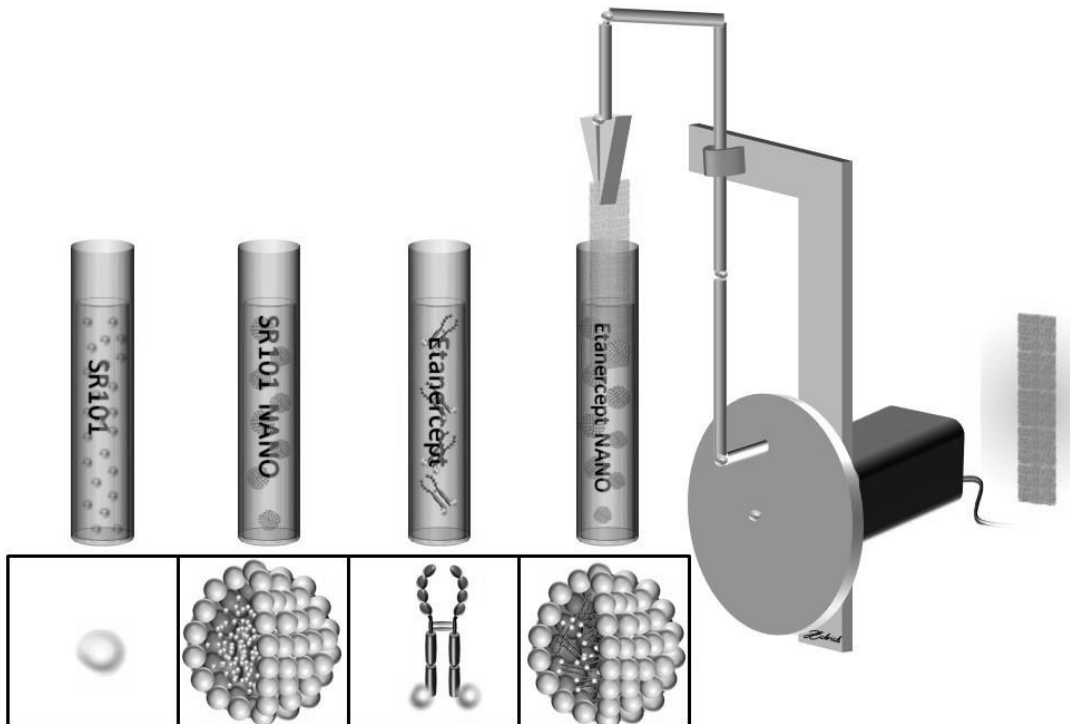


Abb. 7: PPE-Beschichtung per Dip-Coating*

Für die Beschichtung mit SR 101 MSA-Nanopartikeln oder Etanercept MSA-Nanopartikeln wurde eine Dispersion aus den aufgereinigten Nanopartikeln mit einem Massenanteil von 0,75 % in Cyclohexan verwendet. Die PPE-Implantate der Kontrollgruppen wurden entweder mit Sulforhodamin 101 in einer wässrigen Lösung (0,03 mg/ml) oder mit der beschriebenen Lösung des Etanercept-Konjugats beschichtet (Beschichtung des PPE mit SR 101 und SR 101 Nano durchgeführt von [REDACTED] aus dem MPIP Mainz). Das PPE wurde beim Dip-Coating zehnmal mit einer Geschwindigkeit von 4 cm/min in den Behälter mit der Lösung herabgelassen. Zwischen den einzelnen Beschichtungsvorgängen wurde jeweils eine zeitliche Pause von 1:08 Minuten eingehalten, um die Miniemulsion trocknen zu lassen. Danach wurde das PPE-Implantat um 180 Grad gedreht und der Vorgang analog wiederholt. Bei den wässrigen Lösungen wurden längere Pausen zum Trocknen eingehalten. (Kersten, 2016)

Die erfolgreiche Beschichtung wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE-2000-U, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) überprüft. Anschließend wurde das PPE unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell in kleinere Teilstücke mit einer Größe von ca. 3 mm x 3mm x 0,25 mm zugeschnitten.

5.4 Präparation der Rückenhautkammer

Das im Folgenden beschriebene Prozedere richtete sich nach unserem laborinternen Leitfaden (Eckrich et al., 2015), der sich wiederum weitestgehend an der Methodik nach Laschke et al. orientierte (Laschke et al., 2011).

Die Rückenhautkammer (s. Abb.8) bestand aus zwei Titanplatten mit einem runden Fenster ($d=11,2$ mm), die spiegelbildlich einander entsprachen. In den Platten waren drei Bohrungen für Schrauben sowie mehrere kleinere Bohrungen angebracht, die zur Fixierung der Kammer an der Rückenhaut per Einzelknopfnähten dienten.

In das Fenster wurde ein Deckglas mit einem Durchmesser von 11,2 mm bis 12 mm und einer Dicke von 1 mm eingesetzt, das über einen Sprengring fixiert wurde. Zur Befestigung der Titanplatten

aneinander wurden drei Schrauben ($d=1,8$ mm) mit entsprechenden Muttern und Unterlegscheiben verwendet. Die zusätzliche Mutter mit Unterlegscheibe an der Spitze der Kammer verhinderte eine zu starke Kompression des Gewebes in der Kammer.

Vor Beginn der Chirurgie wurden die Tiere über eine intraperitoneal applizierte Anästhesie aus 0,1 mg/g Ketamin (Ketanest, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) und 0,01 mg/g Xylazin (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) betäubt und für die weitere Operation auf einen beheizten Kleintier-OP-Tisch (MEDAX, GmbH & Co.KG, 24537 Neumünster, Deutschland) gelegt.

Zur Überprüfung einer suffizienten Anästhesie wurde unmittelbar vor Beginn der OP der Ausfall von Stell-, Lid- und Zwischenzehenreflex verifiziert. Die Überprüfung der Reflexe wurde auch während der Operation regelmäßig wiederholt, um eine dauerhaft ausreichende Narkosetiefe sicherzustellen. Bei Bedarf wurde Ketamin nachdosiert. Im weiteren Verlauf wurde aufgrund des Ausfalls des Lidreflexes Augensalbe (Bepanthen, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) auf die Cornea appliziert, um diese vor dem Austrocknen zu schützen.

Im Anschluss wurden das Rückenfell der Maus mit einem Rasierer (Remington

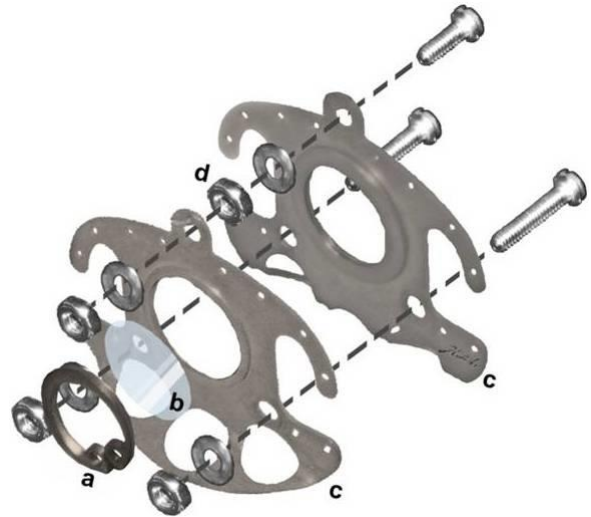


Abb. 8: Aufbau der Rückenhautkammer
 a) Sprengring, b) Deckglas
 c) Titankammern, d) Muttern mit Unterlegscheiben*

Contour HD, Spectrum Brands, Middleton, Wisconsin, USA) auf ca. 1 mm Länge gekürzt und dann die verbliebenen Haare mit Enthaarungscreme (Veet, Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland) entfernt. Nach Entfernung der Haar- und Cremerückstände mit einer warmen Kompresse wurde die nun blanke Rückenhaut im OP-Gebiet mit Desinfektionsmittel (Kodan Tinktur forte farblos, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) gereinigt.

Nach Einwirken des Desinfektionsmittels wurde die Rückenhaut des Tieres mithilfe einer gegenüberliegenden Lampe durchleuchtet und nach einem passenden Gefäßstrang in der hinteren Hautschicht gesucht. Die hintere Kammerhälfte wurde sodann dem Gefäßplexus passend angehalten und kranial sowie kaudal dieses Bereiches wurden zwei Haltefäden (Ethibond Excel 4-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) in der Haut platziert, um diese für die weitere Prozedur aufzuspannen (s. Abb. 9).

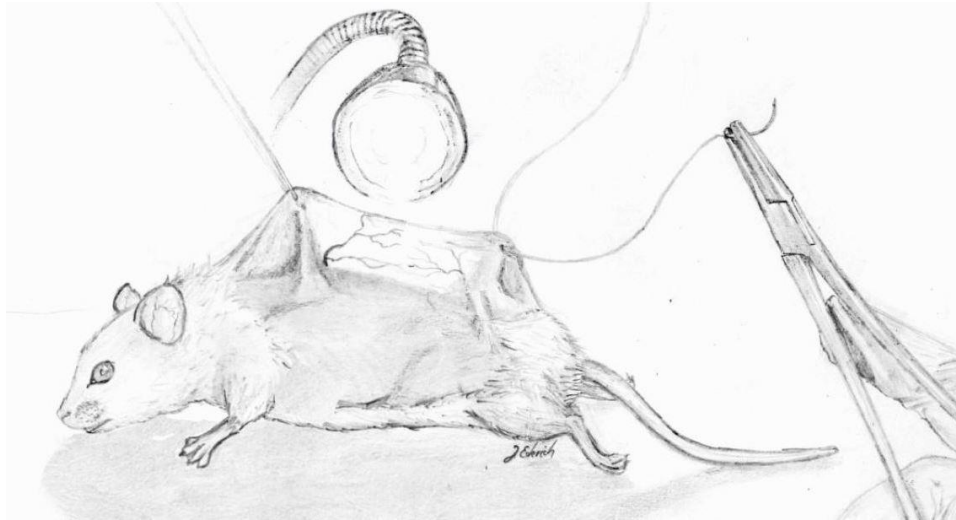


Abb. 9: Anbringen der Haltefäden nach Identifizierung des zu präparierenden Gefäßstranges*

Die hintere Titanplatte wurde nun mit zwei U-Nähten (Ethibond Excel 4-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) oben an der Hautfalte angenäht. Mithilfe einer Strausskanüle (d=1,8 mm; Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland) wurde der Kanal für die Schrauben gestochen und diese wurden durch das Gewebe zum Operateur geführt. Die beiden äußeren Bohrungen auf jeder Seite der Kammer wurden danach mit den mittlerweile obsoleten Haltefäden ebenfalls per U-Naht an der Hautfalte fixiert.

Im Gegenlicht erfolgte eine Markierung des zukünftigen Kammerfensters mit einem hautverträglichen Filzstift (Securline Skin Marker, Aspen Surgical Products, Caledonia, Michigan, USA).

Unter dem Operationsmikroskop (ZEISS OPMI 1 FC, Carl Zeiss Meditec AG,

Oberkochen, Deutschland) wurden Cutis, Subcutis, Panniculus carnosus sowie der Musculus retractor costae entfernt, sodass der gegenüberliegende Panniculus carnosus und die zugehörigen Gefäße freilagen. Um ein Austrocknen des empfindlichen Gewebes zu verhindern, wurde das entsprechende Gebiet während der Präparation mit 0,9 % Natriumchloridlösung (NaCl 0,9%, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland) beträufelt.

Zum Abschluss wurde die zweite Titanplatte mit einliegendem und fixiertem Deckglas (d=11,8mm; Hecht Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland) und Sprengring über die beiden Schrauben an der anderen Hälfte fixiert. Das Kammerfenster gewährte nun einen direkten Blick auf den Gefäßplexus (s. Abb. 10).

Zum Schutz der Haut vor Läsionen wurden die unteren Kanten der Titanplatten mit Fixierpflaster (Leukosilk, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) gepolstert.



Abb. 10: Transparente Rückenhautkammer nach Abschluss der Präparation*

Zwei Tage nach der Operation wurde das PPE-Implantat in die Rückenhautkammer eingebracht.

Hierzu wurde die Maus in eine Plexiglasröhre mit einer Öffnung zur Frischluftzufuhr gesetzt und der Sprengring sowie das Deckglas entfernt. Das Gewebe im Kammerfenster wurde erneut mit 0,9 % Natriumchloridlösung (NaCl 0,9%, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland) angefeuchtet, das PPE-Implantat unter lichtmikroskopischer Kontrolle (ZEISS OPMI 1 FC, Carl Zeiss Meditec AG, Oberkochen, Deutschland) auf dem Panniculus carnosus über dem Gefäßplexus platziert und die Kammer wieder verschlossen.

Beide Seiten des Kammerfensters wurden mit einem Stück schwarzen Pappkartons abgeklebt, auf dem zur Außenseite hin noch ein Stück Aluminiumfolie befestigt wurde,

um den Lichteinfluss auf die Rückenhautkammer und das PPE zu minimieren. Im weiteren Verlauf des Versuches wurde die Rückenhautkammer täglich mit einem Intravitalmikroskop (Olympus BXFM, Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland) beobachtet.

5.5 Intravitalmikroskopie

Zur intravitalem Mikroskopie wurden die Tiere in oben erwähnter Plexiglasröhre immobilisiert, auf einer Plexiglasplatte fixiert und auf einem x-y-Präzisionstisch (MT mot Messtisch mit Tango Desktop Steuereinheit und ERGODRIVE Bedienelement, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, Deutschland) über der Lichtquelle (X-Cite exacte, Excelitas Technologies GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) platziert (s. Abb. 11).

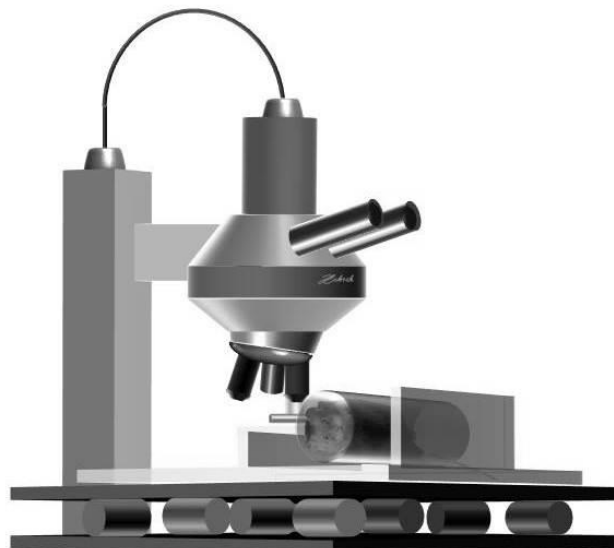


Abb. 11: Intravitalmikroskopie*

Es wurde eine Gesamtaufnahme (Multi-Image-Array/MIA) der Rückenhautkammer in 50-facher Vergrößerung mit der Mikroskopkamera (Olympus XM-10, Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland) unter Verwendung eines Cy3-Filters (Emissionswellenlänge 565 nm) angefertigt.

In jedem MIA wurden mit cellSens Dimension (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland) insgesamt neun ROIs (Regions of Interest) festgelegt. Die ROI 1 beschreibt durch ein manuell angelegtes Polygon den Fotobereich des PPE-Implantates und misst daher ca. 9 mm². Die restlichen ROIs wurden als Quadrate mit einer Fläche von 1 mm² angelegt. Die ROIs 2 bis 5 wurden im Gewebe unmittelbar um das PPE herum platziert und die ROIs 6 bis 9 in weiter entfernten Bereichen der Rückenhautkammer mit einem minimalen Abstand zum PPE von 200 µm.

Die Koordinaten der einzelnen ROIs wurden für jedes Tier durch cellSens Dimension bei der ersten Aufnahme gespeichert, sodass über den Messzeitraum die gleichen Areale der Kammer analysiert wurden.

Die Fluoreszenzintensität in den ROIs wurde in Form von „arbitrary units“ (AU), einer relativen Maßeinheit zur Darstellung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität, auf einer Skala von 0 bis 4095 erfasst (s. Abb. 12).

Der von cellSens Dimension angegebene Wert für eine ROI entspricht dabei immer dem Mittelwert der Fluoreszenzintensität in dem definierten Areal.

Sämtliche mit dem Mikroskop gemachten Aufnahmen wurden als Rohdateien im VSI Format inklusive aller Metadaten gespeichert.

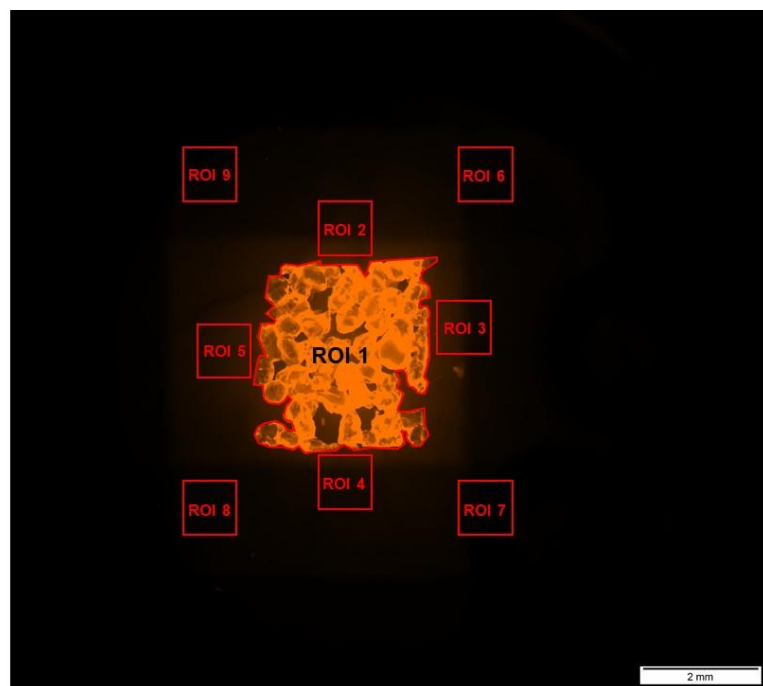


Abb. 12: Anordnung der ROIs und Messung der Fluoreszenzintensität (AU) in der Rückenhautkammer

5.6 Versuchsgruppen und Versuchsprotokoll

Die Versuchstiere wurden in insgesamt vier Gruppen, abhängig von der Beschichtung des PPE, unterteilt:

- 1) PPE-Implantate beschichtet mit SR 101 („SR nativ“)
- 2) PPE-Implantate beschichtet mit SR 101 MSA-Nanopartikeln („SR nano“)
- 3) PPE-Implantate beschichtet mit Etanercept („Etanercept nativ“)
- 4) PPE-Implantate beschichtet mit Etanercept MSA-Nanopartikeln („Etanercept nano“)

In der Gruppe „SR nativ“ waren am Ende der Versuchsreihe die Rückenhautkammern von neun Mäusen auswertbar, in den anderen drei Gruppen gingen jeweils acht Tiere in die Auswertung ein.

Der Messzeitraum mit dem Intravitalmikroskop erstreckte sich über insgesamt zehn Tage (s. Abb. 13). Zwei Tage nach der operativen Anlage der transparenten Rückenhautkammer wurde das PPE in die Kammer implantiert.

Ab dem Zeitpunkt der Kammerpräparation wurde jeden Tag der Allgemeinzustand sowie das Fress-, Putz- und Schlafverhalten der Tiere und das Kammerfenster überprüft. Eventuelle Auffälligkeiten sowie das Körpergewicht wurden täglich dokumentiert.

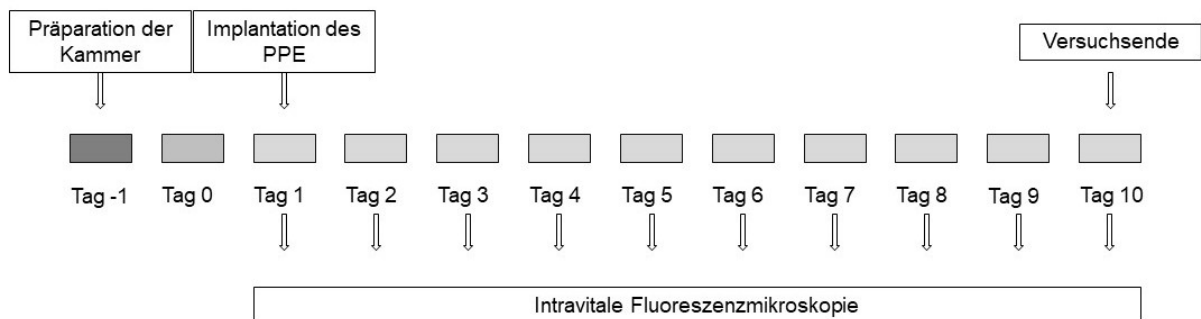


Abb. 13: Schema zum Versuchsablauf

In laborinternen Vorversuchen zeigte sich, dass eine Belichtungszeit von 50 ms bei dem gewählten Cy3-Filter und Sulforhodamin 101 für eine bestmögliche Aufnahme sorgt. Längere Belichtungszeiten führten vor allem in den ersten Tagen der Messreihe zu überbelichteten und dadurch schwer auswertbaren Bildern. Kürzere Belichtungszeiten hingegen verursachten insbesondere in der zweiten Messhälfte schwach belichtete Fotos und eine dadurch schwer zu quantifizierende Fluoreszenzintensität, weil diese sich kaum noch von der Fluoreszenzintensität der Kammer (Hintergrundfluoreszenz) abhoben.

Vor PPE-Implantation wurde für jede Maus bei einer Belichtungszeit von 50 ms eine Übersichtsaufnahme der Rückenhautkammer gemacht, um die Fluoreszenzintensität der Kammer zu quantifizieren.

Nach Implantation des PPE wurde über den Messzeitraum von zehn Tagen täglich bei jeder Maus sowohl ein MIA mit 50 ms Belichtungszeit als auch ein MIA mit 10 ms Belichtungszeit zum Vergleich angefertigt, wobei die erste Aufnahme unmittelbar nachdem das PPE in der Kammer platziert wurde entstand.

Da interne Vorversuche außerdem einen raschen Abfall der Fluoreszenzintensität bei Gruppe 1 vermuten ließen, wurden sowohl bei Gruppe 1 („SR nativ“) als auch bei Gruppe 2 („SR nano“) fünf Aufnahmen innerhalb der ersten Stunde nach Implantation des Kunststoffes in die Kammer durchgeführt. Diese MIAs entstanden dementsprechend direkt nach Positionierung des PPE in der Rückenhautkammer und dann im Abstand von 15 Minuten bei einer Belichtungszeit von 50 ms.

5.7 Statistik

Zur Erfassung der erhobenen Daten wurde *Microsoft®Excel®* aus *Microsoft® Office 365 ProPlus* eingesetzt.

Für die im Folgenden beschriebene statistische Analyse wurde *R 3.4.2* durch Nutzung von *lmerTest* und *ggplot2* verwendet (Berechnungen durchgeführt von [REDACTED] aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) Mainz).

Für die statistische Analyse der Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde ein lineares gemischtes Modell angewandt.

Als feste Effekte wurden die Versuchsgruppe, die Zeit seit Versuchsbeginn und die Interaktion zwischen Versuchsgruppe und Zeit festgelegt. Da die Versuchsgruppe wie beschrieben durch die Art der Oberflächenbeschichtung des PPE bestimmt wird, können so Unterschiede des Einflusses der Beschichtung auf die Fluoreszenzintensität quantifiziert und miteinander verglichen werden.

Da wiederholte Messungen des gleichen Subjekts über einen zeitlichen Verlauf, in diesem Fall die Fluoreszenzintensität jeder Maus über 10 Tage, häufig stark korrelieren, muss diese Korrelation auch statistisch berücksichtigt werden.

In dem gemischten Modell werden daher zusätzlich zu den festen Effekten zufällige Effekte eingesetzt. Für die subjektabhängigen Effekte (die Korrelation jeder Maus mit sich selbst) wird ein zufälliger y-Achsenabschnitt hinzugefügt. Für jede Regressionskonstante wird weiterhin ein entsprechender zufälliger Steigungskoeffizient berechnet, der die zeitabhängigen Effekte (die Korrelation der Tage untereinander pro Maus) ausdrückt.

Die Fluoreszenzintensität wurde separat für die ROI 1, die ROIs 2 bis 5 und die ROIs 6 bis 9 entsprechend den unterschiedlichen Abständen der ROIs vom Implantat innerhalb der Rückenhautkammer analysiert. Bei den ROIs 2 bis 5 und den ROIs 6 bis 9 wurde vor der weiteren Analyse für jede Aufnahme jeweils ein Mittelwert aus den

vier gemessenen Fluoreszenzintensitäten gebildet. Diese Mittelwerte wurden in der weiteren Arbeit als „ROI 2-5“ und „ROI 6-9“ bezeichnet.

Zum Ausgleich von unterschiedlichen Konzentrationen der fluoreszierenden Substanzen auf der PPE-Oberfläche und daraus resultierenden Unterschieden in der Fluoreszenzintensität, wurden anstatt der absoluten Fluoreszenzintensität (FI/AU) relative Werte für die Analyse (FI/%) verwendet. Die relative Fluoreszenzintensität der einzelnen Mäuse wurde berechnet, indem die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Tags durch die Fluoreszenzintensität an Tag 1 dividiert wurde. Dies erfolgte logischerweise getrennt für die ROI 1 sowie für die Mittelwerte der ROI 2-5 und der ROI 6-9. Die Messwerte wurden in Prozent ausgedrückt; jede Maus zeigte folglich an Tag 1 eine Fluoreszenzintensität von 100 %.

In der Auswertung der Messwerte aus Stunde 1 wurde analog verfahren und die Fluoreszenzintensität relativ zu Minute 0 dargestellt.

Die Verwendung der relativen Fluoreszenzintensität gegenüber den absoluten Werten sichert außerdem eine bessere Normalverteilungs- und Linearitätsannahme für das lineare gemischte Modell und gleichzeitig eine bessere Interpretation der Schätzer.

Zur korrekten Anwendung des linearen gemischten Modells muss ein annähernd linearer Verlauf über den untersuchten Zeitraum gegeben sein. Insbesondere bei der Gruppe "SR nativ" unterschied sich der Verlauf der Fluoreszenzintensität von Tag 1-2 jedoch deutlich von Tag 2-10, sodass die geforderte Linearität nicht erfüllt war. Daher wurde das lineare gemischte Modell für Tag 1-2 und Tag 2-10 für alle Versuchsgruppen separat angewandt, um die Vergleichbarkeit untereinander und die Konsistenz der Methodik zu gewährleisten. Für die Analyse der ersten Stunde nach Implantation war ein annähernd linearer Verlauf der Messwerte gegeben und der Zeitraum konnte folglich geschlossen untersucht werden.

Da Effekte der Nanopartikel primär im Implantat (ROI 1) zu erwarten waren und erst sekundär in den anderen Bereichen der Kammer (ROI 2-5 und ROI 6-9), befasste sich die confirmatorische Analyse der Messwerte mit folgenden Fragestellungen:

1. Besteht im Verlauf der Fluoreszenzintensität über zehn Tage in der ROI 1 bei einer Belichtungszeit von 50 ms ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „SR nativ“ und „SR nano“?

2. Besteht im Verlauf der Fluoreszenzintensität in der ersten Stunde in der ROI 1 bei einer Belichtungszeit von 50 ms ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „SR nativ“ und „SR nano“?
3. Besteht im Verlauf der Fluoreszenzintensität über zehn Tage in der ROI 1 bei einer Belichtungszeit von 50 ms ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“?

Jede Fragestellung wurde durch die Nullhypothese $H_0: \beta_{\text{Interaktion}} = 0$ und die Alternativhypothese $H_1: \beta_{\text{Interaktion}} \neq 0$ beschrieben. $\beta_{\text{Interaktion}}$ bezeichnete den Unterschied im Steigungskoeffizienten der Regressionsgeraden zwischen zwei Gruppen oder anders ausgedrückt den Unterschied im Verlauf der Fluoreszenzintensität mit der Zeit.

Da Frage 1 und Frage 3 sowohl im Zeitintervall Tag 1-2 als auch im Zeitintervall Tag 2-10 untersucht wurden, ergaben sich für alle drei Fragestellungen insgesamt fünf Hypothesen.

Das globale Signifikanzniveau von 5 % wurde deshalb mit der Bonferroni-Korrektur in fünf lokale Signifikanzniveaus von 1 % aufgeteilt. Demnach wurde jede Nullhypothese abgelehnt, falls für ihren entsprechenden p-Wert $p \leq 0,01$ galt und infolgedessen der Unterschied im Verlauf der Fluoreszenzintensität als „signifikant“ deklariert. Zu allen p-Werten wurde das entsprechende 99% Konfidenzintervall angegeben.

In der explorativen Analyse wurden die aufgeführten Fragestellungen analog für die restlichen ROIs und für die Belichtungszeit von 10 ms besprochen. Da diese Betrachtungen nur dem besseren Verständnis dienen und nicht zur Beantwortung der Hauptfragestellung herangezogen wurden, wurde keine Anpassung der Signifikanzniveaus aufgrund multipler Tests vorgenommen. Die angegebenen p-Werte sind lediglich explorativ zu verstehen. Zu allen p-Werten wurde das entsprechende 95 % Konfidenzintervall angegeben.

In der gesamten statistischen Analyse wurden die Schätzer für die y-Achsenabschnitte und für die Geradensteigung auf die zweite Nachkommastelle und die p-Werte auf die dritte Nachkommastelle gerundet angegeben.

6. Ergebnisse

In der folgenden Vorstellung der Ergebnisse wurden exemplarisch die intravitalmikroskopischen Aufnahmen je einer Rückenhautkammer pro Versuchsgruppe abgebildet. Die statistische Analyse bezog sich jeweils auf die gesamte Versuchsgruppe.

Um die Vergleichbarkeit und Verständlichkeit der Diagramme zu erhöhen wurde eine einheitliche Skalierung verwendet. Dies führte bei einigen Diagrammen dazu, dass einzelne Messwerte graphisch nicht mehr dargestellt werden können und wurde unter dem entsprechenden Diagramm vermerkt. Diese Messwerte und ihr Einfluss wurden dennoch in der statistischen Analyse sowie im Kurvenverlauf berücksichtigt.

Die gemessene absolute Fluoreszenzintensität der einzelnen Versuchstiere wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang (s. 10.3, 10.4, 10.5 und 10.6) aufgeführt, die Darstellung in diesem Kapitel erfolgte in Boxplots getrennt nach Versuchsgruppen. Auch die statistische Analyse in Form von Boxplots, Diagrammen und Tabellen der Messwerte bei der Belichtungszeit von 10 ms sind im Anhang (s. 10.1 und 10.2) zu finden, der Vergleich zu dem Datensatz bei 50 ms Belichtungszeit fand in Textform statt.

6.1 Absolute Fluoreszenzintensität

Für einen ersten Überblick über die erhobenen Daten wurden die Boxplots der absoluten Fluoreszenzintensität der vier Versuchsgruppen bei 50 ms Belichtungszeit betrachtet, getrennt nach der ROI 1, der ROI 2-5 und der ROI 6-9, jeweils repräsentativ für die verschiedenen Distanzen vom implantierten PPE.

Die Boxplots an Tag 0 stellen für die jeweiligen Versuchsgruppen die Fluoreszenzintensität in der Kammer vor Implantation des PPE dar. Die Werte für die Fluoreszenzintensität (die Hintergrundfluoreszenz der Kammer) lagen über alle Versuchsgruppen und alle ROIs verteilt zwischen 4 und 136 AU, der Median betrug 36 AU.

6.1.1 ROI 1

Die Fluoreszenzintensität in der ROI 1 (s. Abb. 14), der Bereich der Kammer in dem sich das PPE-Implantat befand, zeigte sowohl eine gruppenübergreifende als auch eine gruppenimmanente Streuung der Messwerte.

Bei der Betrachtung des Medians war die Fluoreszenzintensität der Gruppe „SR nano“ über den Versuchszeitraum am intensivsten (Tag 1: Median 4095 AU, Maximum 4095 AU, Minimum 4095 AU), gefolgt von „Etanercept nano“ (Tag 1: Median 4081 AU, Maximum 4095 AU, Minimum 4002 AU), „Etanercept nativ“ (Tag 1: Median 3918 AU, Maximum 4083 AU, Minimum 3173 AU) und „SR nativ“ (Tag 1: Median 3594 AU, Maximum 4095 AU, Minimum 507 AU).

In allen vier Versuchsgruppen war die Fluoreszenzintensität an Tag 1 (Ausgangsfluoreszenz) um ein Vielfaches höher als die Hintergrundfluoreszenz der Kammer und damit klar von ebendieser abgrenzbar. Dies galt auch für den Zeitraum von Tag 2 bis Tag 10, lediglich die Gruppe „SR nativ“ zeigte ab Tag 2 Fluoreszenzintensitäten im Bereich der Hintergrundfluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität in jeder Versuchsgruppe sank nach Implantation des PPE mit fortschreitender Zeit ab.

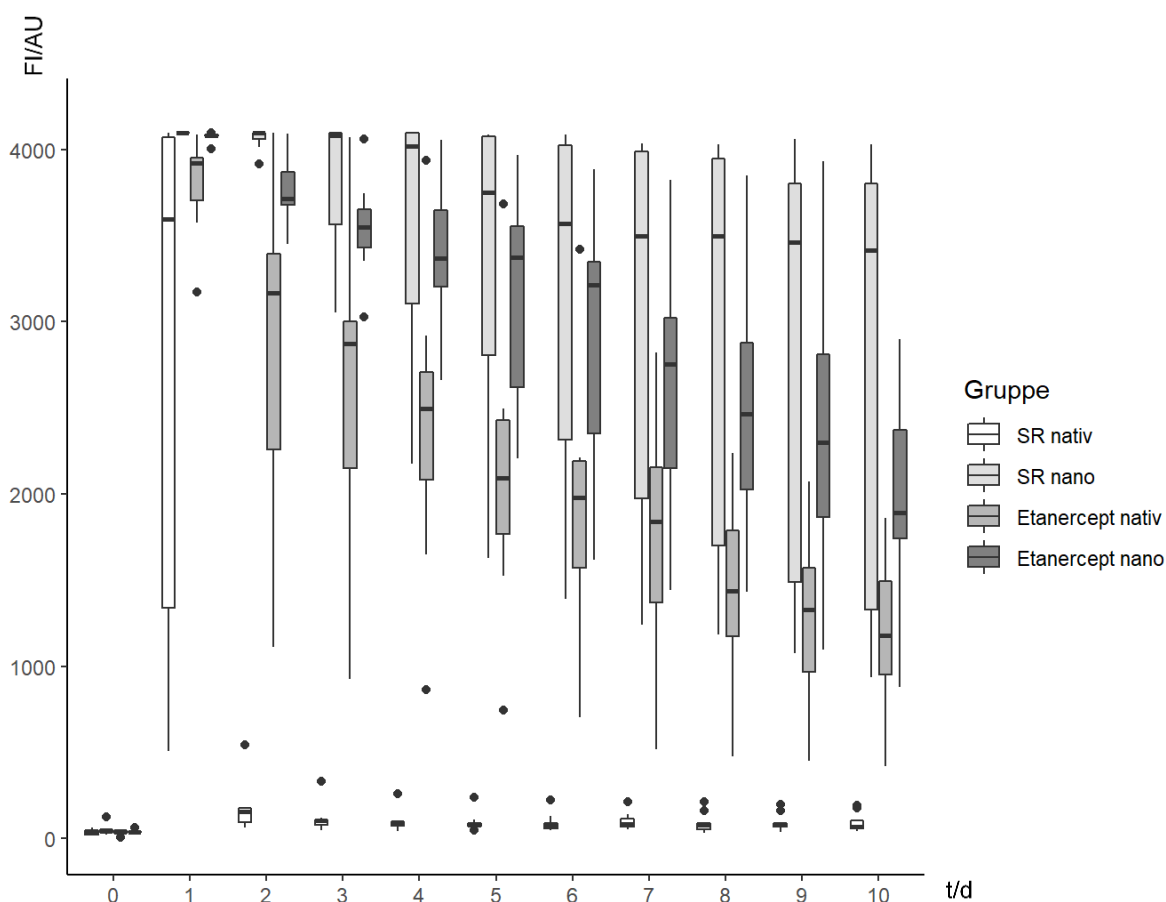


Abb. 14: Boxplots ROI 1, 50 ms
Fluoreszenzintensität in arbitrary units (FI/AU), Zeit in Tagen (t/d)

6.1.2 ROI 2-5

Für die Fluoreszenzintensität in der ROI 2-5 (s. Abb. 15), der Bereich der Kammer in direkter Umgebung des Implantats, zeigten sich insgesamt niedrigere Messwerte als in der ROI 1.

Der Median nahm bei „SR nano“ die größten (Tag 1: Median 3418 AU, Maximum 4095 AU, Minimum 1908 AU) und bei „SR nativ“ die niedrigsten Messwerte an (Tag 1: Median 976 AU, Maximum 4094 AU, Minimum 83 AU). Bei „Etanercept nano“ (Tag 1: Median 1852 AU, Maximum 3823 AU, Minimum 864 AU) und „Etanercept nativ“ (Tag 1: Median 1417 AU, Maximum 3110 AU, Minimum 551 AU) zeigten sich über den Versuchszeitraum teils in der einen und teils in der anderen Gruppe höhere Werte für den Median der Fluoreszenzintensität.

Die Messwerte der ROI 2-5 hoben sich ebenfalls von der Hintergrundfluoreszenz der Kammer ab. Die Ausnahme bildete wie bei der ROI 1 „SR nativ“ zwischen Tag 2 und Tag 10. Mit fortschreitender Versuchszeit konnten auch in der ROI 2-5 eine sinkende Fluoreszenzintensität beobachtet werden.

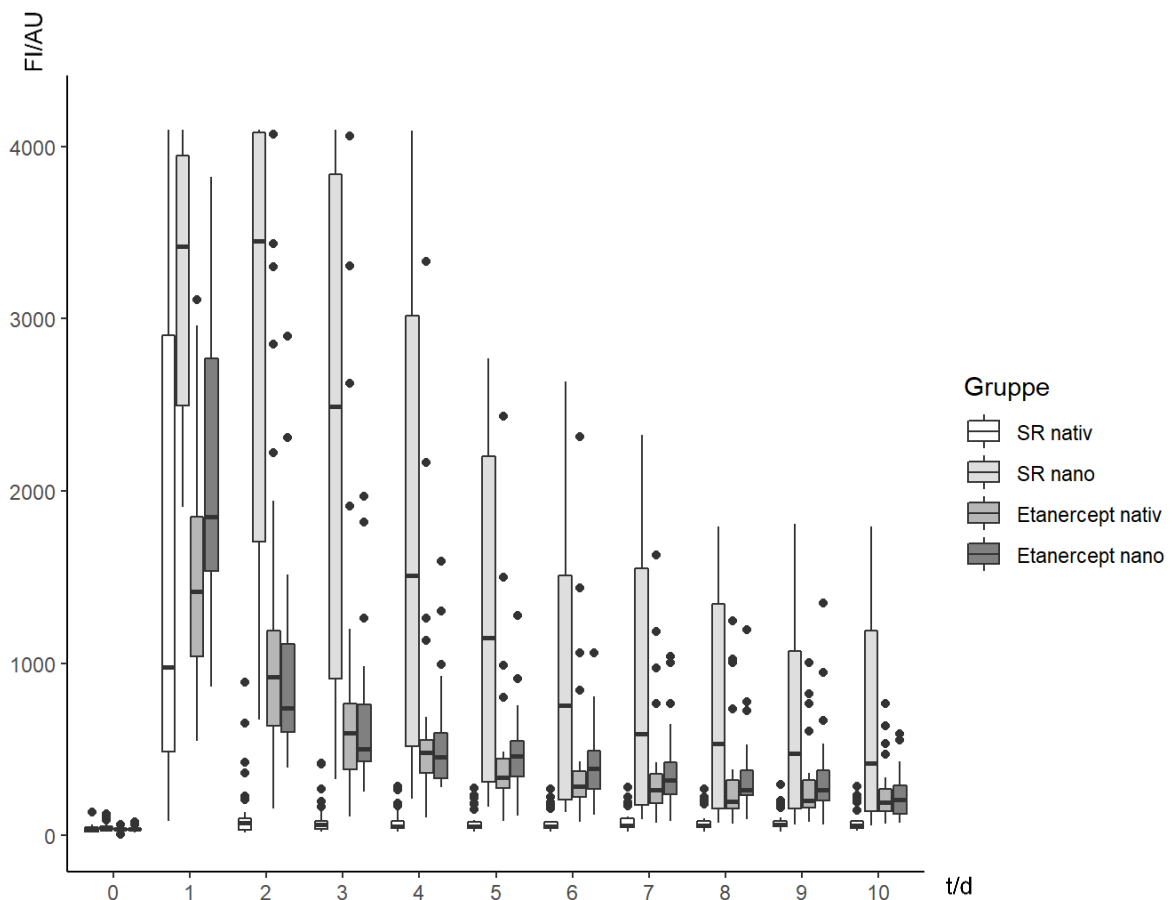


Abb. 15: Boxplots ROI 2-5, 50 ms

Fluoreszenzintensität in arbitrary units (FI/AU), Zeit in Tagen (t/d)

6.1.3 ROI 6-9

Die Boxplots der vier Versuchsgruppen für die Fluoreszenzintensität in der ROI 6-9 (s. Abb. 16), Kammerbereiche in weiterer Entfernung vom PPE-Implantat, zeigten im Vergleich zu der ROI 1 und der ROI 2-5 die niedrigsten Messwerte. Die Fluoreszenzintensität von „SR nano“ (Tag 1: Median 412 AU, Maximum 1570 AU, Minimum 62 AU), „SR nativ“ (Tag 1: Median 252 AU, Maximum 2259 AU, Minimum 50 AU), „Etanercept nano“ (Tag 1: Median 276 AU, Maximum 2262 AU, Minimum 66 AU) und „Etanercept nativ“ (Tag 1: Median 414 AU, Maximum 1612 AU, Minimum 78 AU) bewegte sich teilweise im Bereich der Hintergrundfluoreszenz der Kammer. Von einer weiteren statistischen Auswertung der ROI 6-9 wurde daher abgesehen.

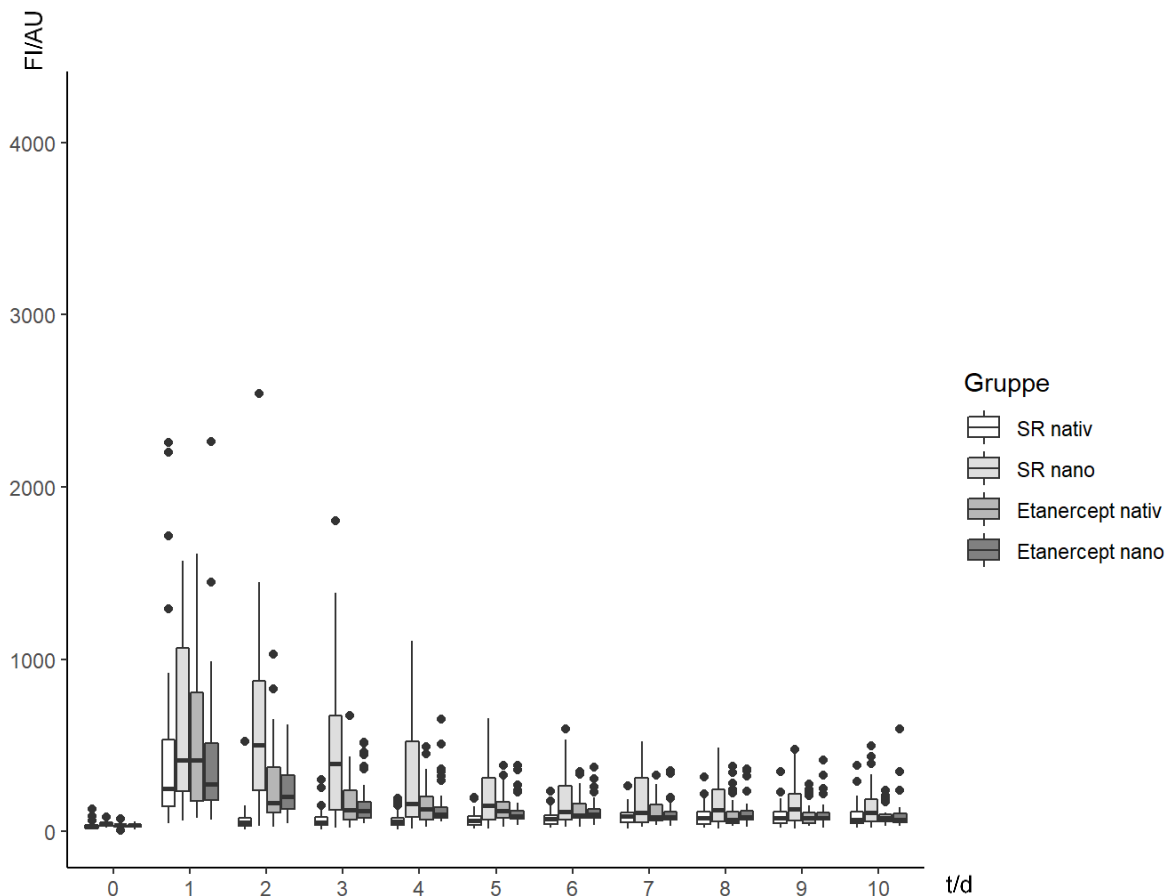


Abb. 16: Boxplots ROI 6-9, 50 ms
Fluoreszenzintensität in arbitrary units (FI/AU), Zeit in Tagen (t/d)

6.1.4 Absolute Fluoreszenzintensität 10 ms

Die absolute Fluoreszenzintensität in der ROI 1, der ROI 2-5 und der ROI 6-9 bei einer Belichtungszeit von 10 ms zeigte niedrigere Messwerte als bei 50 ms Belichtungszeit, wies aber die gleichen Verteilungscharakteristika wie die in 6.1.1, 6.1.2 und 6.1.3

beschriebenen Boxplots auf (s. Anhang 10.1).

Die Hintergrundfluoreszenz der Kammer wurde bei 10 ms Belichtungszeit nicht gemessen, weil diese Messreihe lediglich zum Vergleich diente. Da bei einer Maus aus „SR nativ“ und bei zwei Mäusen aus „SR nano“ keine Aufnahmen bei 10 ms Belichtungszeit vorlagen, war der Stichprobenumfang verringert.

6.2 Sulforhodamin 101

Zur Quantifizierung des Verlaufs der Fluoreszenzintensität und zum Vergleich der Versuchsgruppen wurden wie bereits beschrieben bei allen Messreihen aufgrund unterschiedlicher Ausgangsfluoreszenz die Messwerte relativiert und wegen des Verlaufs der Gruppe „SR nativ“ der Versuchszeitraum in Tag 1-2 und Tag 2-10 aufgliedert.

6.2.1 Fluoreszenzintensität über 10 Tage 50 ms

Der Verlauf der Fluoreszenzintensität über zehn Tage in den Gruppen „SR nativ“ und „SR nano“ zeigt bei 50 ms Belichtungszeit bei Betrachtung der Aufnahmen des Intravitalmikroskops Unterschiede (s. Abb. 17).

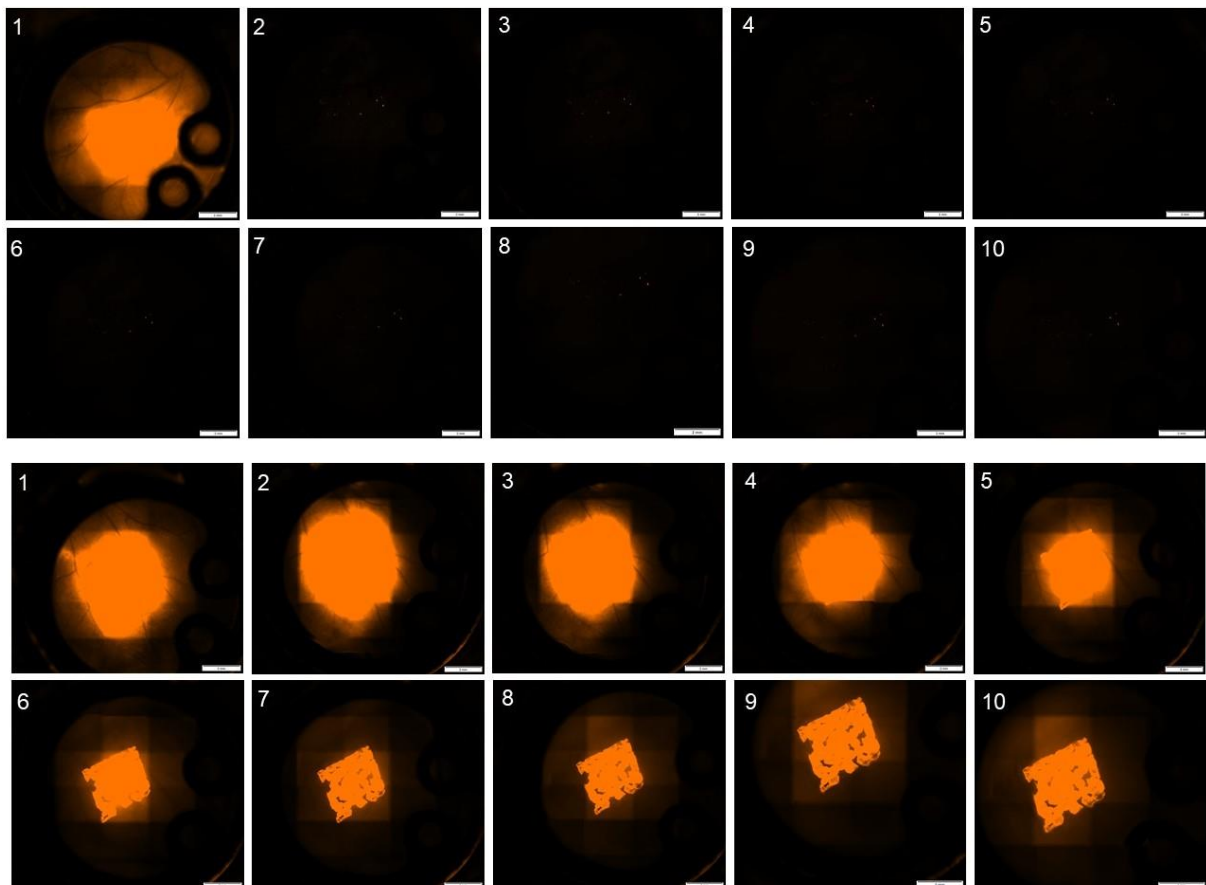


Abb. 17: Intravitalmikroskopische Aufnahmen SR 101 (50 ms) über zehn Tage
SR nativ (oben) und SR nano (unten)

In dem linearen gemischten Modell beträgt im Diagramm zum Fluoreszenzintensitätsverlauf (s. Abb. 18) der Schätzer für den y-Achsenabschnitt im Zeitraum von Tag 1-2 100%, da die lineare Funktion durch die Verwendung der relativen Messwerte für beide Gruppen an Tag 1 bei 100 % beginnt. „SR nativ“ weist für Tag 1-2 einen Schätzer der Geradensteigung von -92,78 %/Tag auf, die Fluoreszenzintensität fällt dementsprechend um 92,78 % von Tag 1 auf Tag 2. „SR nano“ fällt lediglich um 0,75 % ab, daher ergibt sich eine Differenz der Geradensteigungen von 92,03 %/Tag, die statistisch signifikant ist ($p \leq 0,001$).

Im Zeitraum von Tag 2-10 wird für den y-Achsenabschnitt ein Schätzer von 6,17 % bei „SR nativ“ und von 95,88 % bei „SR nano“ errechnet. Der Schätzer der Geradensteigung beträgt -0,22 %/Tag für die Gruppe „SR nativ“ und -3,98 %/Tag für „SR nano“, die Differenz von -3,76 %/Tag ist ebenfalls statistisch signifikant ($p = 0,008$).

In dem verwendeten linearen gemischten Modell haben die berechneten Differenzen der Geradensteigungen hinsichtlich des Vorzeichens folgende Bedeutung:

Ein positives Vorzeichen der Differenz wie 92,03%/Tag von Tag 1-2 zeigt einen schnelleren Abfall der Fluoreszenzintensität in der Gruppe „SR nativ“. Ein negatives Vorzeichen wie -3,76%/Tag markiert einen schnelleren Fluoreszenzintensitätsabfall in der Gruppe „SR nano“. Beides ist gleichzeitig auch im Kurvenverlauf erkennbar. „SR nano“ fällt von Tag 2-10 schneller ab, da „SR nativ“ sich kaum noch verändert und wie in 6.1.1 beschrieben auf dem Niveau der Hintergrundfluoreszenz liegt.

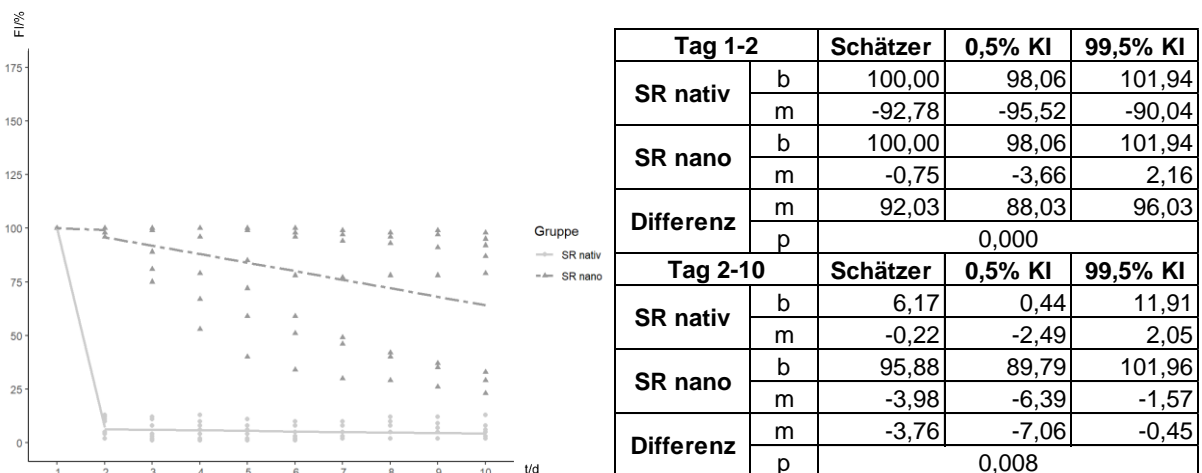


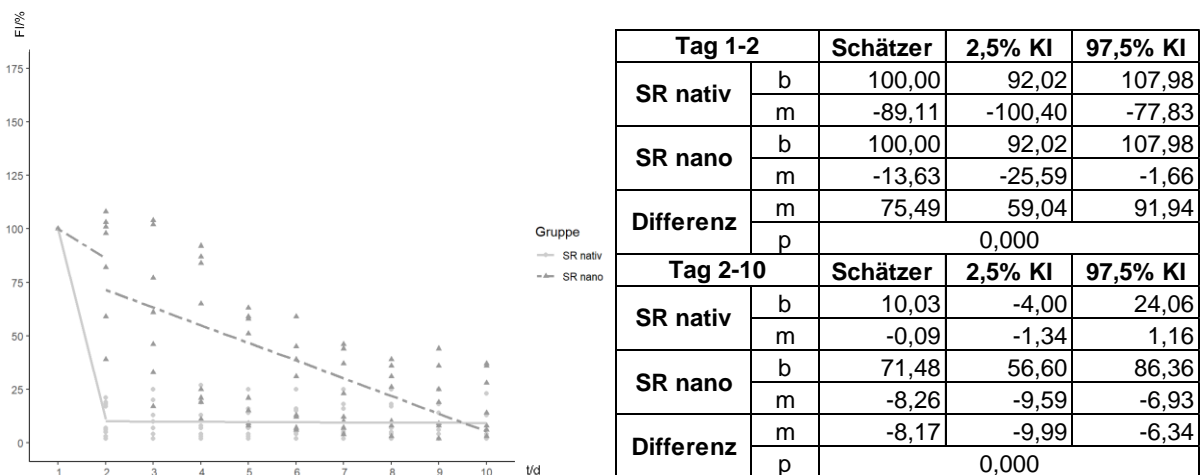
Abb. 18: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 1, 50 ms
 Relative Fluoreszenzintensität in Prozent (FI/%), Zeit in Tagen (t/d) [Diagramm links]
 Schätzer sowie Konfidenzintervalle (KI) für den y-Achsenabschnitt (b) in Prozent und für die Geradensteigung (m) in Prozent/Tag; „p“ bezeichnet den p-Wert der Differenz der Geradensteigungen [Tabelle rechts]

Die erste Fragestellung kann folglich damit beantwortet werden, dass im zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität (der Geradensteigung) über zehn Tage in der ROI 1 bei einer Belichtungszeit von 50 ms zwischen den Versuchsgruppen „SR nativ“ und „SR nano“ ein signifikanter Unterschied besteht.

In der Analyse der ROI 2-5 (s. Abb. 19) zeigen die Schätzer einen Abfall der Fluoreszenzintensität von 89,11 %/Tag (Tag 1-2) und von 0,09 %/Tag (Tag 2-10) für „SR nativ“. Bei „SR nano“ fällt die Fluoreszenzintensität um 13,63 %/Tag (Tag 1-2) und um 8,26 %/Tag (Tag 2-10).

Die Differenz der Geradensteigungen beträgt von Tag 1-2 75,49 %/Tag ($p \leq 0,001$) und von Tag 2-10 -8,17 %/Tag ($p \leq 0,001$).

Die Differenz der Geradensteigungen der Versuchsgruppen ist in Relation zu der ROI 1 von Tag 1-2 (92,03 %/Tag) weniger stark ausgeprägt und von Tag 2-10 (-3,76 %/Tag) stärker ausgeprägt, da „SR nano“ in der ROI 2-5 schneller abfällt.



Tag 1-2		Schätzer	2,5% KI	97,5% KI
SR nativ	b	100,00	92,02	107,98
	m	-89,11	-100,40	-77,83
SR nano	b	100,00	92,02	107,98
	m	-13,63	-25,59	-1,66
Differenz	m	75,49	59,04	91,94
	p	0,000		
Tag 2-10		Schätzer	2,5% KI	97,5% KI
SR nativ	b	10,03	-4,00	24,06
	m	-0,09	-1,34	1,16
SR nano	b	71,48	56,60	86,36
	m	-8,26	-9,59	-6,93
Differenz	m	-8,17	-9,99	-6,34
	p	0,000		

Abb. 19: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 2-5, 50 ms
Bezeichnungen und Einheiten vgl. Abb. 18

6.2.2 Fluoreszenzintensität über 10 Tage 10 ms

Bei einer Belichtungszeit von 10 ms zeigen die Aufnahmen der Fluoreszenzintensität über zehn Tage ebenfalls Unterschiede zwischen „SR nativ“ und „SR nano“ (s. Abb. 20).

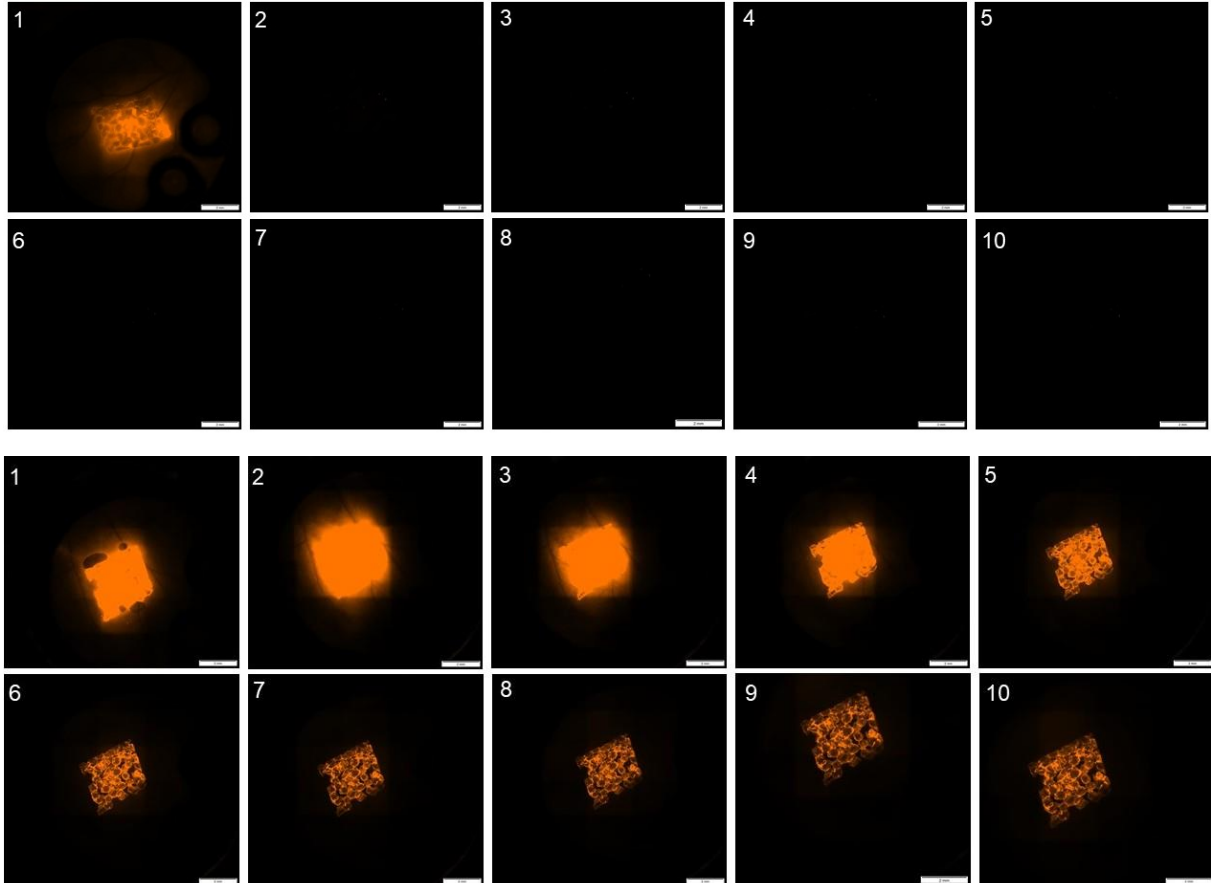


Abb. 20: Intravitalmikroskopische Aufnahmen SR 101 (10 ms) über zehn Tage
SR nativ (oben) und SR nano (unten)

In der quantitativen Analyse der Fluoreszenzintensität (s. Anhang 10.2) unterscheiden sich die Schätzer für die Geradensteigungen bei 10 ms um weniger als 5 %/Tag von denen bei 50 ms. Eine Ausnahme stellt die Geradensteigung von „SR nano“ von Tag 1-2 sowohl in der ROI 1 als auch in der ROI 2-5 dar:

„SR nano“ fällt von Tag 1-2 in der ROI 1 mit 18,43 %/Tag im Vergleich zu den beschriebenen 0,75 %/Tag bei 50 ms ab. Dadurch verringert sich die Differenz der Geradensteigungen der Versuchsgruppen bei 10 ms zu 74,81 %/Tag ($p \leq 0,001$) von 92,03 %/Tag ($p \leq 0,001$) bei 50 ms.

In der ROI 2-5 steigt „SR nano“ von Tag 1-2 bei 10 ms mit 11,95 %/Tag, wohingegen die Fluoreszenzintensität bei 50 ms mit 13,63 %/Tag fällt. Die Differenz der Geradensteigungen zwischen „SR nativ“ und „SR nano“ beträgt bei 10 ms daher 101,02 ($p \leq 0,001$) im Vergleich zu 75,49 ($p \leq 0,001$) bei 50 ms.

6.2.3 Fluoreszenzintensität in Stunde 1

Für die Gruppen „SR nativ“ und „SR nano“ wurde auch die Fluoreszenzintensität in der ersten Stunde nach Implantation des PPE bei einer Belichtungszeit von 50 ms gemessen (s. Abb. 21).

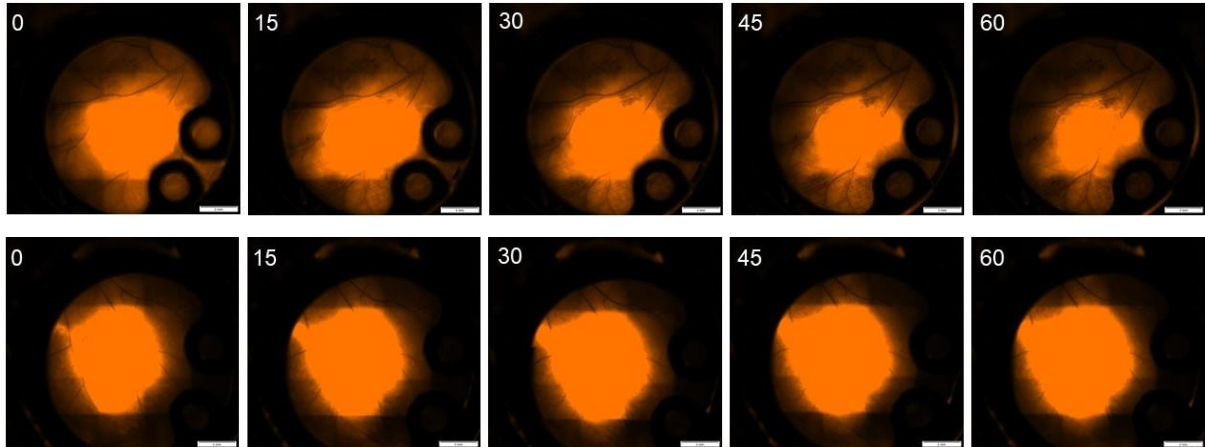


Abb. 21: Intravitalmikroskopische Aufnahmen SR 101 (50 ms) in Stunde 1
SR nativ (oben) und SR nano (unten)

In der ROI 1 zeigt die Fluoreszenzintensität der Gruppe „SR nativ“ während der ersten Stunde nach Implantation einen Abfall von 0,44 % pro Minute, wohingegen die Fluoreszenzintensität bei „SR nano“ weder steigt noch abfällt ($m=0$) (s. Abb. 22). Die Differenz der Geradensteigungen der beiden Gruppen von 0,44 %/min ist statistisch signifikant ($p=0,007$).

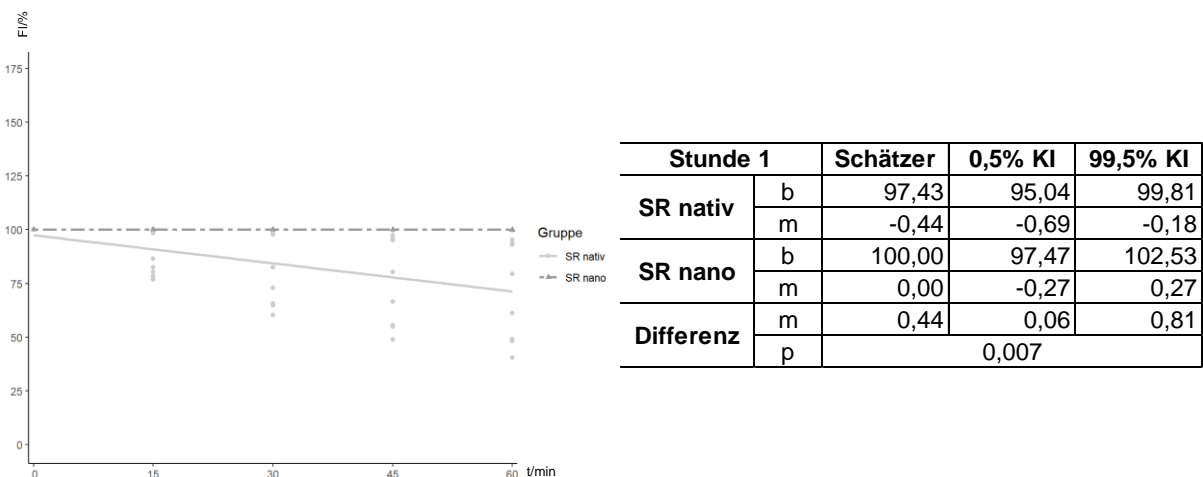


Abb. 22: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 1, 50 ms, Stunde 1
Relative Fluoreszenzintensität in Prozent (FI/%), Zeit in Minuten (t/min) [Diagramm links]
Schätzer sowie Konfidenzintervalle (KI) für den y-Achsenabschnitt (b) in Prozent und für die
Geradensteigung (m) in Prozent/Minute; „p“ bezeichnet den p-Wert der Differenz der
Geradensteigungen [Tabelle rechts]

Die zweite Fragestellung kann daher damit beantwortet werden, dass im Verlauf der Fluoreszenzintensität in der ersten Stunde in der ROI 1 bei einer Belichtungszeit von 50 ms ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „SR nativ“ und „SR nano“ besteht.

In der ROI 2-5 weist „SR nativ“ einen Abfall von 0,46% der Fluoreszenzintensität pro Minute auf, im Gegensatz dazu steigt die Fluoreszenzintensität der Gruppe „SR nano“ pro Minute um 0,10 %. Die Differenz der Geradensteigungen beträgt folglich 0,56 %/min ($p=0,002$).

Die beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich in der ersten Stunde folglich in der ROI 2-5 etwas stärker im Fluoreszenzintensitätsabfall als in der ROI 1.

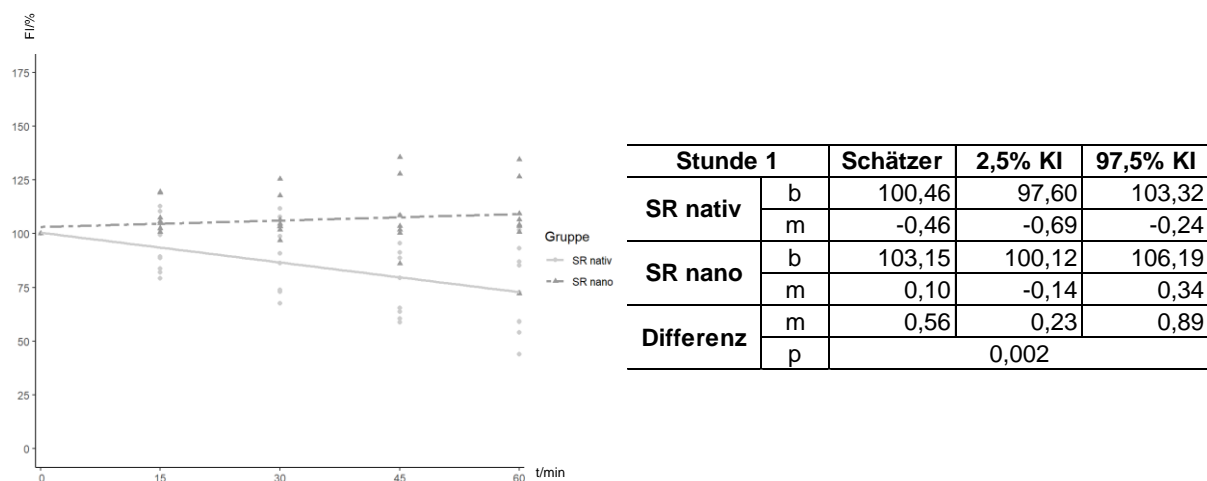


Abb. 23: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 2-5, 50 ms, Stunde 1
Bezeichnungen und Einheiten vgl. Abb. 22

6.3 Etanercept

Analog zu der Analyse von Sulforhodamin 101 wurden auch bei Etanercept wie beschrieben die Messwerte relativiert und der Versuchszeitraum in Tag 1-2 und Tag 2-10 aufgegliedert.

6.3.1 Fluoreszenzintensität über 10 Tage 50 ms

Für die Gruppen „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ wurden ebenfalls intravitalmikroskopische Aufnahmen angefertigt (s. Abb. 24).

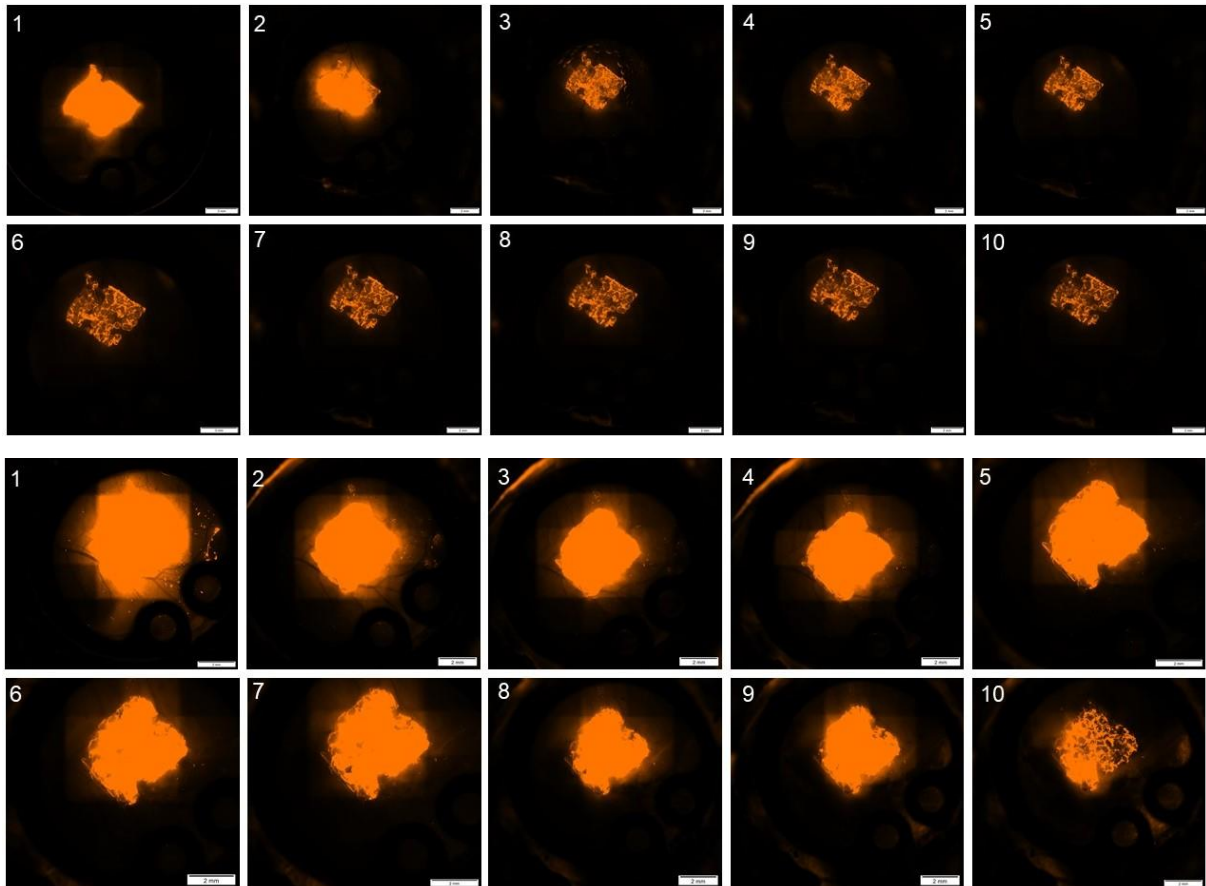


Abb. 24: Intravitalmikroskopische Aufnahmen Etanercept (50 ms) über zehn Tage
Etanercept nativ (oben) und Etanercept nano (unten)

Die statistische Analyse (s. Abb. 25) zeigt für den Abfall der Fluoreszenzintensität in der ROI 1 von Tag 1-2 für die Gruppe „Etanercept nativ“ einen Schätzer von 24,25%/Tag und für „Etanercept nano“ von 7,75 %/Tag. Die Differenz von 16,50 %/Tag ist allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,091$).

Im Zeitraum von Tag 2-10 fällt „Etanercept nativ“ mit 5,75 %/Tag weniger steil als zuvor ab, die Fluoreszenzintensität von „Etanercept nano“ sinkt mit 5,27 %/Tag auch langsamer als am ersten Tag. Der Unterschied im zeitlichen Verlauf des Abfalls ist

infolgedessen geringer als von Tag 1-2, beträgt 0,48 %/Tag und ist statistisch ebenfalls nicht signifikant ($p=0,646$).

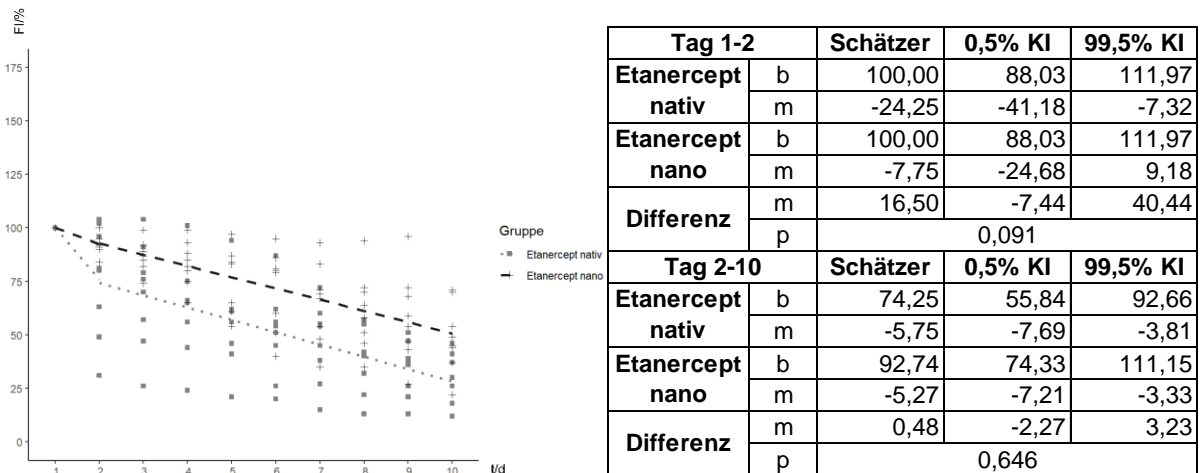


Abb. 25: Fluoreszenzverlauf „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ in ROI 1, 50 ms
Bezeichnungen und Einheiten vgl. Abb. 18

Die dritte Fragestellung kann daher damit beantwortet werden, dass im Verlauf der Fluoreszenzintensität über zehn Tage in der ROI 1 bei einer Belichtungszeit von 50 ms kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ besteht.

In der ROI 2-5 (s. Abb. 26) fällt die Fluoreszenzintensität der Gruppe „Etanercept nativ“ zuerst mit 15,63 %/Tag von Tag 1-2 und dann mit 7,53 %/Tag von Tag 2-10 ab. In der Versuchsgruppe „Etanercept nano“ sinkt die Fluoreszenzintensität von Tag 1-2 mit 55,63%/Tag und von Tag 2-10 mit 3,44 %/Tag. Die Differenz der Versuchsgruppen im Abfall der Fluoreszenzintensität ergibt sich somit als -40,00%/Tag ($p=0,134$) von Tag 1-2 und als 4,09%/Tag ($p=0,145$) von Tag 2-10. Im Kontrast zu der ROI 1 fällt von Tag 1-2 folglich „Etanercept nano“ stärker ab als „Etanercept nativ“, von Tag 2-10 sinkt die Fluoreszenzintensität wie in der ROI 1 bei „Etanercept nano“ langsamer als bei „Etanercept nativ“.

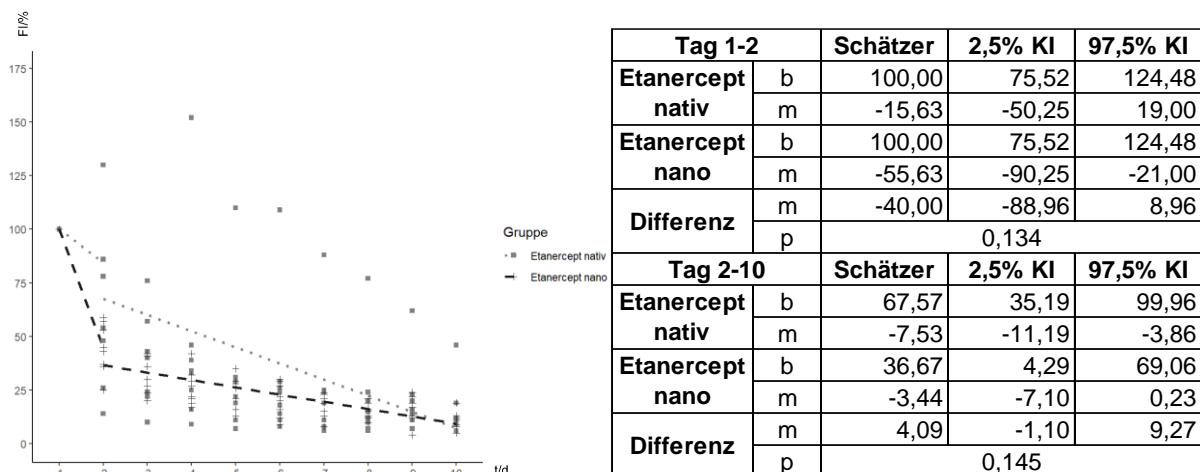


Abb. 26: Fluoreszenzverlauf „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ in ROI 2-5, 50 ms
 Bezeichnungen und Einheiten vgl. Abb. 18
 Im Diagramm fehlen aufgrund der einheitlichen Skalierung zwei Messwerte der Gruppe „Etanercept nativ“: 239,45 % an Tag 2 und 228,95 % an Tag 3

6.3.2 Fluoreszenzintensität über 10 Tage 10 ms

Die Fluoreszenzintensität der Gruppen „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ wurde bei einer Belichtungszeit von 10 ms analog zu 50 ms gemessen (s. Abb. 27).

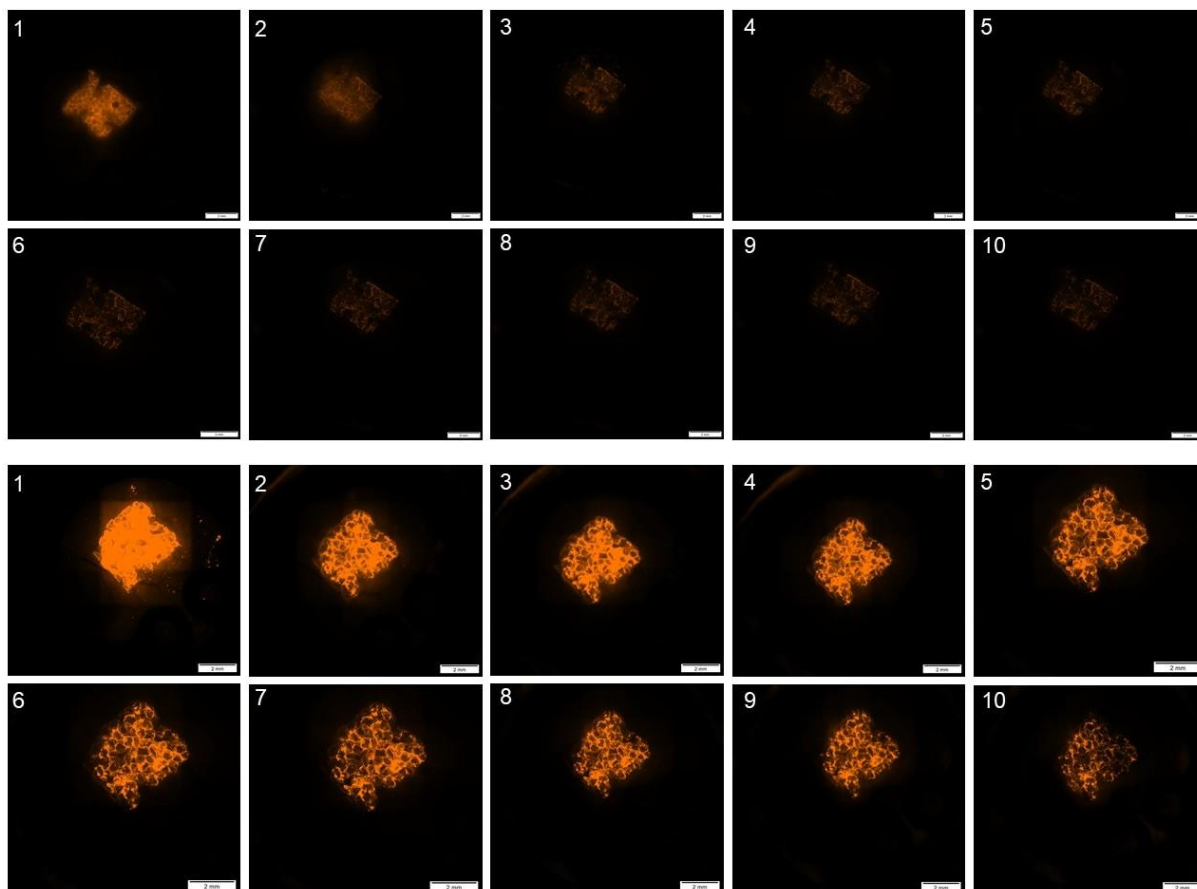


Abb. 27: Intravitalmikroskopische Aufnahmen Etanercept (10 ms) über zehn Tage
 Etanercept nativ (oben) und Etanercept nano (unten)

Die statistische Analyse der Fluoreszenzintensität bei 10 ms (s. Anhang 10.2) zeigt bei den Geradensteigungen einen Unterschied der Schätzer von weniger als 5 %/Tag verglichen mit dem Datensatz bei 50 ms Belichtungszeit. Stärker weichen lediglich zwei Messwerte ab:

In der ROI 1 fällt die Fluoreszenzintensität von „Etanercept nano“ von Tag 1-2 mit 49,94%/Tag ab, bei 50 ms wird nur ein Abfall von 7,75 %/Tag errechnet. Die Differenz der Geradensteigungen zwischen den Versuchsgruppen beträgt daher -20,72 %/Tag ($p=0,231$) anstatt 16,50 %/Tag ($p=0,091$), „Etanercept nano“ fällt bei 10 ms Belichtungszeit folglich schneller als „Etanercept nativ“.

In der ROI 2-5 verändert sich der Fluoreszenzintensitätsabfall von Tag 1-2 der Gruppe „Etanercept nativ“ von 15,63 %/Tag bei 50 ms zu 5,71 %/Tag bei 10 ms. Die Differenz der Geradensteigungen ändert sich aus diesem Grund von -40,00 %/Tag ($p=0,134$) bei 50 ms zu -51,57 %/Tag ($p=0,182$) bei 10 ms.

6.4 Sulforhodamin 101 und Etanercept

Aufgrund des Verlaufs der Fluoreszenzintensität bei der niedermolekularen Substanz Sulforhodamin 101 und der hochmolekularen Substanz Etanercept wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen „SR nativ“ und „Etanercept nativ“ noch explorativ statistisch analysiert. Die Differenzen der Schätzer der Geradensteigungen betragen bei 50 ms Belichtungszeit in der ROI 1 von Tag 1-2 68,53 %/Tag ($p\leq 0,001$) und von Tag 2-10 -5,53 %/Tag ($p\leq 0,001$) sowie in der ROI 2-5 von Tag 1-2 73,48 %/Tag ($p=0,005$) und von Tag 2-10 -7,44 %/Tag ($p=0,008$). Bei 10 ms Belichtungszeit entsprechen die Differenzen der Geradensteigungen in der ROI 1 von Tag 1-2 64,01 %/Tag ($p\leq 0,001$) und von Tag 2-10 -5,69 %/Tag ($p=0,004$) sowie in der ROI 2-5 von Tag 1-2 83,36 %/Tag ($p=0,035$) und von Tag 2-10 -8,53 %/Tag ($p=0,042$).

6.5 Überblick

In der Analyse mit dem linearen gemischten Modell zeigen die Experimente mit der niedermolekularen Substanz Sulforhodamin 101 signifikante Unterschiede im Verlauf der Fluoreszenzintensität in der Region des Implantats (ROI 1) bei 50 ms Belichtungszeit zwischen den Gruppen „SR nativ“ und „SR nano“. Dies gilt sowohl für Tag 1-2 ($m_{SR\text{ nativ}} \approx -92,8$ %/Tag, $m_{SR\text{ nano}} \approx -0,8$ %/Tag, $p\leq 0,001$) als auch für Tag 2-10 ($m_{SR\text{ nativ}} \approx -0,2$ %/Tag, $m_{SR\text{ nano}} \approx -4,0$ %/Tag, $p=0,008$) und für Stunde 1 ($m_{SR\text{ nativ}} \approx -0,44$ %/min, $m_{SR\text{ nano}} \approx 0,00$ %/min, $p=0,007$).

Der Verlauf der Fluoreszenzintensität bei der Verwendung der hochmolekularen Substanz Etanercept bei 50 ms Belichtungszeit in der ROI 1 wurde ebenfalls analysiert. Die Unterschiede zwischen den Gruppen „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ sind weder für Tag 1-2 ($m_{\text{Etanercept nativ}} \approx -24,3 \text{ \%/Tag}$, $m_{\text{Etanercept nano}} \approx -7,8 \text{ \%/Tag}$, $p=0,091$) noch für Tag 2-10 ($m_{\text{Etanercept nativ}} \approx -5,8 \text{ \%/Tag}$, $m_{\text{Etanercept nano}} \approx -5,3 \text{ \%/Tag}$, $p=0,646$) statistisch signifikant.

Die errechneten linearen Funktionen aller vier Versuchsgruppen wurden bei einer Belichtungszeit von 50 ms für ROI 1 (s. Abb. 28) und für ROI 2-5 (s. Abb. 29) inklusive der Geradensteigungen zur besseren Übersichtlichkeit in zwei Diagrammen zusammengefasst. Die entsprechenden Diagramme für 10 ms finden sich im Anhang (s. 10.2).

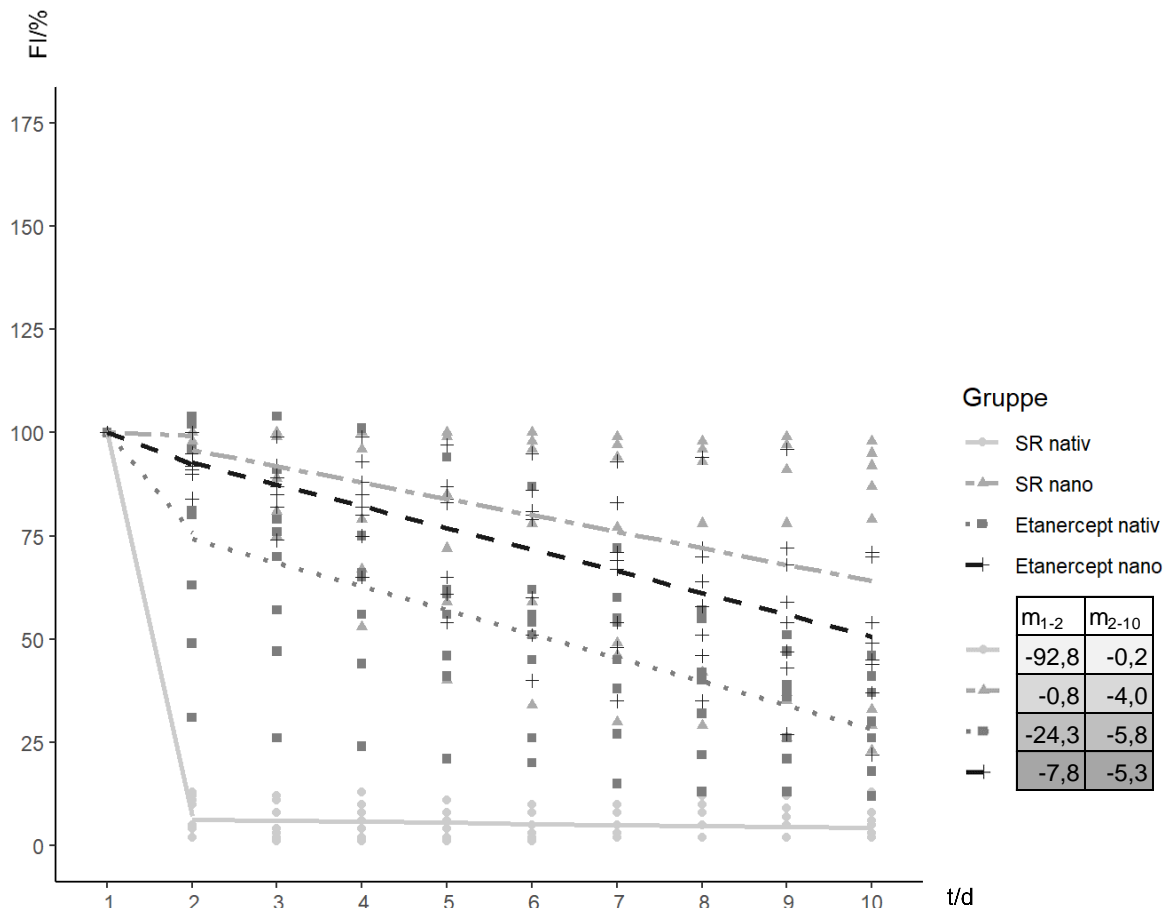


Abb. 28: Fluoreszenzverlauf aller vier Versuchsgruppen in ROI 1 (50 ms) über zehn Tage
Relative Fluoreszenzintensität in Prozent (FI/%), Zeit in Tagen (t/d)
Geradensteigungen für Tag 1-2 (m_{1-2}) und für Tag 2-10 (m_{2-10}) in %/Tag

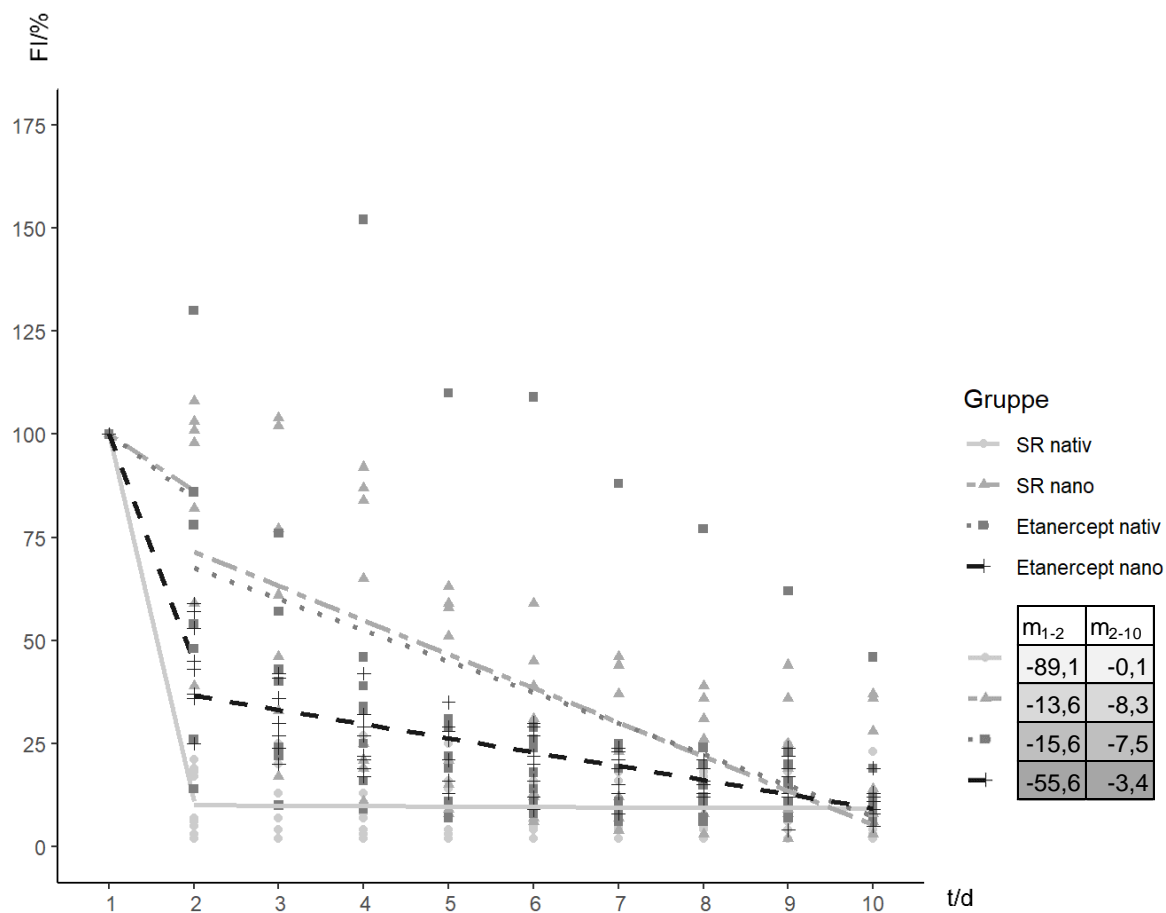


Abb. 29: Fluoreszenzverlauf aller vier Versuchsgruppen in ROI 2-5 (50 ms) über zehn Tage
 Bezeichnungen und Einheiten vgl. Abb. 28
 Im Diagramm fehlen aufgrund der einheitlichen Skalierung zwei Messwerte der Gruppe „Etanercept nativ“: 239,45 % an Tag 2 und 228,95 % an Tag 3

7. Diskussion

7.1 Absolute Messwerte der Fluoreszenzintensität

Die Ausgangsfluoreszenz der Implantate in der Rückenhautkammer zeigte gruppenimmanent sowie gruppenübergreifend deutliche Unterschiede. Die Unterschiede von Tier zu Tier innerhalb einer Gruppe können auf Differenzen der Implantatstruktur, der Beschichtung, des Implantationsvorgangs des PPE und auf individuelle biologische Verhältnisse der Rückenhautkammern zurückzuführen sein. Die Messwerte innerhalb der Gruppe „SR nativ“ wiesen in diesem Zusammenhang die breiteste Streuung auf. Da die Implantate dieser Versuchsgruppe mit Sulforhodamin 101 beschichtet wurden, das aufgrund seiner geringen Größe von 1,0-1,4 nm (Ishizaka et al., 1998) eine hohe Diffusionsgeschwindigkeit aufweist (Einstein, 1905), können zeitliche Unterschiede bei der Implantation folglich zu größeren Unterschieden in der Ausgangsfluoreszenz führen als bei den anderen Gruppen.

Unterschiede der Ausgangsfluoreszenz zwischen den Gruppen sind möglicherweise zusätzlich zu den genannten Effekten durch unterschiedliche Konzentrationen des Farbstoffs in den Nanopartikeln und im Konjugat mit Etanercept bedingt. Der vorbeschriebenen Eigenfluoreszenz der Nanopartikel bei Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm) (Piradashvili et al., 2017, Piradashvili, 2018) ist durch die Wahl von SR 101 beziehungsweise Alexa Fluor® 594 als Farbstoff und der Emissionswellenlänge des Intravitalmikroskops von 565 nm kein relevanter Einfluss zuzuschreiben. Die unterschiedlichen Fluoreszenzspektren von SR 101 (Exzitationswellenlänge 586 nm, Emissionswellenlänge 605 nm) und Alexa Fluor® 594 (Exzitationswellenlänge 590 nm, Emissionswellenlänge 617 nm) hingegen könnten für Unterschiede der Fluoreszenzintensität partiell verantwortlich sein.

Vor der Implantation des PPE in die Rückenhautkammer wurde die Hintergrundfluoreszenz der Kammer gemessen, die je nach Helligkeit des Gewebes eine Streuung der Messwerte zwischen 4 und 136 AU zeigte. In dem Bereich des Implantats (ROI 1) und dessen direkter Umgebung (ROI 2-5) waren in allen Versuchsgruppen eine Fluoreszenzintensität oberhalb der Hintergrundfluoreszenz messbar (s. 6.1.1 und 6.1.2). In den weiter vom PPE entfernten Regionen der Kammer (ROI 6-9) dagegen lagen die Messwerte auf dem Niveau der Hintergrundfluoreszenz (s. 6.1.3). Folglich beeinflusste die Beschichtung des PPE mit den Fluoreszenzfarbstoffen die messbare Fluoreszenzintensität in dem Bereich des Implantats und dessen direkter Umgebung, aber nicht die entfernteren Areale der

Kammer. Da die Fluoreszenzintensität in der ROI 2-5 niedrigere Werte als in der ROI 1 annahm, war der Effekt der Beschichtung daher über dem Implantat stärker ausgeprägt als in dessen Umgebung.

Ab Tag 2 lag die Fluoreszenzintensität in der Gruppe „SR nativ“ sowohl in der ROI 1 als auch in der ROI 2-5 im Bereich der Hintergrundfluoreszenz der Kammer, es war folglich keine messbare Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs mehr vorhanden.

Zum Vergleich der Kinetik des Abfalls der Fluoreszenzintensität zwischen den untersuchten Versuchsgruppen und der damit einhergehenden Evaluation der Effekte der Albumin-Nanopartikel wurde der Verlauf der Fluoreszenzintensität durch lineare Funktionen abgebildet. Zur Normierung des Einflusses der Ausgangsfluoreszenz auf die Kinetik wurden fortan prozentuale Messwerte in Relation zur Ausgangsfluoreszenz verwendet. Der zehntägige Versuchszeitraum wurde aufgrund der Abfallkinetik der Gruppe „SR nativ“ in zwei separate Analysezeiträume (Tag 1-2 und Tag 2-10) aufgeteilt, um eine bessere mathematische Darstellbarkeit zu ermöglichen.

7.2 Albumin-Nanopartikel beladen mit Sulforhodamin 101

7.2.1 Effekte der Nanopartikel über zehn Tage nach PPE-Implantation

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Fluoreszenz von PPE-Implantaten bei zwei unterschiedlichen Beschichtungen, entweder mit SR 101 (n=9) oder SR 101 enkapsuliert in MSA-Nanopartikeln (n=8), in der Rückenhautkammer verglichen. Bereits die reine Betrachtung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen der zwei Gruppen zeigte für „SR nativ“ ein fluoreszierendes Implantat an Tag 1, aber keine Fluoreszenz mehr ab Tag 2. Die Implantate der Gruppe „SR nano“ hingegen zeigten eine prolongierte Fluoreszenz, die auch an Tag 10 noch optisch sichtbar war.

Die quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität über den Implantaten (ROI 1) bei 50 ms zeigte in der Versuchsgruppe mit der Beschichtung aus SR 101 einen Abfall der Fluoreszenzintensität von durchschnittlich ca. 93 % im Laufe des ersten Tages. Die Fluoreszenzintensität der Implantate mit der Beschichtung aus Nanopartikeln hingegen fiel lediglich um ca. 1 % ab. Von Tag 2 bis Tag 10 konnte in „SR nativ“ keine Veränderung der Fluoreszenzintensität mehr beobachtet werden, da diese bereits im Bereich der Hintergrundfluoreszenz der Kammer lag. Die Fluoreszenzintensität in der Gruppe „SR nano“ fiel zwischen Tag 2 und Tag 10 durchschnittlich um 4 % pro Tag ab. Die Unterschiede im Abfall der Fluoreszenzintensität waren für den gesamten Versuchszeitraum statistisch signifikant.

Es kann daher geschlussfolgert werden, dass die Albumin-Nanopartikel die Präsenz des Fluoreszenzfarbstoffs im Implantat auf mindestens zehn Tage verlängerten.

Die Analyse der Fluoreszenzintensität der direkten Umgebung des Implantats in der Rückenhautkammer (ROI 2-5) und der Fluoreszenzintensität bei einer Belichtungszeit von 10 ms stützte diese Schlussfolgerung. Die explorative Analyse der Differenzen der Geradensteigung zeigte korrespondierende p-Werte auf niedrigem Niveau ($p \leq 0,01$), passend zu den signifikanten Ergebnissen bei 50 ms Belichtungszeit in der ROI 1. In der ROI 2-5 wurde für die Gruppe „SR nativ“ ein deutlicher Abfall der Fluoreszenzintensität von Tag 1 auf Tag 2 um ca. 89 % beobachtet. Die Gruppe „SR nano“ fiel um ca. 14 % von Tag 1 auf Tag 2 und um ca. 8 % pro Tag im restlichen Untersuchungszeitraum ab. Die Nanopartikel konnten die Fluoreszenz folglich nicht nur im Implantat, sondern auch in dessen direkter Umgebung verlängern, wenn auch zu einem geringeren Grad. Größere Unterschiede für die Schätzer der linearen Funktionen bei 10 ms Belichtungszeit traten nur für „SR nano“ am ersten Tag auf.

Die beschriebenen Unterschiede in den Schätzern der linearen Funktionen zwischen der ROI 1 und der ROI 2-5 sowie zwischen 50 ms und 10 ms können über folgende Mechanismen erklärt werden:

Die relativen Messwerte für die Analyse wurden auf Basis der Ausgangsfluoreszenz ermittelt, dementsprechend bedeuteten Veränderungen der absoluten Fluoreszenzintensität bei niedrigerer Ausgangsfluoreszenz wie in der ROI 2-5 und bei der Belichtungszeit von 10 ms einen höheren prozentualen Abfall der Fluoreszenzintensität im linearen gemischten Modell. Gleichzeitig konnte die absolute Fluoreszenz in den ROIs maximal auf das Niveau der Hintergrundfluoreszenz fallen, sodass die relative Fluoreszenzintensität bei einer niedrigeren Ausgangsfluoreszenz nicht so stark abfallen konnte wie bei einer höheren Ausgangsfluoreszenz. Weiterhin wurde die Fluoreszenzintensität durch das Intravitalmikroskop auf einer Skala zwischen 0 bis 4095 AU angegeben. Messwerte und Messwertveränderungen über 4095 AU konnten daher nur bis zu der Obergrenze der Skalierung des Mikroskops bei 4095 AU abgebildet werden. Dies betraf die Messreihe bei 50 ms Belichtungszeit vor allem in der ROI 1 bei „SR nano“ und „Etanercept nano“ an Tag 1.

Die berechneten Schätzer für den Zeitraum von Tag 1-2 basierten außerdem auf weniger Messwerten als die Schätzer von Tag 2-10 und waren daher anfälliger für Schwankungen. Dies stellte gemeinsam mit dem verringerten Stichprobenumfang für „SR nativ“ ($n=8$) und „SR nano“ ($n=6$) bei 10 ms Belichtungszeit (s. 6.1.4) eine weitere

Ursache für die größere Abweichung der Schätzer von Tag 1-2 bei 10 ms Belichtungszeit dar.

7.2.2 Effekte der Nanopartikel in der ersten Stunde nach PPE-Implantation

Die Fluoreszenzintensität in den Rückenhautkammern der beiden Versuchsgruppen wurde auch für die erste Stunde nach Implantation des PPE bei einer Belichtungszeit von 50 ms miteinander verglichen.

In der ROI 1 konnte ein signifikanter Unterschied im Abfall der Fluoreszenzintensität festgestellt werden, die Fluoreszenzintensität bei „SR nativ“ sank um durchschnittlich 0,44 % pro Minute ab, während sie sich bei „SR nano“ nicht änderte.

Die Messwerte in der ROI 2-5 bestätigten die Untersuchung in der ROI 1 mit einem durchschnittlichen Abfall der Fluoreszenzintensität von 0,46 % pro Minute in der Gruppe „SR nativ“ und einem Anstieg von 0,10 % pro Minute für die Gruppe „SR nano“. Durch Untersuchung dieses Zeitraumes konnte somit der die Präsenz des Fluoreszenzfarbstoffs verlängernde Effekt der nanopartikulären Enkapsulation nochmals nachgewiesen werden. Im Vergleich zeigte nicht enkapsuliertes SR 101 bereits einen in der ersten Stunde nach Implantation sichtbaren Abfall der Fluoreszenzintensität und veranschaulichte die geringe Halbwertszeit des nativen SR 101 im Gewebe.

7.2.3 Mikro- und Nanopartikel aus Albumin als DDS

Der rasche Abfall der Fluoreszenzintensität in der Gruppe des reinen SR 101 ist durch schnelle Diffusion und Abbau des Fluoreszenzfarbstoffs ähnlich wie bei Wachstumsfaktoren (Biondi et al., 2008, Quaglia, 2008, Chu and Wang, 2012) zu erklären. Wie bereits erwähnt weist SR 101 aufgrund seiner geringen Größe eine besonders hohe Diffusionsgeschwindigkeit auf (Einstein, 1905). Da die Präsenz von nachweisbarem Fluoreszenzfarbstoff durch die Nanopartikel verlängert wurde, ist davon auszugehen, dass diese den Abbau und die Diffusion des Farbstoffs einschränken konnten.

Die Freisetzung einer Substanz aus Mikro- oder Nanopartikeln ist grundsätzlich von der Desorption von an der Oberfläche gebundener oder adsorbierter Substanz, der Diffusion der Substanz durch die Partikelmatrix, dem Abbau der Matrix sowie der Kombination aus Diffusion und Matrixabbau abhängig. Die Unterscheidung von Nanosphären und Nanokapseln ist hierbei von Bedeutung: Bei Mikro- oder Nanosphären erfolgt eine schnelle Freisetzung (Burst) von schwach gebundener oder

adsorbierter Substanz der Oberfläche und eine langsamere Freisetzung von in der Matrix inkorporierter Substanz. Bei Mikro- oder Nanokapseln wird die Diffusion durch die Polymerhülle bestimmt. (Soppimath et al., 2001, Singh and Lillard, 2009)

Im Allgemeinen gilt für ein DDS, dass sich die Pharmakokinetik und Biodistribution des DDS aus der Pharmakokinetik und Biodistribution sowohl des Carriers als auch des Pharmakons zusammensetzen, wobei diese Eigenschaften davon abhängen, wie schnell das Pharmakon durch die Carriersubstanz freigesetzt wird. Bei einer sehr schnellen Freisetzung orientieren sich die Eigenschaften des DDS eher an denen des Pharmakons. Wenn hingegen die Freisetzung stark verlangsamt wird, liegen die Pharmakokinetik und Biodistribution eher im Bereich der Carriersubstanz. (Allen and Cullis, 2004)

In Mikro- und Nanopartikeln gilt folglich, dass die Kinetik durch die Diffusion des Pharmakons kontrolliert wird, falls die Diffusion schneller als der Abbau der Partikelmatrix abläuft. Ansonsten bestimmt der Matrixabbau die Kinetik. (Soppimath et al., 2001, Singh and Lillard, 2009)

Die Untersuchungen der verwendeten Albumin-Nanokapseln *in vitro* von Piradashvili et al. zeigten keinen Austritt von SR 101 aus den Nanopartikeln über 78 Tage. Die Albuminhülle verhinderte vollständig die Diffusion des Farbstoffs und blieb stabil. Unter Einfluss von Trypsin allerdings konnte die Kapsel enzymatisch abgebaut und das SR 101 aus den Partikeln freigesetzt werden. (Piradashvili et al., 2017, Piradashvili, 2018) Die Kinetik dieser Partikel wird entsprechend durch den Abbau der Albuminhülle bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Albumin-Nanopartikel ergänzend zu den *in vitro* Experimenten von Piradashvili et al. auch *in vivo* die Diffusion des SR 101 beschränkten und über mindestens zehn Tage die Präsenz des Fluoreszenzfarbstoffs im Gewebe aufrechterhielten. Es kann daher von einem enzymatischen Abbau der Partikel *in vivo* über mehrere Tage bis Wochen ausgegangen werden.

Zur Verlängerung der Freisetzung von Pharmaka wurde Albumin auch in anderen Experimenten als DDS in Form von Mikro- oder Nanopartikeln verwendet:

Reddy et al. testeten Albumin-Mikrosphären *in vitro* und beobachteten einen Burst von 40-70 % des Sulfadiazins während der ersten ein bis zwei Stunden. In den Stunden danach erfolgte die Freisetzung deutlich langsamer und am Ende des 24-stündigen

Versuchszeitraums war noch nicht die gesamte Menge freigesetzt worden. (Reddy et al., 1990)

Eine biphasische Freisetzung mit einem Burst wurde ebenfalls in den *in vitro* Untersuchungen von Arnedo et al. festgestellt, die kurzzeitig ein Oligonukleotid zur Therapie des Cytomegalovirus (CMV) vor enzymatischem Abbau schützen und dessen Aufnahme in den Zellkern steigern konnten. Allerdings waren die Partikel weniger als einen Tag stabil und konnten daher die Freisetzung nur für wenige Stunden kontrollieren. (Arnedo et al., 2002, Arnedo et al., 2004)

Zur Verbesserung der CMV-Therapie beluden Merodio et al. Albumin-Nanosphären mit Ganciclovir und beobachteten *in vitro* einen Burst in der ersten Stunde, gefolgt von einer langsameren Freisetzung über fünf Tage und einem konstanten Verlauf über insgesamt 30 Tage. Die Zugabe von Trypsin konnte die Freisetzung nur wenig steigern, was auf eine kovalente Bindung des Ganciclovirs an das Albumin durch den Crosslinker Glutaraldehyd zurückgeführt wurde. (Merodio et al., 2001)

Santhi et al. nutzten Albumin-Nanosphären als DDS für Amphotericin B und beobachteten *in vitro* eine Freisetzung von 46 % in den ersten 30 Minuten und von ca. 98 % nach 24 Stunden (Santhi et al., 1999). In einer anderen Studie wurde Aspirin als Pharmakon verwendet und die Freisetzung *in vitro* gemessen. Reines Aspirin erreichte innerhalb von 30 bis 60 Minuten die maximale Konzentration, wohingegen die Nanopartikel das Aspirin verzögert freisetzen und Konzentrationen von 50 % nach 20 Stunden sowie 90 % nach 72 Stunden erzielten. (Das and R, 2005)

All diesen Arbeiten ist gemeinsam, dass durch die Albumin-Nanopartikel eine verzögerte Freisetzung der verwendeten Pharmaka mit einem biphasischen Verlauf *in vitro* erzielt wird. Die genaue Kinetik variiert zwar abhängig von den Partikeln und der jeweiligen Substanz, der Abfall der Konzentrationen der Pharmaka erfolgt aber innerhalb von Stunden bis hin zu wenigen Tagen.

Wie bereits erwähnt findet die Vaskularisation von Implantaten innerhalb eines Zeitraums von mehreren Tagen bis Wochen statt (Menger et al., 1990, Steinhart et al., 1996, Druce et al., 2004, Laschke et al., 2005, Lindhorst et al., 2010). Zur Optimierung der Vaskularisation werden im Tissue Engineering angiogenetische Faktoren verwendet, die jedoch aufgrund zu geringer Halbwertszeiten *in vivo* nicht die gewünschten Erfolge erzielen können (Sabini et al., 2000, Yancopoulos et al., 2000, Gbureck et al., 2007, Santos and Reis, 2010, Chu and Wang, 2012, Auger et al., 2013) und ein DDS erfordern (Biondi et al., 2008, Quaglia,

2008, Chu and Wang, 2012). Für maximale Effekte auf die Vaskularisation von Implantaten erscheinen daher Partikel optimal, welche die Konzentration der enkapsulierten Substanzen über mehrere Tage bis Wochen, analog zur Dauer der Vaskularisation, aufrechterhalten können.

Die in den bisherigen Publikationen beschriebenen Albumin-Nanopartikel verlangsamten die Freisetzung der verwendeten Pharmaka für diese Indikation folglich nicht ausreichend. Im Vergleich dazu suggeriert die in dieser Arbeit ermittelte Kinetik eine längerfristige Präsenz kleinmolekularer Wirksubstanzen im Implantat und dem angrenzenden Gewebe und bietet sich im beschriebenen Kontext eher an.

Die Anwendung von Albumin-Nanopartikeln im Bereich des Tissue Engineerings wurde von Zhang et al. zur Modulation der Pharmakokinetik von BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) untersucht. Die Autoren nutzten anstatt des Crosslinkers Glutaraldehyd eine Beschichtung aus Polyethylenimin für die Partikel. Bei unbeschichteten Partikeln wurde in wenigen Stunden *in vitro* mehr als 80 % des BMP-2 freigesetzt, wohingegen die beschichteten Nanosphären eine deutlich langsamere Freisetzung abhängig von der Polyethylenimin-Konzentration zeigten. (Zhang et al., 2008)

Die Partikel wurden in einem weiteren Versuch als Beschichtung für eine Kollagenmatrix (absorbable collagen sponge/ACS) angewandt und subkutan in Ratten implantiert. Die Implantate wurden bei unterschiedlichen Tieren nach einem, vier und sieben Tagen entfernt und die Freisetzung von BMP-2 quantifiziert. Die unbeschichteten Nanopartikel setzten innerhalb eines Tages fast 80 % des BMP-2 frei, während die beschichteten Partikel einen langsameren Abfall aufwiesen. Wahrscheinlich begründet durch die Toxizität von Polyethylenimin zeigte sich bei den beschriebenen Implantaten kein Knochenwachstum. (Zhang et al., 2009)

Die Effekte von Albumin-Nanopartikeln auf andere Wachstumsfaktoren wurden von Khan et al. über 14 Tage für VEGF und Angiopoietin-I in Endothelzellkulturen getestet. Die Messungen erfolgten alle zwei Tage und zeigten eine schnellere Freisetzung der Substanzen in den ersten zwei Tagen im Vergleich zum restlichen Zeitraum. Am Versuchsende war 49 % des Angiopoietin-I und 59 % des VEGF freigesetzt worden. Es konnten starke proliferative und anti-apoptotische Effekte auf die Endothelzellen bei der kombinierten Freisetzung beider Substanzen beobachtet werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass *in vivo* Experimente der nächste Schritt zur Evaluation der Nanosphären in der therapeutischen Angiogenese seien. (Khan et al., 2011)

Zwar sind die beschriebenen Effekte von Khan et al. nicht ohne Weiteres auf eine Anwendung *in vivo* transponierbar. Dennoch lässt sich in Verbindung mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Aussagen zur verlängerten Präsenz des Fluoreszenzfarbstoffs die Vermutung anstellen, dass über einen verlängerten Wachstumsfaktor-Gradienten eine intensivierete Angiogenese bewirkt werden kann.

7.2.4 Mikro- und Nanopartikel aus anderen Materialien als DDS

Umfassender als Albumin-Nanopartikel sind andere Polymere als DDS im Tissue Engineering erforscht. Beim Vergleich der Effekte muss allerdings beachtet werden, dass verschiedene Ausgangssubstanzen für die Synthese von Mikro- und Nanopartikeln unterschiedlich schnell abgebaut werden und so die Freisetzung der Substanzen in den Partikeln beeinflussen (Nair and Laurencin, 2006, Ulery et al., 2011, Wurm and Weiss, 2014).

DDS aus natürlichen Polymeren wurden zum Beispiel von Tabata et al. zur kontrollierten Freisetzung von bFGF (basic fibroblast growth factor) aus Gelatin-Mikrosphären in subkutan platzierten Polyvinylalkohol-Implantaten bei Mäusen eingesetzt und bewirkten eine gesteigerte Vaskularisation gegenüber freiem bFGF (Tabata et al., 1999).

Quinlan et al. nutzten Alginat-Mikropartikel für die Freisetzung von VEGF in Kollagen-Hydroxyapatit-Implantaten und beobachteten *in vitro* einen initialen Burst, gefolgt von einer langsamer werdenden Freisetzung über vier Tage, der sich eine konstante Freisetzung für den restlichen Versuchszeitraum über insgesamt 35 Tage anschloss. *In vitro* konnte ein verstärkter Effekt der kontrollierten VEGF-Freisetzung auf Endothelzellen und *in vivo* eine gesteigerte Vaskularisation im Knochen von Ratten gezeigt werden. (Quinlan et al., 2017)

Nanokapseln aus Chitosan und Dextransulfat wurden von Itoh et al. mit bFGF beladen. Diese setzten *in vitro* 30 % des bFGF in den ersten Stunden frei. Am Ende des Versuchszeitraumes nach 72 Stunden wurde ferner eine Freisetzung von 75 % beschrieben. Die Nanokapseln mit bFGF zeigten verstärkte Effekte auf die Proliferation von Fibroblasten in Zellkulturen im Vergleich zu freiem bFGF. (Itoh et al., 2008)

Bei den synthetischen Polymeren zur Mikro- und Nanopartikelsynthese im Tissue Engineering dominiert als Material vor allem PLG, das als DDS in vielen Experimenten *in vitro* evaluiert wurde:

Mikrosphären aus PLG und PEG wurden von King und Patrick als DDS für VEGF eingesetzt, zeigten einen initialen Burst gefolgt von einer langsameren Freisetzung über 28 Tage und förderten die Proliferation von Endothelzellen (King and Patrick, 2000). Cleland et al. nutzten ebenfalls Mikrosphären aus PLG für VEGF und zeigten *in vitro* eine nahezu kontinuierliche Freisetzung über 21 Tage (Cleland et al., 2001). Die PLG-Mikrosphären mit VEGF von Karal-Yilmaz et al. wiesen einen Burst und dann eine fast konstante Freisetzung für bis zu 21 Tage auf (Karal-Yilmaz et al., 2011). Eine Mischung von PLG mit Poloxameren zur Synthese von Nanopartikeln wurde von d'Angelo et al. untersucht, die PDGF und FGF mit Albumin und Heparin als Stabilisatoren initial schnell und später kontinuierlich freisetzten (d'Angelo et al., 2010).

In vivo Untersuchungen von PLG-Mikrosphären mit bFGF führten Perets et al. an Ratten durch und konnten die Vaskularisation von Alginat-Implantaten steigern. Die *in vitro* Analyse offenbarte eine konstante Freisetzung nach einem Burst von 40 %, nach 8 Tagen waren 90 % des bFGF freigesetzt worden. (Perets et al., 2003)

Auch Sun et al. erreichten in Mäusen durch PLG-Mikrosphären mit VEGF eine verbesserte Vaskularisation, *in vitro* wurde 50 % des VEGF in drei Tagen und danach 1-3 % pro Tag über 30 Tage freigesetzt (Sun et al., 2005).

Mikrosphären aus PLG bewirkten ebenfalls in den Untersuchungen von Borselli et al. *in vitro* eine konstante Freisetzung von VEGF, das zusammen mit Albumin und Heparin in den Partikeln gebunden wurde. Im CAM (chorio-allantoic membrane) Assay wurde genauso wie in Endothelzellkulturen eine verstärkte Angiogenese beobachtet. (Borselli et al., 2010)

Kim und Burgess führten Experimente mit PLG-Mikrosphären und radioaktiv markiertem VEGF an Ratten durch, die zu festgelegten Zeitpunkten aus dem Versuch genommen und analysiert wurden. Subkutan appliziertes VEGF verschwand innerhalb von vier Stunden fast komplett aus dem Gewebe, wohingegen die Mikrosphären über sieben Wochen hohe Konzentrationen des VEGF ermöglichten. Die *in vivo* Freisetzung aus den Partikeln war im Vergleich zu den *in vitro* Messungen deutlich langsamer. Die Aktivität des VEGF war in Endothelzellkulturen bei Freisetzung durch die Mikrosphären allerdings um 25 % verringert, was die Autoren auf das saure Milieu durch den PLG-Abbau zurückführten. (Kim and Burgess, 2002)

Die Versuche von Ennett et al. mit PLG-Mikrosphären und VEGF als DDS in einem PLG-Implantat demonstrierten eine verzögerte Freisetzung sowohl *in vitro* als auch subkutan in Mäusen. Die Messung erfolgte über eine radioaktive Markierung des

VEGF und die Analyse der Implantate, die an definierten Daten aus den Tieren entfernt wurden. *In vivo* zeigte sich bei den Mikrosphären innerhalb der ersten 24 Stunden ein Burst von 27 % und im weiteren Verlauf eine Freisetzung von 1,8 % pro Tag über fünf Wochen. Ohne Mikrosphären lag der Burst bei 60 % und die Freisetzung danach bei 0,6 % pro Tag. Im Vergleich zu den *in vitro* Messwerten wurde *in vivo* eine schnellere Freisetzung festgestellt. Als problematisch wurden analog zu Kim und Burgess auch die sauren Abbauprodukte des PLG diskutiert, die auf die Faktoren in den Partikeln Einfluss nehmen können. (Ennett et al., 2006).

Mikro- und Nanopartikel aus verschiedenen primär synthetischen Materialien konnten bereits Erfolge als DDS im Tissue Engineering erzielen und die Konzentrationen von Substanzen mit ansonsten kurzer Halbwertszeit über einen längeren Zeitraum auf hohen Niveaus halten. Trotz effektiven Einflusses auf die Pharmakokinetik stellt die Toxizität bei Partikeln aus synthetischen Substanzen wie PLG oder PLA allerdings eine zentrale Limitation dar. So wird auch in weiteren Publikationen eine Instabilität freigesetzter Proteine (van de Weert et al., 2000) sowie eine inflammatorische Reaktion im Gewebe und eine Beeinträchtigung der Wundheilung (Li and Wozney, 2001, Nair and Laurencin, 2006, Zhang and Uludag, 2009, Luckachan and Pillai, 2011, Wurm and Weiss, 2014) durch die sauren Abbauprodukte der Polymere beschrieben. Albumin ist in dieser Hinsicht durch seine Biokompatibilität und den vollständigen Abbau im Gewebe den beschriebenen synthetischen Substanzen überlegen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Albumin-Nanopartikel eine hohe Konzentration der enkapsulierten Substanz über mehrere Tage aufrechterhalten werden kann. Der Vorteil des hierin verwendeten Modells gegenüber *in vitro* Untersuchungen der Effekte von Mikro- und Nanopartikeln auf die Kinetik von Substanzen liegt darin begründet, dass unter anderem die Immunantwort und der Einfluss körpereigener Enzyme mitberücksichtigt werden. Im Vergleich zu anderen *in vivo* Experimenten, die einmalige Analysen einzelner Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten verwenden, um die Kinetik von Mikro- und Nanopartikeln zu quantifizieren, ermöglicht die Fluoreszenzanalyse in der Rückenhautkammer die longitudinale, nichtinvasive Beobachtung der individuellen Mäuse über den gesamten Versuchszeitraum.

Insgesamt sind das Fehlen potenziell toxischer und pH-senkender Abbauprodukte bei gleichzeitig stabiler Enkapsulation *in vivo* als zentrale Vorteile des verwendeten Albumin-Carriersystems im Vergleich zu DDS auf Basis synthetischer Materialien

anzuführen. Direkte Effekte der Albumin-Nanopartikel auf die Vaskularisation des PPE wurden wie erwähnt im Umfang dieser Arbeit nicht untersucht.

7.3 Albumin-Nanopartikel beladen mit Etanercept

Im zweiten Teil der Arbeit wurden PPE-Implantate mit Etanercept oder mit Etanercept beladenen Albumin-Nanopartikeln beschichtet und wie im ersten Teil der Verlauf der Fluoreszenzintensität beider Gruppen über zehn Tage miteinander verglichen.

Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen zeigten bei beiden Gruppen eine optisch sichtbare Fluoreszenz der PPE-Implantate über den gesamten Versuchszeitraum. Infolgedessen kann unabhängig von der Versuchsgruppe auf eine relevante Konzentration des Etanercepts nach zehn Tagen geschlossen werden.

In der quantitativen Analyse wurde in der Region des Implantats, der ROI 1, bei 50 ms Belichtungszeit ein Abfall der Fluoreszenzintensität bei „Etanercept nativ“ von ca. 24 % von Tag 1 auf Tag 2 und von ca. 6 % pro Tag für Tag 2-10 errechnet. Die Fluoreszenzintensität bei „Etanercept nano“ fiel von Tag 1 auf Tag 2 um 8 % und um 5 % pro Tag für Tag 2-10. Es konnte allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden, weder für den Zeitraum von Tag 1-2 ($p=0,091$), noch für den Zeitraum von Tag 2-10 ($p=0,646$).

In der durch die ROI 2-5 repräsentierten direkten Implantatumgebung und bei 10 ms Belichtungszeit zeigten sich ebenfalls keine Anzeichen für einen Effekt der Albumin-Nanopartikel auf den Verlauf der Fluoreszenzintensität. Unterschiede im Vergleich zu 50 ms in der ROI 1 können, wie bei SR 101 und bei den absoluten Fluoreszenzintensitäten besprochen, ebenfalls mit den Effekten der unterschiedlichen Ausgangsfluoreszenz und der hinsichtlich der maximal messbaren Fluoreszenzintensität limitierten Skala begründet werden.

Insgesamt konnte folglich in den Untersuchungen mit Etanercept kein signifikanter Einfluss der Encapsulation in Nanopartikeln auf den Verlauf der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Nativsubstanz nachgewiesen werden. Angesichts der Ergebnisse bei der Encapsulation von Sulforhodamin 101 muss daher die Frage beantwortet werden, wieso kein signifikanter Effekt bei Etanercept gemessen werden konnte.

Der Vergleich des Verlaufs der Fluoreszenzintensität des nativen Sulforhodamins 101 und des nativen Etanercepts offenbart die deutlichen Unterschiede in Diffusion und Abbau der beiden Substanzen in vivo (s. 6.4 und 6.5).

SR 101 (606,71 Dalton, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 2019)) und Etanercept (ca.

150 kDa, (Pfizer Pharma GmbH, 2019)) unterscheiden sich massiv in ihrem molekularen Gewicht und ihrer Größe, die das Diffusionsverhalten entscheidend beeinflusst. Das große Etanercept diffundiert dementsprechend deutlich langsamer aus der Beschichtung des Implantats als das kleine SR 101.

Die Abhängigkeit der Freisetzung von Substanzen von ihrem Molekulargewicht wurde auch in diversen anderen Arbeiten festgestellt:

Schmidmaier et al. untersuchten für Metallimplantate eine Beschichtung aus PLA mit IGF-1 und TGF- β 1 und maßen *in vitro* in den ersten 48 Stunden eine Freisetzung von 54 % des IGF-1 und von 48 % des TGF- β 1. Die Unterschiede in der Freisetzung wurden auf das unterschiedliche Molekulargewicht von IGF-1 (7,5 kDa) und von TGF- β 1 (25 kDa) zurückgeführt. Bei der *in vivo* Messung nach 42 Tagen war von IGF-1 ein Anteil von 73 % und von TGF- β 1 ein Anteil von 68 % freigesetzt worden. (Schmidmaier et al., 2001)

Die Untersuchung der Pharmakokinetik von BMP-7 und TGF- β 2 in einem Alginat-Hydrogel zeigte eine Freisetzung von 70 % des BMP-7 und von 50 % des TGF- β 2 über 21 Tage. Der Unterschied zwischen den Substanzen wurde mit dem höheren molekularen Gewicht von TGF- β 2 begründet. (Lim et al., 2010)

Bei der Verwendung eines Albumin-Hydrogels als DDS wurde Natriumbenzoat und Salicylsäure innerhalb von zwei Stunden, Warfarin innerhalb von 24 Stunden und Antithrombin III innerhalb von 72 Stunden freigesetzt und die Differenzen ebenfalls auf die Größe der Substanzen zurückgeführt (Hirose et al., 2010).

Auch die Freisetzung von Naproxen, Actrapid und Levemir aus einem PEG-Albumin-Hydrogel wurde unter anderem durch das Molekulargewicht der Pharmaka bestimmt (Oss-Ronen and Seliktar, 2011).

Zusätzlich zu der langsameren Freisetzung aufgrund des hohen Molekulargewichts weist Etanercept eine lange Halbwertszeit *in vivo* von ca. 70 Stunden auf (Pfizer Pharma GmbH, 2019), während die Halbwertszeit von Albumin wie beschrieben bei ungefähr 19 Tagen liegt (Peters, 1985). Die Auswirkungen der Albumin-Nanopartikel auf die Pharmakokinetik des Etanercepts können folglich nur deutlich geringer als auf die Pharmakokinetik des SR 101 ausfallen. Die Messung von keinen signifikanten Unterschieden der Nanopartikel zum reinen Etanercept kann dementsprechend darauf zurückgeführt werden, dass der Unterschied im Rahmen der schwankenden Messwerte und über den zehntägigen Zeitraum zu klein war. Eine längere Versuchszeit oder ein Modell mit präziseren Messwerten könnten imstande sein, einen

Effekt nachzuweisen. Eine stärker verzögerte Freisetzung des Etanercepts könnte alternativ mit Carriersystemen aus Materialien gelingen, die langsamer als Albumin vom Körper abgebaut werden.

So konnten Erdemli et al. mit Mikrosphären aus PCL in Zellkulturen über vier Wochen eine langsamere Freisetzung von Etanercept und eine stärkere Suppression proinflammatorischer Zytokine im Vergleich zu freiem Etanercept bewirken (Erdemli et al., 2014). Allerdings ist auch hier die limitierte Übertragbarkeit der Ergebnisse im Vergleich zum *in vivo* Modell zu berücksichtigen.

Für die vergleichende Untersuchung enkapsulierter hochmolekularer Substanzen zeigte sich der verwendete Untersuchungszeitraum mit dem Modell der transparenten Rückenhautkammer und den verwendeten Messtechniken auf Grund der langen Halbwertszeiten als nur begrenzt aussagekräftig. Allenfalls am ersten Tag lieferte die Fluoreszenzkinetik einen Hinweis auf eine möglicherweise verzögerte Freisetzung, ohne ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen. Die durch Enkapsulation zu erzielenden Effekte hinsichtlich einer Prolongation der Substanzpräsenz sind nach den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen jedenfalls bei hochmolekularen Substanzen im Vergleich weit weniger offensichtlich als bei niedermolekularen Substanzen.

7.4 Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Albumin-Nanopartikel ein effektives Drug Delivery System für niedermolekulare Substanzen zur Oberflächenmodifikation von porösen Polyethylenimplantaten darstellen können. Zukünftig könnten in den Nanopartikeln beispielsweise Wachstumsfaktoren enkapsuliert und die Auswirkungen auf die Angiogenese und das Gewebewachstum im PPE untersucht werden.

Abschließend soll zur Vollständigkeit noch erwähnt werden, dass letztendlich eine erfolgreiche Vaskularisation im Tissue Engineering vermutlich am besten über eine Kombination mehrerer angiogenetischer Faktoren erzielt werden kann, analog zum natürlichen Ablauf. Dies zeigte sich in den bereits beschriebenen Untersuchungen von Khan et al. (Khan et al., 2011) und bildete auch die Prämisse für die Experimente anderer Forschungsgruppen. PLG-Mikrosphären wurden beispielsweise verwendet, um VEGF und PDGF (Richardson et al., 2001, Chen et al., 2007) oder VEGF und Angiopoietin (Brudno et al., 2013) zeitlich und räumlich voneinander getrennt freizusetzen und so die therapeutische Angiogenese zu optimieren. Vor dem

Hintergrund des in dieser Arbeit beschriebenen Einflusses der Albumin-Nanopartikel auf die Präsenz von Wirkstoffen *in vivo*, könnten die Partikel auch in dieser Hinsicht auf ihr Potential untersucht werden.

8. Zusammenfassung

Im Tissue Engineering werden zur Verbesserung der Pharmakokinetik bioaktiver Moleküle Drug Delivery Systeme wie Mikro- und Nanopartikel untersucht. Albumin zeichnet sich durch seine Biokompatibilität und Stabilität aus und stellt in diesem Zusammenhang ein hervorragendes Material dar.

In dieser Arbeit wurden daher Albumin-Nanopartikel als Drug Delivery System zur Oberflächenmodifikation von porösen Polyethylenimplantaten verwendet.

Zur Modellierung der Effekte der Nanopartikel auf die Pharmakokinetik wurden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt und die Veränderungen der Fluoreszenz beobachtet. In den Albumin-Nanopartikeln wurde Sulforhodamin 101 (n=8) als niedermolekulare Substanz oder Etanercept, gekoppelt an einen Fluorophor (n=8), als hochmolekulare Substanz enkapsuliert und auf die PPE-Implantate aufgebracht. Als Kontrollgruppen dienten Implantate ohne Nanopartikel mit einer Beschichtung aus reinem Sulforhodamin 101 (n=9) oder aus reinem Etanercept (n=8). Das beschichtete PPE wurde in eine transparente Rückenhautkammer von Mäusen implantiert und die Fluoreszenz in der Kammer täglich über einen Zeitraum von 10 Tagen mit einem Intravitalmikroskop gemessen.

Während die Fluoreszenz in den Implantaten mit der Beschichtung aus reinem Sulforhodamin 101 innerhalb eines Tages komplett abfiel, zeigten die Implantate mit der Nanopartikelbeschichtung auch nach zehn Tagen noch eine deutliche Fluoreszenz. In der statistischen Analyse konnte ein signifikant verzögerter Abfall der Fluoreszenz durch die Verwendung der Albumin-Nanopartikel nachgewiesen werden. Die genauere Betrachtung der ersten Stunde nach Implantation des PPE konnte ebenfalls schon einen statistisch signifikanten Unterschied im Fluoreszenzverlauf der beiden Gruppen zeigen. Durch die Beschichtung mit Albumin-Nanopartikeln konnte folglich die Diffusion des Sulforhodamins 101 und dessen enzymatischer Abbau kontrolliert und eine hohe Konzentration des Farbstoffs im Implantat und dessen direkter Umgebung über mindestens zehn Tage erzielt werden.

Die PPE-Implantate mit einer Beschichtung aus Albumin-Nanopartikeln mit Etanercept wiesen hingegen keinen statistisch signifikanten Unterschied im Fluoreszenzverlauf zu den Implantaten auf, die nur mit reinem Etanercept beschichtet wurden. Dies wurde auf die Eigenschaften von Etanercept zurückgeführt, das auch ohne Nanopartikel aufgrund seiner Größe vergleichsweise langsam diffundiert und eine lange Halbwertszeit aufweist. Der Einfluss der Albumin-Nanopartikel auf die

Pharmakokinetik von Etanercept ist daher begrenzt, sodass sich keine Effekte über zehn Tage zeigten.

Als Fazit konnte festgestellt werden, dass sich Albumin-Nanopartikel als Drug Delivery System für niedermolekulare Substanzen zur Oberflächenmodifikation von porösen Polyethylenimplantaten anbieten. Eine Evaluation der biologischen Wirksamkeit der Nanopartikel auf die Integration und Vaskularisation der Implantate könnte den nächsten Schritt der Entwicklung darstellen.

9. Literaturverzeichnis

- ALGIRE, G. H. 1943. An Adaptation of the Transparent-Chamber Technique to the Mouse. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 4, 1-11.
- ALLEN, T. M. & CULLIS, P. R. 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303, 1818-22.
- AMASS, W., AMASS, A. & TIGHE, B. 1998. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International*, 47, 89-144.
- AN, F. F. & ZHANG, X. H. 2017. Strategies for Preparing Albumin-based Nanoparticles for Multifunctional Bioimaging and Drug Delivery. *Theranostics*, 7, 3667-3689.
- ANDERSON, J. M., RODRIGUEZ, A. & CHANG, D. T. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*, 20, 86-100.
- ANDERSON, S. M., SIEGMAN, S. N. & SEGURA, T. 2011. The effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) presentation within fibrin matrices on endothelial cell branching. *Biomaterials*, 32, 7432-43.
- ARNEDO, A., ESPUELAS, S. & IRACHE, J. M. 2002. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int J Pharm*, 244, 59-72.
- ARNEDO, A., IRACHE, J. M., MERODIO, M. & ESPUELAS MILLAN, M. S. 2004. Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide. *J Control Release*, 94, 217-27.
- ARSHADY, R. 1990. Albumin microspheres and microcapsules: Methodology of manufacturing techniques. *Journal of Controlled Release*, 14, 111-131.
- ASAISHI, K., ENDRICH, B., GOTZ, A. & MESSMER, K. 1981. Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res*, 41, 1898-904.
- AUGER, F. A., GIBOT, L. & LACROIX, D. 2013. The pivotal role of vascularization in tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*, 15, 177-200.
- BAE, S., MA, K., KIM, T. H., LEE, E. S., OH, K. T., PARK, E. S., LEE, K. C. & YOUN, Y. S. 2012. Doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles surface-modified with TNF-related apoptosis-inducing ligand and transferrin for targeting multiple tumor types. *Biomaterials*, 33, 1536-46.
- BERGHAUS, A. 1985. Porous polyethylene in reconstructive head and neck surgery. *Arch Otolaryngol*, 111, 154-60.
- BERGHAUS, A., AXHAUSEN, M. & HANDROCK, M. 1983. [Porous synthetic materials in external ear reconstruction]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*, 62, 320-7.
- BERGHAUS, A., MULCH, G. & HANDROCK, M. 1984. Porous polyethylene and proplast: their behavior in a bony implant bed. *Arch Otorhinolaryngol*, 240, 115-23.
- BERGHAUS, A. & STELTER, K. 2006. Alloplastic materials in rhinoplasty. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 14, 270-7.
- BERGHAUS, A., STELTER, K., NAUMANN, A. & HEMPEL, J. M. 2010. Ear reconstruction with porous polyethylene implants. *Adv Otorhinolaryngol*, 68, 53-64.
- BHUSHAN, B., KHANADEEV, V., KHLEBTSOV, B., KHLEBTSOV, N. & GOPINATH, P. 2017. Impact of albumin based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery. *Adv Colloid Interface Sci*, 246, 13-39.
- BIGHAM, W. J., STANLEY, P., CAHILL, J. M., JR., CURRAN, R. W. & PERRY, A. C. 1999. Fibrovascular ingrowth in porous ocular implants: the effect of material composition, porosity, growth factors, and coatings. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*, 15, 317-25.
- BIONDI, M., UNGARO, F., QUAGLIA, F. & NETTI, P. A. 2008. Controlled drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 229-42.
- BORSELLI, C., UNGARO, F., OLIVIERO, O., D'ANGELO, I., QUAGLIA, F., LA ROTONDA, M. I. & NETTI, P. A. 2010. Bioactivation of collagen matrices through sustained VEGF release from PLGA microspheres. *J Biomed Mater Res A*, 92, 94-102.

- BOULAFTALI, Y., LAMRANI, L., ROUZAUD, M. C., LOYAU, S., JANDROT-PERRUS, M., BOUTON, M. C. & HO-TIN-NOE, B. 2012. The mouse dorsal skinfold chamber as a model for the study of thrombolysis by intravital microscopy. *Thromb Haemost*, 107, 962-71.
- BRUDNO, Y., ENNETT-SHEPARD, A. B., CHEN, R. R., AIZENBERG, M. & MOONEY, D. J. 2013. Enhancing microvascular formation and vessel maturation through temporal control over multiple pro-angiogenic and pro-maturation factors. *Biomaterials*, 34, 9201-9.
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG. 2020. *3R-Prinzip* [Online]. Available: https://www.bfr.bund.de/de/3r_prinzip-193970.html [Accessed 12.04.2020 2020].
- CARDON, S. Z., OESTERMEYER, C. F. & BLOCH, E. H. 1970. Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res*, 2, 67-76.
- CARMELIET, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6, 389-95.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473, 298-307.
- CENZI, R., FARINA, A., ZUCCARINO, L. & CARINCI, F. 2005. Clinical outcome of 285 Medpor grafts used for craniofacial reconstruction. *J Craniofac Surg*, 16, 526-30.
- CHEN, B., HE, X. Y., YI, X. Q., ZHUO, R. X. & CHENG, S. X. 2015a. Dual-peptide-functionalized albumin-based nanoparticles with pH-dependent self-assembly behavior for drug delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*, 7, 15148-53.
- CHEN, Q., LIANG, C., WANG, C. & LIU, Z. 2015b. An imagable and photothermal "Abraxane-like" nanodrug for combination cancer therapy to treat subcutaneous and metastatic breast tumors. *Adv Mater*, 27, 903-10.
- CHEN, R. R., SILVA, E. A., YUEN, W. W. & MOONEY, D. J. 2007. Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation. *Pharm Res*, 24, 258-64.
- CHIU, Y. C., CHENG, M. H., ENGEL, H., KAO, S. W., LARSON, J. C., GUPTA, S. & BREY, E. M. 2011. The role of pore size on vascularization and tissue remodeling in PEG hydrogels. *Biomaterials*, 32, 6045-51.
- CHO, J. J., TAYLOR, R. C., DEUTSCHMANN, M. W., CHANDARANA, S. P. & MARCK, P. A. 2013. Polyethylene implants in nasal septal restoration. *JAMA Facial Plast Surg*, 15, 275-9.
- CHU, H. & WANG, Y. 2012. Therapeutic angiogenesis: controlled delivery of angiogenic factors. *Ther Deliv*, 3, 693-714.
- CHUNG, Y. I., KIM, S. K., LEE, Y. K., PARK, S. J., CHO, K. O., YUK, S. H., TAE, G. & KIM, Y. H. 2010. Efficient revascularization by VEGF administration via heparin-functionalized nanoparticle-fibrin complex. *J Control Release*, 143, 282-9.
- CLELAND, J. L., DUENAS, E. T., PARK, A., DAUGHERTY, A., KAHN, J., KOWALSKI, J. & CUTHBERTSON, A. 2001. Development of poly-(D,L-lactide--glycolide) microsphere formulations containing recombinant human vascular endothelial growth factor to promote local angiogenesis. *J Control Release*, 72, 13-24.
- CLOWES, A. W., GOWN, A. M., HANSON, S. R. & REIDY, M. A. 1985. Mechanisms of arterial graft failure. 1. Role of cellular proliferation in early healing of PTFE prostheses. *Am J Pathol*, 118, 43-54.
- CRANMER, L. D. 2019. Spotlight on doxorubicin (INNO-206) and its potential in the treatment of soft tissue sarcomas: evidence to date. *Onco Targets Ther*, 12, 2047-2062.
- D'ANGELO, I., GARCIA-FUENTES, M., PARAJO, Y., WELLE, A., VANTUS, T., HORVATH, A., BOKONYI, G., KERI, G. & ALONSO, M. J. 2010. Nanoparticles based on PLGA:poloxamer blends for the delivery of proangiogenic growth factors. *Mol Pharm*, 7, 1724-33.
- DADPARVAR, M., WAGNER, S., WIEN, S., KUFLEITNER, J., WOREK, F., VON BRIESEN, H. & KREUTER, J. 2011. HI 6 human serum albumin nanoparticles--development and transport over an in vitro blood-brain barrier model. *Toxicol Lett*, 206, 60-6.
- DAS, S. & R, B. 2005. Aspirin loaded albumin nanoparticles by coacervation: Implications in drug delivery. *Artif Organs*, 2005; 18(2):203-1., 18, 203.

- DENNIS, M. S., ZHANG, M., MENG, Y. G., KADKHODAYAN, M., KIRCHHOFER, D., COMBS, D. & DAMICO, L. A. 2002. Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J Biol Chem*, 277, 35035-43.
- DESAI, N., TRIEU, V., DAMASCELLI, B. & SOON-SHIONG, P. 2009. SPARC Expression Correlates with Tumor Response to Albumin-Bound Paclitaxel in Head and Neck Cancer Patients. *Transl Oncol*, 2, 59-64.
- DESAI, N., TRIEU, V., YAO, Z., LOUIE, L., CI, S., YANG, A., TAO, C., DE, T., BEALS, B., DYKES, D., NOKER, P., YAO, R., LABAO, E., HAWKINS, M. & SOON-SHIONG, P. 2006. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 12, 1317-24.
- DITZ, F. 2018. *Tissue Engineering mit porösen Polyethylenimplantaten: Effekte einer Beschichtung mit Etanercept auf die Integration in vivo*. Dissertation, LMU München.
- DROR, Y., ZIV, T., MAKAROV, V., WOLF, H., ADMON, A. & ZUSSMAN, E. 2008. Nanofibers made of globular proteins. *Biomacromolecules*, 9, 2749-54.
- DRUECKE, D., LANGER, S., LAMME, E., PIEPER, J., UGARKOVIC, M., STEINAU, H. U. & HOMANN, H. H. 2004. Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A*, 68, 10-8.
- ECKARDT, H., DING, M., LIND, M., HANSEN, E. S., CHRISTENSEN, K. S. & HVID, I. 2005. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br*, 87, 1434-8.
- ECKRICH, J., BECKER, S., BRIEGER, J. & STRIETH, S. 2015. Präparation der transparenten Rückenhautkammer (unveröffentlicht). Universitätsmedizin Mainz.
- EHRMANTRAUT, S., LASCHKE, M. W., MERKEL, D., SCHEUER, C., WILLNECKER, V., MEYER-LINDENBERG, A., MENGER, M. D. & NAUMANN, A. 2010. Perioperative steroid administration inhibits angiogenic host tissue response to porous polyethylene (Medpor) implants. *Eur Cell Mater*, 19, 107-16.
- EINSTEIN, A. 1905. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 322, 549-560.
- ELSADEK, B. & KRATZ, F. 2012. Impact of albumin on drug delivery--new applications on the horizon. *J Control Release*, 157, 4-28.
- ELZOGHBY, A. O., SAMY, W. M. & ELGINDY, N. A. 2012. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release*, 157, 168-82.
- ENDRICH, B., ASAISHI, K., GOTZ, A. & MESSMER, K. 1980. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)*, 177, 125-34.
- ENNETT, A. B., KAIGLER, D. & MOONEY, D. J. 2006. Temporally regulated delivery of VEGF in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*, 79, 176-84.
- ERDEMLI, O., OZEN, S., KESKIN, D., USANMAZ, A., BATU, E. D., ATILLA, B. & TEZCANER, A. 2014. In vitro evaluation of effects of sustained anti-TNF release from MPEG-PCL-MPEG and PCL microspheres on human rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Biomater Appl*, 29, 524-42.
- FANOUS, N., TOURNAS, A., COTE, V., ALI, Y., BERBARI, P., FANOUS, A. & CAMPAGNA-VAILLANCOURT, M. 2017. Soft and Firm Alloplastic Implants in Rhinoplasty: Why, When and How to Use Them: A Review of 311 Cases. *Aesthetic Plast Surg*, 41, 397-412.
- FASANO, M., CURRY, S., TERRENO, E., GALLIANO, M., FANALI, G., NARCISO, P., NOTARI, S. & ASCENZI, P. 2005. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*, 57, 787-96.
- FIEHN, C., NEUMANN, E., WUNDER, A., KRIENKE, S., GAY, S. & MULLER-LADNER, U. 2004. Methotrexate (MTX) and albumin coupled with MTX (MTX-HSA) suppress synovial fibroblast invasion and cartilage degradation in vivo. *Ann Rheum Dis*, 63, 884-6.
- FOLKMAN, J. & HOCHBERG, M. 1973. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*, 138, 745-53.

- FU, Y. C., NIE, H., HO, M. L., WANG, C. K. & WANG, C. H. 2008. Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2. *Biotechnol Bioeng*, 99, 996-1006.
- GANDHI, S. J., BABU, S., SUBRAMANYAM, P. & SHANMUGA SUNDARAM, P. 2013. Tc-99m macro aggregated albumin scintigraphy - indications other than pulmonary embolism: A pictorial essay. *Indian J Nucl Med*, 28, 152-62.
- GAYAKWAD, S. G., BEJUGAM, N. K., AKHAVEIN, N., UDDIN, N. A., OETTINGER, C. E. & D'SOUZA, M. J. 2009. Formulation and in vitro characterization of spray-dried antisense oligonucleotide to NF-kappaB encapsulated albumin microspheres. *J Microencapsul*, 26, 692-700.
- GBURECK, U., HOELZEL, T., DOILLON, C., MÜLLER, F. & BARRALET, J. 2007. Direct Printing of Bioceramic Implants with Spatially Localized Angiogenic Factors. *Advanced Materials*, 19, 795-800.
- GEIGER, F., LORENZ, H., XU, W., SZALAY, K., KASTEN, P., CLAES, L., AUGAT, P. & RICHTER, W. 2007. VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone*, 41, 516-22.
- GERARD, C., BORDELEAU, L. J., BARRALET, J. & DOILLON, C. J. 2010. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials*, 31, 824-31.
- GHANAATI, S., WEBBER, M. J., UNGER, R. E., ORTH, C., HULVAT, J. F., KIEHNA, S. E., BARBECK, M., RASIC, A., STUPP, S. I. & KIRKPATRICK, C. J. 2009. Dynamic in vivo biocompatibility of angiogenic peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials*, 30, 6202-12.
- GOLDBERG, R. A., DRESNER, S. C., BRASLOW, R. A., KOSSOVSKY, N. & LEGMANN, A. 1994. Animal model of porous polyethylene orbital implants. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*, 10, 104-9.
- GOMMANS, G. M., GOMMANS, E., VAN DER ZANT, F. M., TEULE, G. J., VAN DER SCHORS, T. G. & DE WAARD, J. W. 2009. 99mTc Nanocoll: a radiopharmaceutical for sentinel node localisation in breast cancer--in vitro and in vivo results. *Appl Radiat Isot*, 67, 1550-8.
- GOSAU, M., SCHIEL, S., DRAENERT, G. F., IHRLER, S., MAST, G. & EHRENFELD, M. 2006. [Craniofacial augmentation with porous polyethylene implants (Medpor: first clinical results)]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 10, 178-84.
- GRADISHAR, W. J. 2006. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother*, 7, 1041-53.
- HAWKINS, M. J., SOON-SHIONG, P. & DESAI, N. 2008. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 876-85.
- HEISE, T. & MATHIEU, C. 2017. Impact of the mode of protraction of basal insulin therapies on their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and resulting clinical outcomes. *Diabetes Obes Metab*, 19, 3-12.
- HIROSE, M., TACHIBANA, A. & TANABE, T. 2010. Recombinant human serum albumin hydrogel as a novel drug delivery vehicle. *Materials Science and Engineering: C*, 30, 664-669.
- HOLLAND, T. A. & MIKOS, A. G. 2006. Biodegradable polymeric scaffolds. Improvements in bone tissue engineering through controlled drug delivery. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 102, 161-85.
- HOME, P. & KURTZHALS, P. 2006. Insulin detemir: from concept to clinical experience. *Expert Opin Pharmacother*, 7, 325-43.
- HOMSY, C. A. 1970. Bio-compatibility in selection of materials for implantation. *J Biomed Mater Res*, 4, 341-56.
- HU, S. H., CHEN, S. Y. & GAO, X. 2012. Multifunctional nanocapsules for simultaneous encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds and on-demand release. *ACS Nano*, 6, 2558-65.
- IRACHE, J. M., MERODIO, M., ARNEDO, A., CAMAPANERO, M. A., MIRSHAHI, M. & ESPUELAS, S. 2005. Albumin nanoparticles for the intravitreal delivery of anticytomegaloviral drugs. *Mini Rev Med Chem*, 5, 293-305.
- ISHIZAKA, S., NAKATANI, K., HABUCHI, S. & KITAMURA, N. 1998. Total Internal Reflection Fluorescence Dynamic Anisotropy of Sulforhodamine 101 at a Liquid/Liquid Interface: Rotational Reorientation Times and Interfacial Structures. *Analytical Chemistry - ANAL CHEM*, 71.

- ITOH, Y., MATSUSAKI, M., KIDA, T. & AKASHI, M. 2008. Locally controlled release of basic fibroblast growth factor from multilayered capsules. *Biomacromolecules*, 9, 2202-6.
- JANSE VAN RENSBURG, A., DAVIES, N. H., OOSTHUYSEN, A., CHOKOZA, C., ZILLA, P. & BEZUIDENHOUT, D. 2017. Improved vascularization of porous scaffolds through growth factor delivery from heparinized polyethylene glycol hydrogels. *Acta Biomater*, 49, 89-100.
- JIANG, Y. & STENZEL, M. 2016. Drug Delivery Vehicles Based on Albumin-Polymer Conjugates. *Macromol Biosci*, 16, 791-802.
- KARAL-YILMAZ, O., SERHATLI, M., BAYSAL, K. & BAYSAL, B. M. 2011. Preparation and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres using a double emulsion/solvent evaporation technique. *J Microencapsul*, 28, 46-54.
- KARIMI, M., BAHRAMI, S., RAVARI, S. B., ZANGABAD, P. S., MIRSHAKARI, H., BOZORGOMID, M., SHAHREZA, S., SORI, M. & HAMBLIN, M. R. 2016. Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*, 13, 1609-1623.
- KERSTEN, E. 2016. *Nanocarrier systems for implants made of porous poly(ethylene) (unveröffentlicht)*. Master of Science, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- KHADEMHOSEINI, A. & LANGER, R. 2016. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc*, 11, 1775-81.
- KHAN, A. A., PAUL, A., ABBASI, S. & PRAKASH, S. 2011. Mitotic and antiapoptotic effects of nanoparticles coencapsulating human VEGF and human angiopoietin-1 on vascular endothelial cells. *Int J Nanomedicine*, 6, 1069-81.
- KHANDELIA, R., BHANDARI, S., PAN, U. N., GHOSH, S. S. & CHATTOPADHYAY, A. 2015. Gold Nanocluster Embedded Albumin Nanoparticles for Two-Photon Imaging of Cancer Cells Accompanying Drug Delivery. *Small*, 11, 4075-81.
- KIM, H. S., PARK, S. S., KIM, M. H., KIM, M. S., KIM, S. K. & LEE, K. C. 2014. Problems associated with alloplastic materials in rhinoplasty. *Yonsei Med J*, 55, 1617-23.
- KIM, T. K. & BURGESS, D. J. 2002. Pharmacokinetic characterization of ¹⁴C-vascular endothelial growth factor controlled release microspheres using a rat model. *J Pharm Pharmacol*, 54, 897-905.
- KING, T. W. & PATRICK, C. W., JR. 2000. Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique. *J Biomed Mater Res*, 51, 383-90.
- KLAWITTER, J. J., BAGWELL, J. G., WEINSTEIN, A. M. & SAUER, B. W. 1976. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. *J Biomed Mater Res*, 10, 311-23.
- KNUDSEN, L. B. & LAU, J. 2019. The Discovery and Development of Liraglutide and Semaglutide. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 155.
- KOIKE, N., FUKUMURA, D., GRALLA, O., AU, P., SCHECHNER, J. S. & JAIN, R. K. 2004. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature*, 428, 138-9.
- KRATZ, F. 2008. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release*, 132, 171-83.
- KUNDRANDA, M. N. & NIU, J. 2015. Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: clinical development and future directions. *Drug Des Devel Ther*, 9, 3767-77.
- LANDFESTER, K. 2009. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 4488-507.
- LANDFESTER, K., MUSYANOVYCH, A. & MAILÄNDER, V. 2010. From Polymeric Particles to Multifunctional Nanocapsules for Biomedical Applications Using the Miniemulsion Process. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, v.48, 493-515 (2010), 48.
- LANGER, R. 1990. New methods of drug delivery. *Science*, 249, 1527-33.
- LANGER, R. 1998. Drug delivery and targeting. *Nature*, 392, 5-10.
- LANGER, R. & VACANTI, J. P. 1993. Tissue engineering. *Science*, 260, 920-6.
- LASCHKE, M. W., HARDER, Y., AMON, M., MARTIN, I., FARHADI, J., RING, A., TORIO-PADRON, N., SCHRAMM, R., RUCKER, M., JUNKER, D., HAUFEL, J. M., CARVALHO, C., HEBERER, M.,

- GERMANN, G., VOLLMAR, B. & MENGER, M. D. 2006. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng*, 12, 2093-104.
- LASCHKE, M. W., HAUFEL, J. M., THORLACIUS, H. & MENGER, M. D. 2005. New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *J Biomed Mater Res A*, 74, 696-704.
- LASCHKE, M. W. & MENGER, M. D. 2012. Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res*, 48, 85-92.
- LASCHKE, M. W., MUSSAWY, H., SCHULER, S., EGLIN, D., ALINI, M. & MENGER, M. D. 2010. Promoting external inosculation of prevascularised tissue constructs by pre-cultivation in an angiogenic extracellular matrix. *Eur Cell Mater*, 20, 356-66.
- LASCHKE, M. W., RUCKER, M., JENSEN, G., CARVALHO, C., MULHAUPT, R., GELLRICH, N. C. & MENGER, M. D. 2008a. Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Ann Surg*, 248, 939-48.
- LASCHKE, M. W., RUCKER, M., JENSEN, G., CARVALHO, C., MULHAUPT, R., GELLRICH, N. C. & MENGER, M. D. 2008b. Incorporation of growth factor containing Matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 85, 397-407.
- LASCHKE, M. W., SCHANK, T. E., SCHEUER, C., KLEER, S., SCHULER, S., METZGER, W., EGLIN, D., ALINI, M. & MENGER, M. D. 2013. Three-dimensional spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells are potent initiators of blood vessel formation in porous polyurethane scaffolds. *Acta Biomater*, 9, 6876-84.
- LASCHKE, M. W., STROHE, A., SCHEUER, C., EGLIN, D., VERRIER, S., ALINI, M., POHLEMANN, T. & MENGER, M. D. 2009. In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater*, 5, 1991-2001.
- LASCHKE, M. W., VOLLMAR, B. & MENGER, M. D. 2011. The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater*, 22, 147-64; discussion 164-7.
- LEE, E. & YOUN, Y. 2016. Albumin-based potential drugs: focus on half-life extension and nanoparticle preparation. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46.
- LEE, E. J., LEE, N. K. & KIM, I. S. 2016. Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 106, 157-171.
- LEE, S., MARONIAN, N., MOST, S. P., WHIPPLE, M. E., MCCULLOCH, T. M., STANLEY, R. B. & FARWELL, D. G. 2005. Porous high-density polyethylene for orbital reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 131, 446-50.
- LEHR, H. A., LEUNIG, M., MENGER, M. D., NOLTE, D. & MESSMER, K. 1993. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol*, 143, 1055-62.
- LI, J. M., CHEN, W., WANG, H., JIN, C., YU, X. J., LU, W. Y., CUI, L., FU, D. L., NI, Q. X. & HOU, H. M. 2009. Preparation of albumin nanospheres loaded with gemcitabine and their cytotoxicity against BXP-3 cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 30, 1337-43.
- LI, R. H. & WOZNEY, J. M. 2001. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol*, 19, 255-65.
- LI, Z., XU, F., LI, Q., LIU, S., WANG, H., MOHWALD, H. & CUI, X. 2015a. Synthesis of multifunctional bovine serum albumin microcapsules by the sonochemical method for targeted drug delivery and controlled drug release. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 136, 470-8.
- LI, Z., YANG, T., LIN, C., LI, Q., LIU, S., XU, F., WANG, H. & CUI, X. 2015b. Sonochemical Synthesis of Hydrophilic Drug Loaded Multifunctional Bovine Serum Albumin Nanocapsules. *ACS Appl Mater Interfaces*, 7, 19390-7.
- LIM, S. M., OH, S. H., LEE, H. H., YUK, S. H., IM, G. I. & LEE, J. H. 2010. Dual growth factor-releasing nanoparticle/hydrogel system for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*, 21, 2593-600.
- LIN, W., GARNETT, M. C., DAVIES, M. C., BIGNOTTI, F., FERRUTI, P., DAVIS, S. S. & ILLUM, L. 1997. Preparation of surface-modified albumin nanospheres. *Biomaterials*, 18, 559-65.

- LINDHORST, D., TAVASSOL, F., VON SEE, C., SCHUMANN, P., LASCHKE, M. W., HARDER, Y., BORMANN, K. H., ESSIG, H., KOKEMULLER, H., KAMPMANN, A., VOSS, A., MULHAUPT, R., MENGER, M. D., GELLRICH, N. C. & RUCKER, M. 2010. Effects of VEGF loading on scaffold-confined vascularization. *J Biomed Mater Res A*, 95, 783-92.
- LIU, F., MU, J. & XING, B. 2015. Recent advances on the development of pharmacotherapeutic agents on the basis of human serum albumin. *Curr Pharm Des*, 21, 1866-88.
- LIU, H., MOYNIHAN, K. D., ZHENG, Y., SZETO, G. L., LI, A. V., HUANG, B., VAN EGEREN, D. S., PARK, C. & IRVINE, D. J. 2014. Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines. *Nature*, 507, 519-22.
- LIU, Z., JIAO, Y., WANG, Y., ZHOU, C. & ZHANG, Z. 2008. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 1650-62.
- LOUREIRO, A., AZOIA, N. G., GOMES, A. C. & CAVACO-PAULO, A. 2016. Albumin-Based Nanodevices as Drug Carriers. *Curr Pharm Des*, 22, 1371-90.
- LUCKACHAN, G. E. & PILLAI, C. K. S. 2011. Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 637-676.
- LYSENG-WILLIAMSON, K. A. 2017. Coagulation Factor IX (Recombinant), Albumin Fusion Protein (Albutrepenonacog Alfa; Idelvion((R))): A Review of Its Use in Haemophilia B. *Drugs*, 77, 97-106.
- MA, Z., GAO, C., GONG, Y. & SHEN, J. 2005. Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 26, 1253-9.
- MACHADO, M. J. & MITCHELL, C. A. 2011. Temporal changes in microvessel leakiness during wound healing discriminated by in vivo fluorescence recovery after photobleaching. *J Physiol*, 589, 4681-96.
- MAO, Z., SHI, H., GUO, R., MA, L., GAO, C., HAN, C. & SHEN, J. 2009. Enhanced angiogenesis of porous collagen scaffolds by incorporation of TMC/DNA complexes encoding vascular endothelial growth factor. *Acta Biomater*, 5, 2983-94.
- MARTÍNEZ, A., IGLESIAS, I., LOZANO, R., TEIJÓN, J. M. & BLANCO, M. D. 2011. Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers - CARBOHYD POLYM*, 83, 1311-1321.
- MENDELSON, M. 2005. Straightening the crooked middle third of the nose: using porous polyethylene extended spreader grafts. *Arch Facial Plast Surg*, 7, 74-80.
- MENGER, M. D., HAMMERSEN, F., WALTER, P. & MESSMER, K. 1990. Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg*, 38, 139-45.
- MERODIO, M., ARNEDO, A., RENEDO, M. J. & IRACHE, J. M. 2001. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eur J Pharm Sci*, 12, 251-9.
- MERODIO, M., IRACHE, J. M., VALAMANESH, F. & MIRSHAHI, M. 2002. Ocular disposition and tolerance of ganciclovir-loaded albumin nanoparticles after intravitreal injection in rats. *Biomaterials*, 23, 1587-94.
- MERONI, P. L. & VALESINI, G. 2014. Tumour necrosis factor alpha antagonists in the treatment of rheumatoid arthritis: an immunological perspective. *BioDrugs*, 28 Suppl 1, S5-13.
- MOHAMMADI, S., GHOURCHIAN, S., IZADI, F., DANESHI, A. & AHMADI, A. 2012. Porous high-density polyethylene in facial reconstruction and revision rhinoplasty: a prospective cohort study. *Head Face Med*, 8, 17.
- MOIOLI, E. K., CLARK, P. A., CHEN, M., DENNIS, J. E., ERICKSON, H. P., GERSON, S. L. & MAO, J. J. 2008. Synergistic actions of hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in vascularizing bioengineered tissues. *PLoS One*, 3, e3922.
- MONTEIRO, N., MARTINS, A., REIS, R. L. & NEVES, N. M. 2015. Nanoparticle-based bioactive agent release systems for bone and cartilage tissue engineering. *Regen Ther*, 1, 109-118.
- NAIR, L. S. & LAURENCIN, C. T. 2006. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 102, 47-90.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US), C. F. T. U. O. T. G. F. T. C. A. U. O. L. A. 2011. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In: TH (ed.) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences.
- NIECHAJEV, I. 2012. Facial reconstruction using porous high-density polyethylene (medpor): long-term results. *Aesthetic Plast Surg*, 36, 917-27.
- NOR, J. E., PETERS, M. C., CHRISTENSEN, J. B., SUTORIK, M. M., LINN, S., KHAN, M. K., ADDISON, C. L., MOONEY, D. J. & POLVERINI, P. J. 2001. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest*, 81, 453-63.
- NOVOSEL, E. C., KLEINHANS, C. & KLUGER, P. J. 2011. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 300-11.
- OKOROUKWU, O. N., GREEN, G. R. & D'SOUZA, M. J. 2010. Development of albumin microspheres containing Sp H1-DNA complexes: a novel gene delivery system. *J Microencapsul*, 27, 142-9.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. 2020. *OECD Principles of Good Laboratory Practice* [Online]. Available: [www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem\(98\)17&dclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem(98)17&dclanguage=en) [Accessed 12.04.2020 2020].
- OSS-RONEN, L. & SELIKTAR, D. 2011. Polymer-conjugated albumin and fibrinogen composite hydrogels as cell scaffolds designed for affinity-based drug delivery. *Acta Biomater*, 7, 163-70.
- PAKULSKA, M. M., MIERSCH, S. & SHOICHET, M. S. 2016. Designer protein delivery: From natural to engineered affinity-controlled release systems. *Science*, 351, aac4750.
- PAPENFUSS, H. D., GROSS, J. F., INTAGLIETTA, M. & TREESE, F. A. 1979. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res*, 18, 311-8.
- PATEL, P. J., REES, H. C. & OLVER, J. M. 2003. Clinicopathologic reports, case reports, and small case series: fibrovascularization of porous polyethylene orbital floor implants in humans. *Arch Ophthalmol*, 121, 400-3.
- PERETS, A., BARUCH, Y., WEISBUCH, F., SHOSHANY, G., NEUFELD, G. & COHEN, S. 2003. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A*, 65, 489-97.
- PETERS, T., JR. 1985. Serum albumin. *Adv Protein Chem*, 37, 161-245.
- PFIZER PHARMA GMBH. 2019. *Fachinformation Enbrel 25 mg Fertigspritze* [Online]. Available: <https://www.pfizer.de/sites/default/files/9967.pdf> [Accessed 19.04.2020 2020].
- PIKE, D. B., CAI, S., POMRANING, K. R., FIRPO, M. A., FISHER, R. J., SHU, X. Z., PRESTWICH, G. D. & PEATTIE, R. A. 2006. Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF. *Biomaterials*, 27, 5242-51.
- PIRADASHVILI, K. 2018. *Biodegradable protein nanocarriers for drug delivery*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- PIRADASHVILI, K., FICHTER, M., MOHR, K., GEHRING, S., WURM, F. R. & LANDFESTER, K. 2015. Biodegradable protein nanocontainers. *Biomacromolecules*, 16, 815-21.
- PIRADASHVILI, K., PAßLICK, D., SIMON, J., HÖHNER, J., MAILÄNDER, V., WURM, F. & LANDFESTER, K. 2017. Fully Degradable Protein Nanocarriers by Orthogonal Photoclick Tetrazole-ene Chemistry for the Encapsulation and Release. *Nanoscale Horiz.*, 2.
- QUAGLIA, F. 2008. Bioinspired tissue engineering: the great promise of protein delivery technologies. *Int J Pharm*, 364, 281-97.
- QUINLAN, E., LOPEZ-NORIEGA, A., THOMPSON, E. M., HIBBITTS, A., CRYAN, S. A. & O'BRIEN, F. J. 2017. Controlled release of vascular endothelial growth factor from spray-dried alginate microparticles in collagen-hydroxyapatite scaffolds for promoting vascularization and bone repair. *J Tissue Eng Regen Med*, 11, 1097-1109.

- REDDY, B. P., DORLE, A. K. & KRISHNA, D. R. 1990. Albumin Microspheres: effect of process Variables on size Distribution and in Vitro Release. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 16, 1791-1803.
- REGEV, O., KHALFIN, R., ZUSSMAN, E. & COHEN, Y. 2010. About the albumin structure in solution and related electro-spinnability issues. *Int J Biol Macromol*, 47, 261-5.
- REICHEL, C. A., HESSENAUER, M. E., PFLIEGER, K., REHBERG, M., KANSE, S. M., ZAHLER, S., KROMBACH, F., BERGHAUS, A. & STRIETH, S. 2015. Components of the plasminogen activation system promote engraftment of porous polyethylene biomaterial via common and distinct effects. *PLoS One*, 10, e0116883.
- RICHARDSON, T. P., PETERS, M. C., ENNETT, A. B. & MOONEY, D. J. 2001. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*, 19, 1029-34.
- RUCKER, M., LASCHKE, M. W., JUNKER, D., CARVALHO, C., SCHRAMM, A., MULHAUPT, R., GELLRICH, N. C. & MENGER, M. D. 2006. Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials*, 27, 5027-38.
- SABINI, P., SCLAFANI, A. P., ROMO, T., 3RD, MCCORMICK, S. A. & COCKER, R. 2000. Modulation of tissue ingrowth into porous high-density polyethylene implants with basic fibroblast growth factor and autologous blood clot. *Arch Facial Plast Surg*, 2, 27-33.
- SANTHI, K., DHANARAJ, S. A., JOSEPH, V., PONNUSANKAR, S. & SURESH, B. 2002. A study on the preparation and anti-tumor efficacy of bovine serum albumin nanospheres containing 5-fluorouracil. *Drug Dev Ind Pharm*, 28, 1171-9.
- SANTHI, K., DHANARAJ, S. A., KOSHY, M., PONNUSANKAR, S. & SURESH, B. 2000. Study of biodistribution of methotrexate-loaded bovine serum albumin nanospheres in mice. *Drug Dev Ind Pharm*, 26, 1293-6.
- SANTHI, K., DHANARAJ, S. A., RAJENDRAN, S. D., RAJA, K., PONNUSANKAR, S. & SURESH, B. 1999. Nonliposomal approach--a study of preparation of egg albumin nanospheres containing amphotericin-B. *Drug Dev Ind Pharm*, 25, 547-51.
- SANTO, V. E., GOMES, M. E., MANO, J. F. & REIS, R. L. 2012. From nano- to macro-scale: nanotechnology approaches for spatially controlled delivery of bioactive factors for bone and cartilage engineering. *Nanomedicine (Lond)*, 7, 1045-66.
- SANTOS, M. I. & REIS, R. L. 2010. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci*, 10, 12-27.
- SCHMIDMAIER, G., WILDEMANN, B., STEMBERGER, A., HAAS, N. P. & RASCHKE, M. 2001. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res*, 58, 449-55.
- SCHOEN, I., RAHNE, T., MARKWART, A., NEUMANN, K., BERGHAUS, A. & ROEPKE, E. 2009. Cartilage replacement by use of hybrid systems of autologous cells and polyethylene: an experimental study. *J Mater Sci Mater Med*, 20, 2145-54.
- SCHOONEN, L. & VAN HEST, J. C. 2014. Functionalization of protein-based nanocages for drug delivery applications. *Nanoscale*, 6, 7124-41.
- SCHUMANN, P., LINDHORST, D., VON SEE, C., MENZEL, N., KAMPMANN, A., TAVASSOL, F., KOKEMULLER, H., RANA, M., GELLRICH, N. C. & RUCKER, M. 2014. Accelerating the early angiogenesis of tissue engineering constructs in vivo by the use of stem cells cultured in matrigel. *J Biomed Mater Res A*, 102, 1652-62.
- SCHUMANN, P., TAVASSOL, F., LINDHORST, D., STUEHMER, C., BORMANN, K. H., KAMPMANN, A., MULHAUPT, R., LASCHKE, M. W., MENGER, M. D., GELLRICH, N. C. & RUCKER, M. 2009. Consequences of seeded cell type on vascularization of tissue engineering constructs in vivo. *Microvasc Res*, 78, 180-90.
- SCLAFANI, A. P., ROMO, T., 3RD & SILVER, L. 1997. Clinical and histologic behavior of exposed porous high-density polyethylene implants. *Plast Reconstr Surg*, 99, 41-50.
- SCLAFANI, A. P., ROMO, T., 3RD, UKRAINSKY, G., MCCORMICK, S. A., LITNER, J., KEVY, S. V. & JACOBSON, M. S. 2005. Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate. *Arch Facial Plast Surg*, 7, 163-9.

- SCOPELLITI, D. & AMODEO, G. 2016. Nasal Dorsum Reconstruction With Alloplastic Material. *J Craniofac Surg*, 27, e676-e678.
- SHEA, L. D., SMILEY, E., BONADIO, J. & MOONEY, D. J. 1999. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 17, 551-4.
- SHEN, Z., LI, Y., KOHAMA, K., ONEILL, B. & BI, J. 2011. Improved drug targeting of cancer cells by utilizing actively targetable folic acid-conjugated albumin nanospheres. *Pharmacol Res*, 63, 51-8.
- SHI, J., VOTRUBA, A. R., FAROKHZAD, O. C. & LANGER, R. 2010. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett*, 10, 3223-30.
- SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH. 2019. *Sicherheitsdatenblatt Sulforhodamine 101* [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DE&language=de&productNumber=S7635&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fs7635%3Flang%3Dde> [Accessed 19.04.2020 2020].
- SINGH, R. & LILLARD, J. W., JR. 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*, 86, 215-23.
- SINHA, V. R., BANSAL, K., KAUSHIK, R., KUMRIA, R. & TREHAN, A. 2004. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm*, 278, 1-23.
- SON, S., SONG, S., LEE, S. J., MIN, S., KIM, S. A., YHEE, J. Y., HUH, M. S., CHAN KWON, I., JEONG, S. Y., BYUN, Y., KIM, S. H. & KIM, K. 2013. Self-crosslinked human serum albumin nanocarriers for systemic delivery of polymerized siRNA to tumors. *Biomaterials*, 34, 9475-85.
- SONG, R., MURPHY, M., LI, C., TING, K., SOO, C. & ZHENG, Z. 2018. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Des Devel Ther*, 12, 3117-3145.
- SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R. & RUDZINSKI, W. E. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, 70, 1-20.
- SPECTOR, M., FLEMMING, W. R. & SAUER, B. W. 1975. Early tissue infiltrate in porous polyethylene implants into bone: a scanning electron microscope study. *J Biomed Mater Res*, 9, 537-42.
- STATON, C. A., REED, M. W. & BROWN, N. J. 2009. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol*, 90, 195-221.
- STEHLE, G., SINN, H., WUNDER, A., SCHRENK, H. H., SCHUTT, S., MAIER-BORST, W. & HEENE, D. L. 1997. The loading rate determines tumor targeting properties of methotrexate-albumin conjugates in rats. *Anticancer Drugs*, 8, 677-85.
- STEINHART, H., SCHROEDER, H. G. & KLEINSASSER, O. 1996. Preformation of microvascular composite free flaps in the rat as an animal model. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 253, 325-8.
- STEINHAUSER, I., SPANKUCH, B., STREBHARDT, K. & LANGER, K. 2006. Trastuzumab-modified nanoparticles: optimisation of preparation and uptake in cancer cells. *Biomaterials*, 27, 4975-83.
- STELTER, K., STRIETH, S. & BERGHAUS, A. 2007. Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks. *Rhinology*, 45, 325-31.
- STERODIMAS, A., DE FARIA, J., CORREA, W. E. & PITANGUY, I. 2009. Tissue engineering and auricular reconstruction: a review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 62, 447-52.
- STRIETH, S. 2013. [Tissue engineering using porous polyethylene implants]. *Hno*, 61, 211-6.
- STRIETH, S., WEGER, T., BARTESCH, C., BITTMANN, P., STELTER, K. & BERGHAUS, A. 2010. Biocompatibility of porous polyethylene implants tissue-engineered by extracellular matrix and VEGF. *J Biomed Mater Res A*, 93, 1566-73.
- SUN, Q., CHEN, R. R., SHEN, Y., MOONEY, D. J., RAJAGOPALAN, S. & GROSSMAN, P. M. 2005. Sustained vascular endothelial growth factor delivery enhances angiogenesis and perfusion in ischemic hind limb. *Pharm Res*, 22, 1110-6.
- TABATA, Y., MIYAO, M., YAMAMOTO, M. & IKADA, Y. 1999. Vascularization into a porous sponge by sustained release of basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed*, 10, 957-68.
- TANG, Q. S., CHEN, D. Z., XUE, W. Q., XIANG, J. Y., GONG, Y. C., ZHANG, L. & GUO, C. Q. 2011. Preparation and biodistribution of 188Re-labeled folate conjugated human serum albumin

- magnetic cisplatin nanoparticles (188Re-folate-CDDP/HSA MNPs) in vivo. *Int J Nanomedicine*, 6, 3077-85.
- TEMPLE, J. P., HUTTON, D. L., HUNG, B. P., HURI, P. Y., COOK, C. A., KONDRAGUNTA, R., JIA, X. & GRAYSON, W. L. 2014. Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hASCs and 3D-printed PCL scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 102, 4317-25.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. 2013. *Amine-Reactive Probes* [Online]. Available: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp00143.pdf> [Accessed 08.05.2020 2020].
- TRACEY, D., KLARESKOG, L., SASSO, E. H., SALFELD, J. G. & TAK, P. P. 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*, 117, 244-79.
- TRIETLEY, G. & SKEF, S. 2017. Albiglutide (Tanzeum) for Diabetes Mellitus. *Am Fam Physician*, 95, 521-522.
- TRUJILLO, J. M. & NUFFER, W. 2014. Albiglutide: a new GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Ann Pharmacother*, 48, 1494-501.
- ULERY, B. D., NAIR, L. S. & LAURENCIN, C. T. 2011. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys*, 49, 832-864.
- UNGER, R. E., PETERS, K., HUANG, Q., FUNK, A., PAUL, D. & KIRKPATRICK, C. J. 2005. Vascularization and gene regulation of human endothelial cells growing on porous polyethersulfone (PES) hollow fiber membranes. *Biomaterials*, 26, 3461-9.
- VACANTI, J. P. & LANGER, R. 1999. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, 354 Suppl 1, S132-4.
- VAN DE WEERT, M., HENNINK, W. E. & JISKOOT, W. 2000. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm Res*, 17, 1159-67.
- VAN HOVE, A. H. & BENOIT, D. S. 2015. Depot-Based Delivery Systems for Pro-Angiogenic Peptides: A Review. *Front Bioeng Biotechnol*, 3, 102.
- WANG, Y. F., CHUANG, M. H., CHIU, J. S., CHAM, T. M. & CHUNG, M. I. 2007. On-site preparation of technetium-99m labeled human serum albumin for clinical application. *Tohoku J Exp Med*, 211, 379-85.
- WARTLICK, H., MICHAELIS, K., BALTHASAR, S., STREBHARDT, K., KREUTER, J. & LANGER, K. 2004a. Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells. *J Drug Target*, 12, 461-71.
- WARTLICK, H., SPANKUCH-SCHMITT, B., STREBHARDT, K., KREUTER, J. & LANGER, K. 2004b. Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles. *J Control Release*, 96, 483-95.
- WEBER, C., COESTER, C., KREUTER, J. & LANGER, K. 2000. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int J Pharm*, 194, 91-102.
- WEGER, T. 2011. *Effekte von Beschichtungen poröser Polyethylenimplantate mit Extrazellulärmatrixkomponenten und VEGF auf die mikrozirkulatorische und mechanische Integration in vivo*. Dissertation, LMU München.
- WELLISZ, T. 1993. Clinical experience with the Medpor porous polyethylene implant. *Aesthetic Plast Surg*, 17, 339-44.
- WILKINS, J. R., PIKE, D. B., GIBSON, C. C., KUBOTA, A. & SHIU, Y. T. 2014. Differential effects of cyclic stretch on bFGF- and VEGF-induced sprouting angiogenesis. *Biotechnol Prog*, 30, 879-88.
- WUNDER, A., MULLER-LADNER, U., STELZER, E. H., FUNK, J., NEUMANN, E., STEHLE, G., PAP, T., SINN, H., GAY, S. & FIEHN, C. 2003. Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 170, 4793-801.
- WURM, F. R. & WEISS, C. K. 2014. Nanoparticles from renewable polymers. *Front Chem*, 2, 49.
- YANCOPOULOS, G. D., DAVIS, S., GALE, N. W., RUDGE, J. S., WIEGAND, S. J. & HOLASH, J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407, 242-8.
- YANG, M., HOPPMANN, S., CHEN, L. & CHENG, Z. 2012. Human serum albumin conjugated biomolecules for cancer molecular imaging. *Curr Pharm Des*, 18, 1023-31.

- YARDLEY, D. A. 2013. nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *J Control Release*, 170, 365-72.
- YAREMCHUK, M. J. 2003. Facial skeletal reconstruction using porous polyethylene implants. *Plast Reconstr Surg*, 111, 1818-27.
- YHEE, J. Y., LEE, J., CHANG, H., LEE, J., KWON, I. C. & KIM, K. 2015. Molecular imaging and targeted drug delivery using albumin-based nanoparticles. *Curr Pharm Des*, 21, 1889-98.
- ZALEVSKY, J., SECHER, T., EZHEVSKY, S. A., JANOT, L., STEED, P. M., O'BRIEN, C., EIVAZI, A., KUNG, J., NGUYEN, D. H., DOBERSTEIN, S. K., ERARD, F., RYFFEL, B. & SZYMKOWSKI, D. E. 2007. Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection. *J Immunol*, 179, 1872-83.
- ZHANG, S., DOSCHAK, M. R. & ULUDAG, H. 2009. Pharmacokinetics and bone formation by BMP-2 entrapped in polyethylenimine-coated albumin nanoparticles. *Biomaterials*, 30, 5143-55.
- ZHANG, S. & ULUDAG, H. 2009. Nanoparticulate systems for growth factor delivery. *Pharm Res*, 26, 1561-80.
- ZHANG, S., WANG, G., LIN, X., CHATZINIKOLAIDOU, M., JENNISSSEN, H. P., LAUB, M. & ULUDAG, H. 2008. Polyethylenimine-coated albumin nanoparticles for BMP-2 delivery. *Biotechnol Prog*, 24, 945-56.
- ZHANG, Y., SUN, T. & JIANG, C. 2018. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8, 34-50.
- ZHAO, D., ZHAO, X., ZU, Y., LI, J., ZHANG, Y., JIANG, R. & ZHANG, Z. 2010. Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 5, 669-77.
- ZHAO, Z., WANG, J., MAO, H. Q. & LEONG, K. W. 2003. Polyphosphoesters in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 483-99.
- ZHOU, G., JIN, X., ZHU, P., YAO, J. U., ZHANG, Y., TENG, L., LEE, R. J., ZHANG, X. & HONG, W. 2016. Human Serum Albumin Nanoparticles as a Novel Delivery System for Cabazitaxel. *Anticancer Res*, 36, 1649-56.
- ZISCH, A. H., LUTOLF, M. P., EHRBAR, M., RAEBER, G. P., RIZZI, S. C., DAVIES, N., SCHMOKEL, H., BEZUIDENHOUT, D., DJONOV, V., ZILLA, P. & HUBBELL, J. A. 2003. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *Faseb j*, 17, 2260-2.

10. Anhang

Anhangsverzeichnis:

10.1 Boxplots 10 ms	78
10.2 Diagramme und Tabellen 10 ms.....	79
10.3 Fluoreszenzintensität der Kammer	83
10.4 Fluoreszenzintensität 50 ms	84
10.5 Fluoreszenzintensität 10 ms	91
10.6 Fluoreszenzintensität Stunde 1.....	98

10.1 Boxplots 10 ms

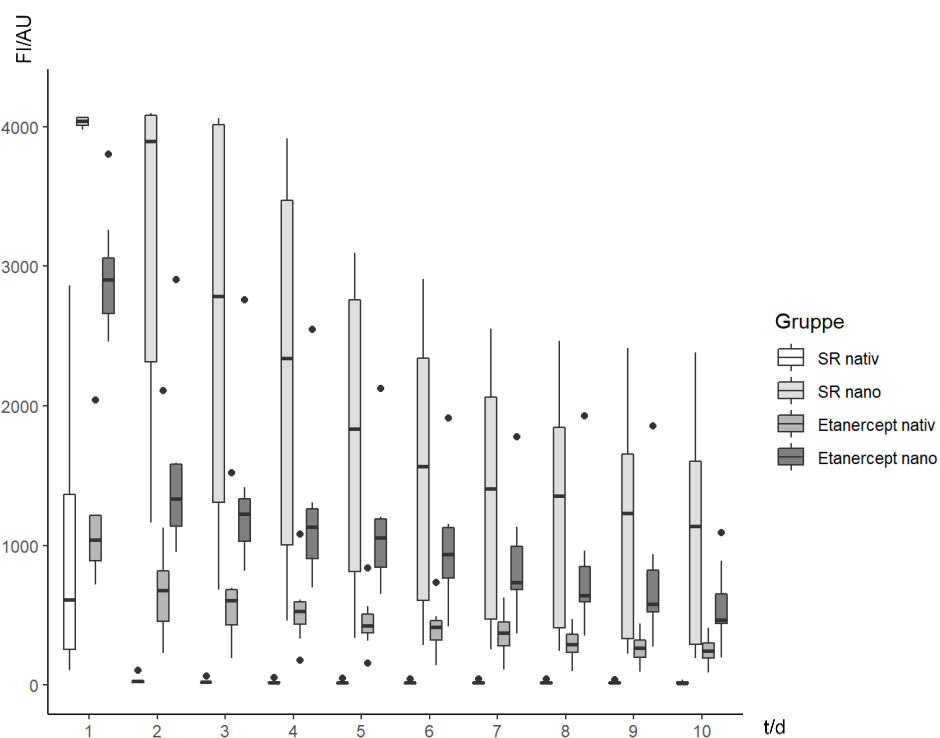


Abb. 30: Boxplots ROI 1, 10 ms
Fluoreszenzintensität in arbitrary units (FI/AU), Zeit in Tagen (t/d)

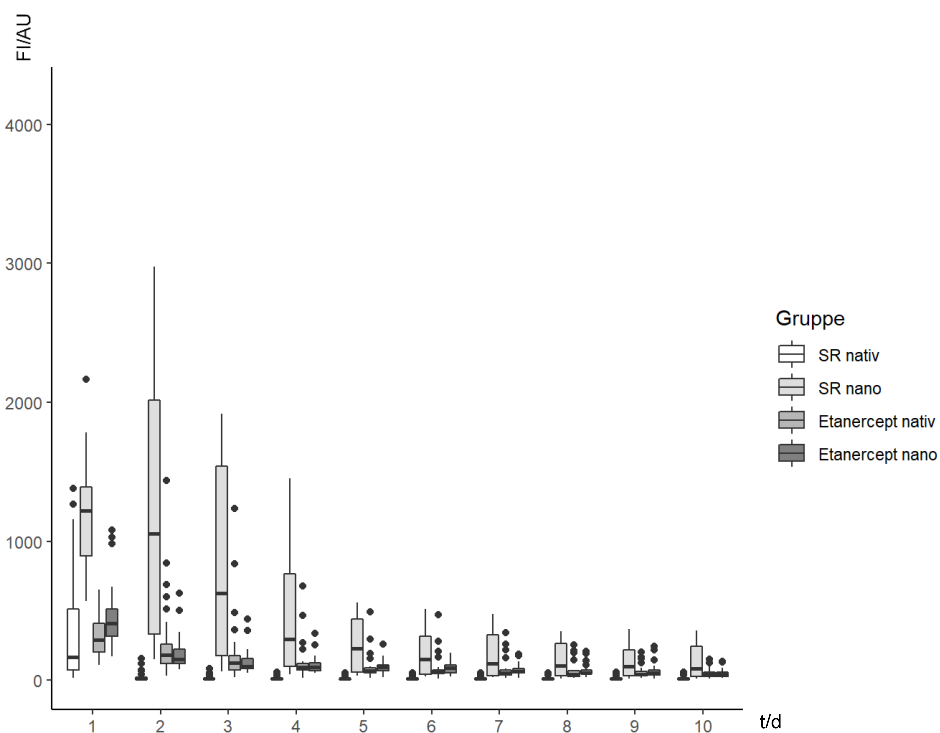


Abb. 31: Boxplots ROI 2-5, 10 ms
Fluoreszenzintensität in arbitrary units (FI/AU)
Zeit in Tagen (t/d)

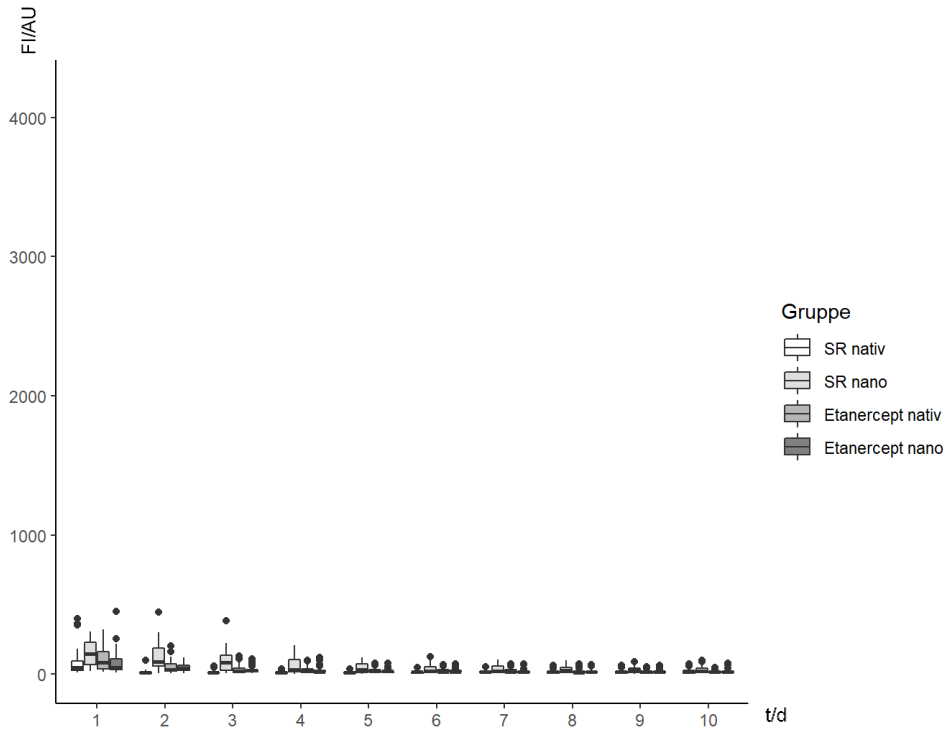
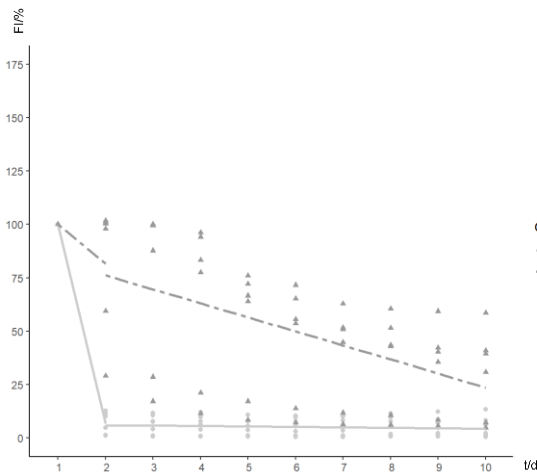


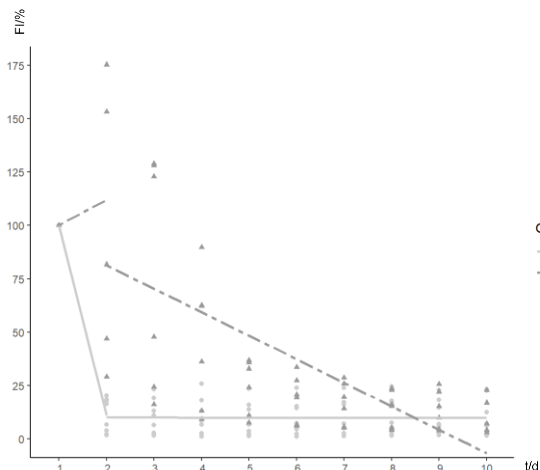
Abb. 32: Boxplots ROI 6-9, 10 ms
Fluoreszenzintensität in arbitrary units (FI/AU)
Zeit in Tagen (t/d)

10.2 Diagramme und Tabellen 10 ms



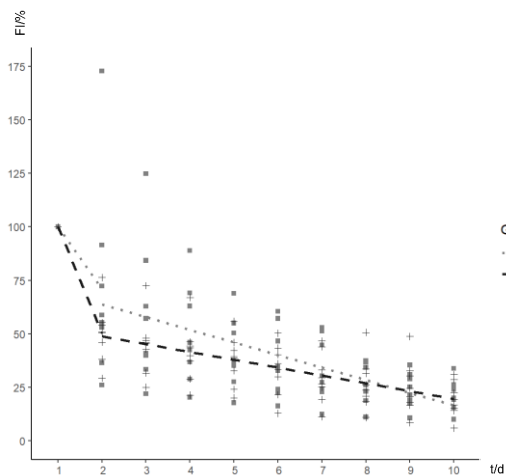
Tag 1-2		Schätzer	2,5% KI	97,5% KI
SR nativ	b	100,00	90,59	109,41
	m	-93,23	-106,55	-79,92
SR nano	b	100,00	90,59	109,41
	m	-18,43	-33,80	-3,05
Differenz	m	74,81	54,47	95,15
	p	0,000		
Tag 2-10		Schätzer	2,5% KI	97,5% KI
SR nativ	b	5,93	-10,43	22,28
	m	-0,20	-1,37	0,96
SR nano	b	76,18	57,29	95,07
	m	-6,58	-7,92	-5,23
Differenz	m	-6,38	-8,16	-4,60
	p	0,000		

Abb. 33: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 1, 10 ms
Relative Fluoreszenzintensität in Prozent (FI/%), Zeit in Tagen (t/d) [Diagramm links]
Schätzer sowie Konfidenzintervalle (KI) für den y-Achsenabschnitt (b) in Prozent und für die Geradensteigung (m) in Prozent/Tag; „p“ bezeichnet den p-Wert der Differenz der Geradensteigungen [Tabelle rechts]



Tag 1-2		Schätzer	2,5% KI	97,5% KI
SR nativ	b	100,00	77,11	122,89
	m	-89,07	-121,43	-56,71
SR nano	b	100,00	77,11	122,89
	m	11,95	-22,06	45,96
Differenz	m	101,02	51,59	150,45
	p	0,000		
Tag 2-10		Schätzer	2,5% KI	97,5% KI
SR nativ	b	10,07	-12,98	33,12
	m	-0,03	-3,25	3,19
SR nano	b	81,41	51,64	111,18
	m	-11,01	-15,14	-6,88
Differenz	m	-10,98	-15,90	-6,06
	p	0,001		

Abb. 34: Fluoreszenzverlauf „SR nativ“ und „SR nano“ in ROI 2-5, 10 ms
 Bezeichnungen und Einheiten vgl. Abb. 33
 Im Diagramm fehlt aufgrund der einheitlichen Skalierung ein Messwert der Gruppe „SR nano“:
 185,56 % an Tag 2



Tag 1-2		Schätzer	2,5% KI	97,5% KI
Etanercept nativ	b	100,00	82,67	117,33
	m	-29,22	-53,73	-4,71
Etanercept nano	b	100,00	82,67	117,33
	m	-49,94	-74,45	-25,43
Differenz	m	-20,72	-55,39	13,95
	p	0,231		
Tag 2-10		Schätzer	2,5% KI	97,5% KI
Etanercept nativ	b	63,70	44,79	82,61
	m	-5,89	-8,19	-3,60
Etanercept nano	b	48,78	29,87	67,69
	m	-3,65	-5,95	-1,36
Differenz	m	2,24	-1,01	5,49
	p	0,200		

Abb. 35: Fluoreszenzverlauf „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ in ROI 1, 10 ms
 Bezeichnungen und Einheiten vgl. Abb. 33

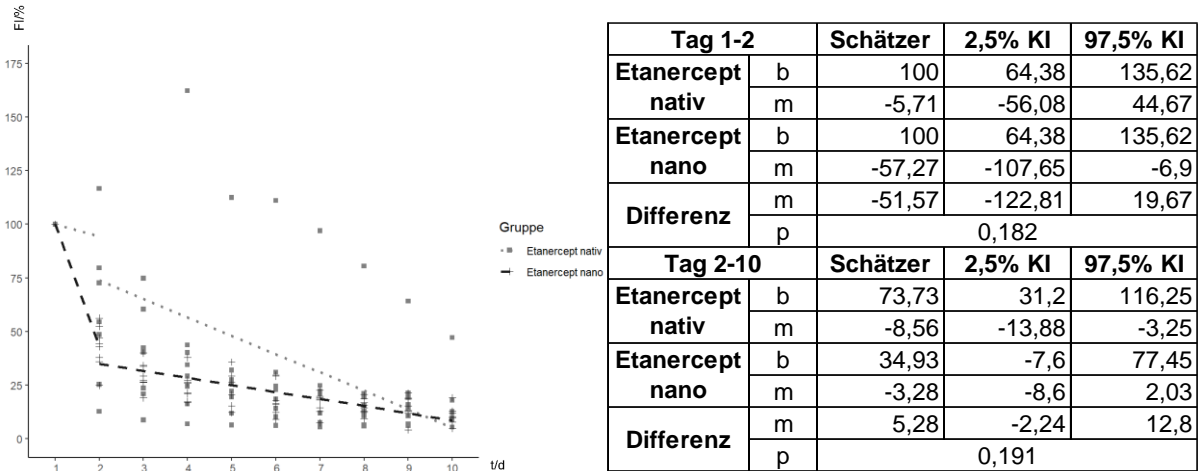


Abb. 36: Fluoreszenzverlauf „Etanercept nativ“ und „Etanercept nano“ in ROI 2-5, 10 ms
 Bezeichnungen und Einheiten vgl. Abb. 33
 Im Diagramm fehlen aufgrund der einheitlichen Skalierung zwei Messwerte der Gruppe „Etanercept nativ“: 344,50 % an Tag 2 und 289,50 % an Tag 3

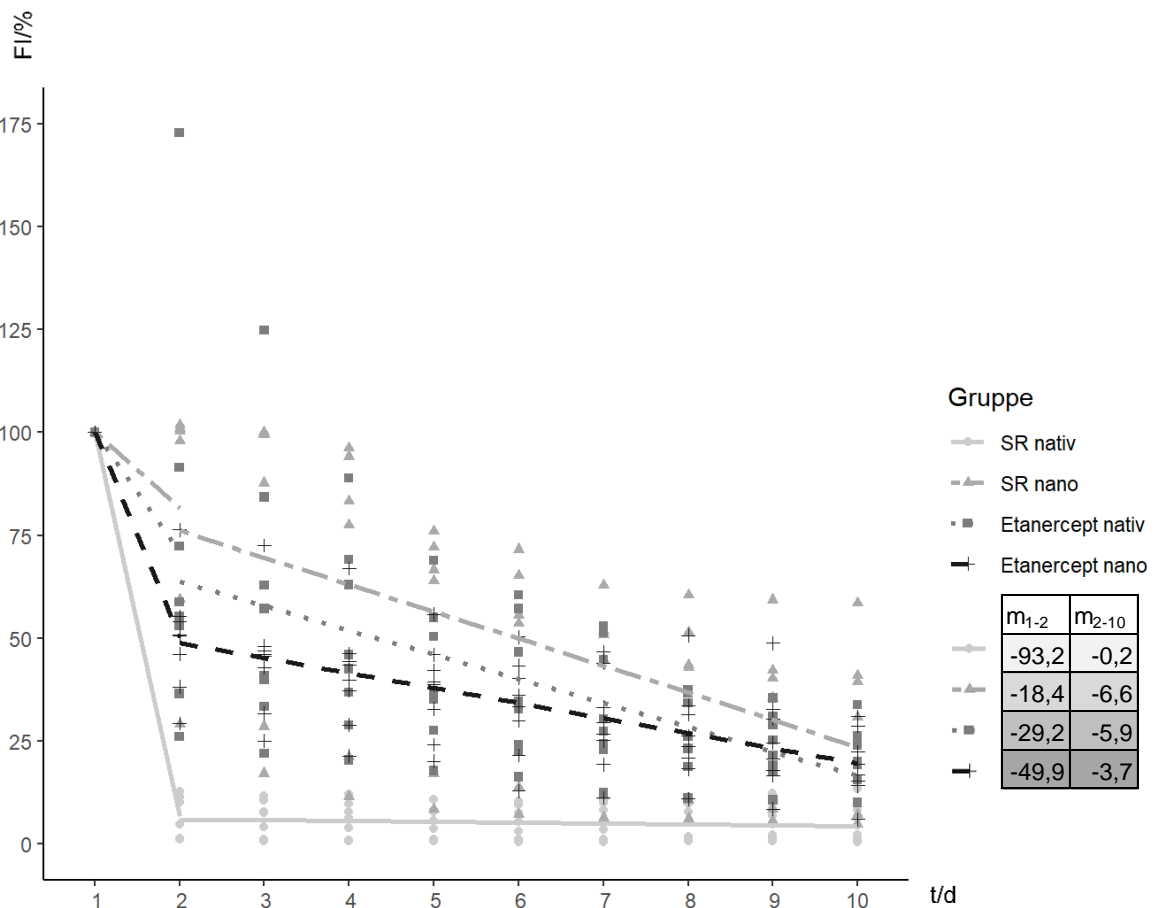


Abb. 37: Fluoreszenzverlauf aller vier Versuchsgruppen in ROI 1 (10 ms) über zehn Tage
 Relative Fluoreszenzintensität in Prozent (FI/%), Zeit in Tagen (t/d)
 Geradensteigungen für Tag 1-2 (m1-2) und für Tag 2-10 (m2-10) in %/Tag

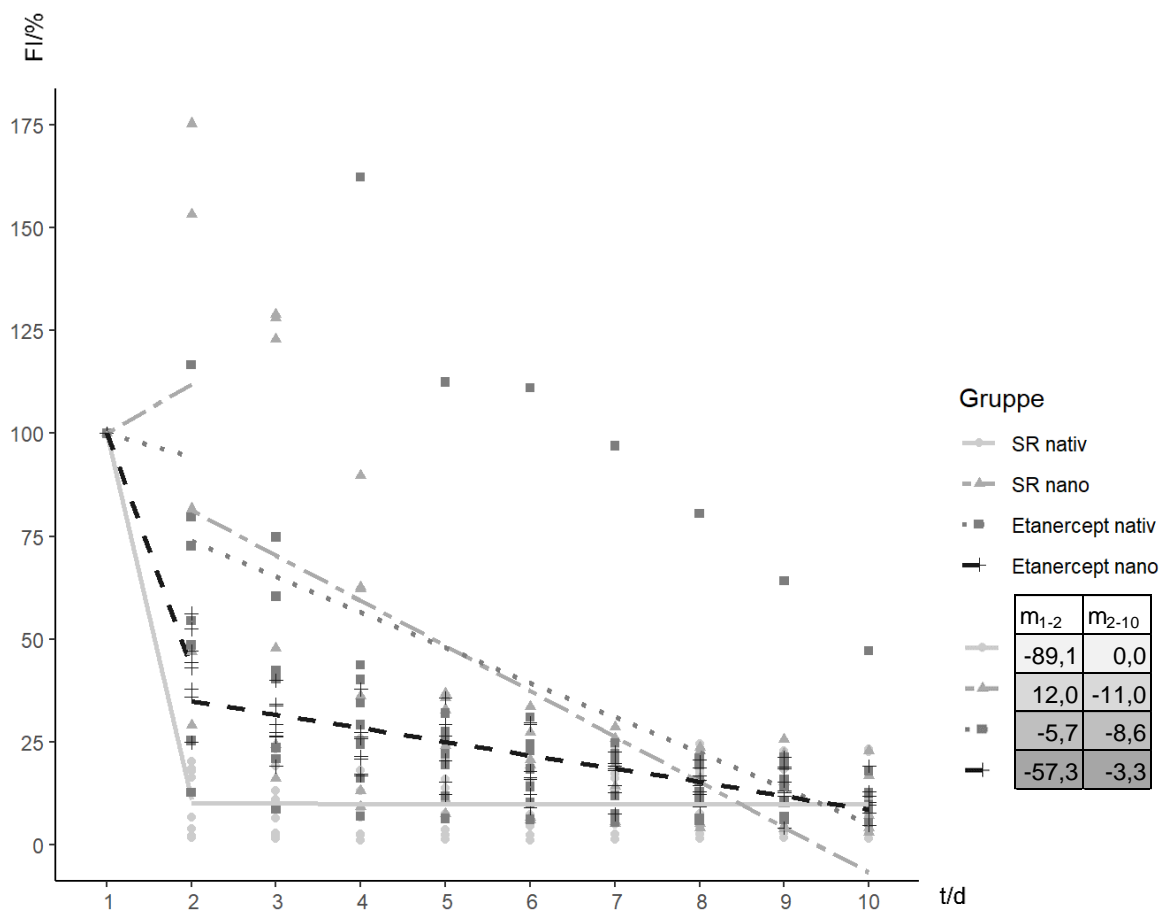


Abb. 38: Fluoreszenzverlauf aller vier Versuchsgruppen in ROI 2-5 (10 ms) über zehn Tage
Bezeichnungen und Einheiten vgl. Abb. 37

Im Diagramm fehlen aufgrund der einheitlichen Skalierung drei Messwerte:

Für die Gruppe „SR nano“ 186,56 % an Tag 2

Für die Gruppe „Etanercept nativ“ 344,50 % an Tag 2 und 289,50 % an Tag 3

10.3 Fluoreszenzintensität der Kammer

Name	Gruppe	Tag	ROI 1	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
SR nativ 1	1	0	31	30	38	27	34	34	25	23	30
SR nativ 2	1	0	37	33	30	34	41	31	25	38	38
SR nativ 3	1	0	47	37	40	52	43	19	37	37	40
SR nativ 4	1	0	20	24	16	15	25	31	25	11	12
SR nativ 5	1	0	55	51	61	47	58	37	88	52	51
SR nativ 6	1	0	64	136	57	53	63	129	46	64	23
SR nativ 7	1	0	21	21	19	23	26	22	21	46	27
SR nativ 8	1	0	35	29	47	47	27	25	33	11	10
SR nativ 9	1	0	19	17	21	16	21	20	22	12	16
SR nano 1	2	0	60	39	38	87	48	45	43	27	35
SR nano 2	2	0	43	39	42	69	40	38	37	69	47
SR nano 3	2	0	127	80	127	121	77	60	80	84	50
SR nano 4	2	0	24	21	23	25	37	23	26	22	24
SR nano 5	2	0	30	21	25	30	31	49	32	30	28
SR nano 6	2	0	49	52	65	46	38	50	56	31	33
SR nano 7	2	0	44	45	44	104	43	55	56	58	51
SR nano 8	2	0	42	36	39	40	34	35	44	36	35
Etanercept nativ 1	3	0	53	58	46	41	48	32	39	53	46
Etanercept nativ 2	3	0	54	64	50	36	43	73	51	38	48
Etanercept nativ 3	3	0	33	40	43	35	33	29	39	30	27
Etanercept nativ 4	3	0	46	36	36	53	37	31	37	40	32
Etanercept nativ 5	3	0	33	42	31	31	35	38	24	36	37
Etanercept nativ 6	3	0	4	5	5	4	5	7	5	4	5
Etanercept nativ 7	3	0	33	26	40	27	56	76	26	26	29
Etanercept nativ 8	3	0	40	35	34	38	33	35	35	29	35
Etanercept nano 1	4	0	40	46	44	32	38	41	25	34	35
Etanercept nano 2	4	0	62	64	79	55	39	42	33	49	41
Etanercept nano 3	4	0	38	32	28	46	41	28	34	51	38
Etanercept nano 4	4	0	35	45	17	30	33	57	16	24	54
Etanercept nano 5	4	0	34	34	39	32	40	39	44	27	40
Etanercept nano 6	4	0	39	33	31	33	33	35	36	28	21
Etanercept nano 7	4	0	38	25	29	41	26	16	27	47	12
Etanercept nano 8	4	0	42	34	45	44	38	35	43	34	48

10.4 Fluoreszenzintensität 50 ms

Name	Gruppe	Tag	ROI 1	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
SR nativ 1	1	1	3985	2718	2358	1129	1017	2259	486	160	351
SR nativ 1	1	2	175	92	89	100	76	76	66	42	54
SR nativ 1	1	3	109	75	87	85	72	78	67	48	63
SR nativ 1	1	4	99	64	87	91	70	66	79	51	56
SR nativ 1	1	5	90	60	76	82	69	53	77	53	54
SR nativ 1	1	6	90	61	83	85	75	60	83	59	54
SR nativ 1	1	7	114	87	108	110	103	90	107	79	81
SR nativ 1	1	8	90	56	81	74	73	60	83	50	45
SR nativ 1	1	9	84	55	73	80	76	54	92	60	53
SR nativ 1	1	10	103	46	69	63	58	59	77	36	46
SR nativ 2	1	1	4068	2898	4094	3499	1701	680	1294	895	465
SR nativ 2	1	2	546	652	889	426	226	153	522	131	88
SR nativ 2	1	3	334	412	420	198	169	255	303	151	87
SR nativ 2	1	4	258	284	277	170	186	174	194	149	80
SR nativ 2	1	5	237	234	216	181	185	143	190	143	81
SR nativ 2	1	6	223	224	192	189	176	126	178	162	84
SR nativ 2	1	7	214	221	187	192	172	123	181	169	93
SR nativ 2	1	8	213	222	211	209	180	97	194	166	101
SR nativ 2	1	9	196	205	195	191	161	103	191	177	112
SR nativ 2	1	10	190	225	213	190	144	101	171	173	125
SR nativ 3	1	1	1341	548	280	922	300	254	199	147	50
SR nativ 3	1	2	154	74	28	209	70	130	80	113	106
SR nativ 3	1	3	105	46	32	157	39	145	81	123	126
SR nativ 3	1	4	106	45	33	152	41	168	78	121	134
SR nativ 3	1	5	112	49	39	149	44	197	78	137	146
SR nativ 3	1	6	131	51	44	156	50	233	85	154	167
SR nativ 3	1	7	139	58	49	170	55	263	96	172	187
SR nativ 3	1	8	162	66	59	188	61	317	118	186	220
SR nativ 3	1	9	163	66	62	180	59	348	117	167	228
SR nativ 3	1	10	175	83	74	235	70	383	146	206	288
SR nativ 4	1	1	507	170	83	149	182	131	73	61	75
SR nativ 4	1	2	61	31	29	27	38	38	28	22	33
SR nativ 4	1	3	61	38	32	29	44	45	28	31	42
SR nativ 4	1	4	64	46	37	28	50	54	35	34	49
SR nativ 4	1	5	57	44	28	22	51	36	38	24	32
SR nativ 4	1	6	53	45	26	22	50	42	36	20	32
SR nativ 4	1	7	53	50	23	28	49	49	37	19	28
SR nativ 4	1	8	51	49	22	31	46	46	40	22	24
SR nativ 4	1	9	46	43	24	42	33	36	46	27	22
SR nativ 4	1	10	43	37	25	45	31	34	53	28	20
SR nativ 5	1	1	1010	406	512	298	311	177	361	145	210
SR nativ 5	1	2	105	57	78	65	57	45	82	46	54
SR nativ 5	1	3	110	76	95	68	59	64	100	47	58
SR nativ 5	1	4	99	87	86	51	60	68	86	38	72
SR nativ 5	1	5	81	79	62	43	64	78	89	45	80
SR nativ 5	1	6	81	80	54	45	76	78	101	57	90
SR nativ 5	1	7	85	91	50	47	80	96	106	67	89
SR nativ 5	1	8	78	92	51	44	77	98	113	64	88
SR nativ 5	1	9	70	67	53	39	59	79	103	76	65
SR nativ 5	1	10	64	51	54	38	51	64	106	83	50

SR nativ 6	1	1	4095	2926	3969	4092	3550	922	1713	2199	819
SR nativ 6	1	2	157	104	99	90	76	89	53	58	55
SR nativ 6	1	3	121	100	70	69	65	94	53	41	40
SR nativ 6	1	4	91	81	51	52	49	79	39	35	70
SR nativ 6	1	5	81	87	51	50	56	91	40	39	87
SR nativ 6	1	6	70	84	36	38	66	91	37	42	97
SR nativ 6	1	7	78	95	44	48	75	112	45	67	108
SR nativ 6	1	8	85	98	48	62	94	117	53	75	102
SR nativ 6	1	9	90	107	63	64	107	100	65	82	120
SR nativ 6	1	10	85	77	66	59	85	69	54	89	114
SR nativ 7	1	1	1906	538	530	612	935	249	238	414	434
SR nativ 7	1	2	93	49	31	30	63	35	26	79	51
SR nativ 7	1	3	81	52	34	32	57	37	28	68	46
SR nativ 7	1	4	76	53	42	33	48	42	37	75	42
SR nativ 7	1	5	73	49	50	40	45	42	48	75	40
SR nativ 7	1	6	60	44	44	35	38	42	42	72	36
SR nativ 7	1	7	66	51	56	39	41	51	52	72	49
SR nativ 7	1	8	31	35	38	21	20	29	31	47	28
SR nativ 7	1	9	40	45	46	32	30	45	44	58	44
SR nativ 7	1	10	43	46	48	32	35	47	44	47	40
SR nativ 8	1	1	4076	2937	2034	3023	3498	519	581	342	241
SR nativ 8	1	2	183	79	64	363	134	24	38	19	41
SR nativ 8	1	3	100	50	53	269	67	25	59	23	54
SR nativ 8	1	4	92	39	53	265	52	29	62	49	84
SR nativ 8	1	5	84	36	46	277	57	19	74	50	116
SR nativ 8	1	6	76	39	44	272	52	21	80	51	125
SR nativ 8	1	7	84	49	53	279	58	33	112	55	150
SR nativ 8	1	8	75	46	57	272	54	36	145	56	167
SR nativ 8	1	9	82	53	62	298	66	39	156	56	183
SR nativ 8	1	10	69	40	42	286	59	27	174	53	210
SR nativ 9	1	1	3594	574	743	1835	1220	146	127	241	129
SR nativ 9	1	2	61	17	21	25	25	17	18	10	11
SR nativ 9	1	3	50	26	28	23	25	37	29	12	18
SR nativ 9	1	4	42	42	28	20	23	48	37	11	20
SR nativ 9	1	5	46	57	38	28	31	64	60	19	27
SR nativ 9	1	6	49	79	52	33	36	78	83	22	33
SR nativ 9	1	7	56	85	56	37	42	88	93	25	41
SR nativ 9	1	8	55	74	72	41	44	85	85	29	42
SR nativ 9	1	9	68	86	86	52	59	96	98	34	50
SR nativ 9	1	10	58	87	86	42	49	87	89	34	41
SR nano 1	2	1	4095	2998	1962	2374	2171	528	664	62	140
SR nano 1	2	2	3915	1933	675	2073	972	347	182	105	156
SR nano 1	2	3	3051	1015	568	955	611	191	125	65	55
SR nano 1	2	4	2174	597	368	550	268	136	130	65	75
SR nano 1	2	5	1629	398	347	425	263	130	108	55	56
SR nano 1	2	6	1388	282	213	443	232	122	89	67	67
SR nano 1	2	7	1238	315	233	397	164	108	87	75	76
SR nano 1	2	8	1184	244	175	391	154	120	79	67	67
SR nano 1	2	9	1073	205	153	347	148	144	73	77	60
SR nano 1	2	10	936	179	145	292	127	66	65	89	59

SR nano 2	2	1	4095	2535	2057	2056	2353	240	144	187	245
SR nano 2	2	2	4076	1712	1508	2488	1691	582	352	1350	496
SR nano 2	2	3	3323	653	771	1549	1140	205	125	395	388
SR nano 2	2	4	2753	327	406	906	628	114	85	183	136
SR nano 2	2	5	2397	206	329	891	495	74	43	154	73
SR nano 2	2	6	2070	192	173	512	294	39	39	84	73
SR nano 2	2	7	1874	133	133	458	191	37	41	55	53
SR nano 2	2	8	1724	126	119	295	155	39	41	60	48
SR nano 2	2	9	1440	126	101	328	156	40	36	71	38
SR nano 2	2	10	1208	98	81	250	110	34	33	63	33
SR nano 3	2	1	4095	3310	3533	3137	2953	178	273	694	1231
SR nano 3	2	2	4095	3068	3072	2935	3590	164	330	724	735
SR nano 3	2	3	4067	1388	1878	3422	1193	58	196	670	683
SR nano 3	2	4	3944	791	585	736	593	56	74	112	541
SR nano 3	2	5	3469	454	165	212	256	74	42	46	153
SR nano 3	2	6	3193	356	173	152	182	100	36	33	110
SR nano 3	2	7	3157	405	218	135	182	97	36	27	111
SR nano 3	2	8	3177	403	254	147	188	124	47	25	126
SR nano 3	2	9	3204	388	238	164	211	127	61	31	129
SR nano 3	2	10	3247	392	249	169	218	131	75	32	140
SR nano 4	2	1	4095	3019	3965	2379	1908	386	1570	179	163
SR nano 4	2	2	4013	827	943	1326	1357	316	31	32	51
SR nano 4	2	3	3647	327	375	542	623	188	20	24	30
SR nano 4	2	4	3220	212	304	350	425	137	18	20	23
SR nano 4	2	5	2944	194	210	255	374	110	15	21	23
SR nano 4	2	6	2398	139	215	136	175	86	31	27	41
SR nano 4	2	7	2006	96	130	112	114	89	33	29	27
SR nano 4	2	8	1638	77	99	72	74	70	30	23	19
SR nano 4	2	9	1504	63	72	66	77	61	26	24	18
SR nano 4	2	10	1370	59	102	62	91	58	25	26	21
SR nano 5	2	1	4095	3977	3881	3940	3802	1198	1487	1399	1308
SR nano 5	2	2	4095	4093	3781	3716	4091	1446	674	869	2542
SR nano 5	2	3	4091	3300	2409	2572	3769	639	393	704	1383
SR nano 5	2	4	4091	2471	2471	2163	2986	511	518	582	823
SR nano 5	2	5	4079	2186	2234	1399	2178	294	255	412	619
SR nano 5	2	6	4084	1489	1503	1260	1789	255	218	321	380
SR nano 5	2	7	3989	1493	1536	1053	1687	232	242	351	487
SR nano 5	2	8	4000	1401	1204	1050	1257	292	232	240	314
SR nano 5	2	9	3719	616	1004	570	768	289	185	131	209
SR nano 5	2	10	3583	553	673	519	445	170	84	120	102
SR nano 6	2	1	4095	4095	3505	3841	3286	972	1044	419	644
SR nano 6	2	2	4095	4095	3682	4082	4084	814	966	257	1156
SR nano 6	2	3	4095	3986	3338	3827	3865	645	796	176	999
SR nano 6	2	4	4095	3046	3517	2731	3457	506	1106	136	1051
SR nano 6	2	5	4086	1967	2387	2193	1990	464	659	192	446
SR nano 6	2	6	3944	1123	1295	1169	998	430	597	140	292
SR nano 6	2	7	3836	813	1069	725	825	521	336	158	369
SR nano 6	2	8	3812	1340	975	816	659	427	487	162	303
SR nano 6	2	9	3741	1353	982	566	841	476	261	183	352
SR nano 6	2	10	3776	1792	778	875	627	498	396	251	276

SR nano 7	2	1	4095	4060	3718	3836	4064	377	1351	208	948
SR nano 7	2	2	4095	4095	4035	3852	4086	1369	1274	413	779
SR nano 7	2	3	4095	4094	4064	3697	4094	998	1802	502	983
SR nano 7	2	4	4093	4001	3425	2756	3010	573	795	267	379
SR nano 7	2	5	4034	2735	2398	2240	1854	262	558	144	210
SR nano 7	2	6	4001	2208	1846	1532	1432	244	384	93	162
SR nano 7	2	7	3989	2327	1863	1783	1298	310	414	95	121
SR nano 7	2	8	3925	1663	1714	1349	935	260	394	68	150
SR nano 7	2	9	3974	1632	1807	1273	900	449	421	89	161
SR nano 7	2	10	3882	1703	1597	1324	1154	436	332	118	211
SR nano 8	2	1	4095	4008	3331	3985	4039	256	248	406	1132
SR nano 8	2	2	4095	4095	3310	4095	4039	505	85	894	302
SR nano 8	2	3	4095	4095	3729	4094	4092	483	111	629	440
SR nano 8	2	4	4095	4072	2110	3918	4092	224	83	499	586
SR nano 8	2	5	4076	2467	2092	2768	2321	369	259	601	293
SR nano 8	2	6	4086	2632	2315	1962	2205	443	232	535	234
SR nano 8	2	7	4036	1687	1601	1853	1633	317	270	402	268
SR nano 8	2	8	4031	1459	1427	1792	1391	216	202	329	233
SR nano 8	2	9	4062	1761	1634	1732	1592	255	182	274	164
SR nano 8	2	10	4027	1472	1292	1431	1302	179	154	188	193
Etanercept nativ 1	3	1	3977	1641	2236	3110	1989	516	426	553	934
Etanercept nativ 1	3	2	1962	1137	316	287	610	631	827	1031	425
Etanercept nativ 1	3	3	2277	847	261	357	470	370	435	671	236
Etanercept nativ 1	3	4	2223	535	196	307	418	174	179	331	163
Etanercept nativ 1	3	5	1849	402	119	232	269	120	124	244	125
Etanercept nativ 1	3	6	1771	314	144	221	277	86	105	165	93
Etanercept nativ 1	3	7	1493	237	104	174	193	73	75	120	83
Etanercept nativ 1	3	8	1286	217	90	151	163	33	66	97	63
Etanercept nativ 1	3	9	1020	195	92	175	146	50	79	105	81
Etanercept nativ 1	3	10	1040	287	135	194	190	56	70	99	101
Etanercept nativ 2	3	1	3918	1564	1426	2066	1537	912	827	1267	884
Etanercept nativ 2	3	2	3149	1003	974	722	878	424	203	211	155
Etanercept nativ 2	3	3	2960	767	769	483	626	213	134	124	92
Etanercept nativ 2	3	4	2919	662	686	383	519	184	120	106	74
Etanercept nativ 2	3	5	2408	344	486	286	318	196	140	120	100
Etanercept nativ 2	3	6	2182	313	343	229	300	200	163	132	84
Etanercept nativ 2	3	7	2132	263	373	271	328	185	217	144	91
Etanercept nativ 2	3	8	1639	201	310	206	299	122	150	101	77
Etanercept nativ 2	3	9	1412	219	296	187	324	138	119	80	82
Etanercept nativ 2	3	10	1178	162	246	154	243	91	70	90	69
Etanercept nativ 3	3	1	3173	925	916	1080	1584	177	358	177	179
Etanercept nativ 3	3	2	3221	641	915	922	1025	88	174	71	83
Etanercept nativ 3	3	3	2887	530	681	599	758	70	124	54	64
Etanercept nativ 3	3	4	2390	365	523	349	529	69	92	56	49
Etanercept nativ 3	3	5	1972	285	364	298	460	80	114	82	71
Etanercept nativ 3	3	6	1968	259	342	286	430	94	115	100	79
Etanercept nativ 3	3	7	1895	219	284	224	359	74	115	104	65
Etanercept nativ 3	3	8	1307	112	171	91	173	44	74	56	35
Etanercept nativ 3	3	9	1244	125	237	110	172	48	88	60	46
Etanercept nativ 3	3	10	1178	108	194	101	139	51	95	88	69

Etanercept nativ 4	3	1	3941	1053	813	1828	735	133	78	402	142
Etanercept nativ 4	3	2	3185	646	712	1318	1121	131	74	119	460
Etanercept nativ 4	3	3	3114	688	588	1197	911	136	87	100	307
Etanercept nativ 4	3	4	2602	392	475	664	524	128	107	86	280
Etanercept nativ 4	3	5	2208	334	311	428	300	118	113	72	252
Etanercept nativ 4	3	6	1994	282	243	380	269	91	80	55	248
Etanercept nativ 4	3	7	1782	273	234	285	264	103	70	38	227
Etanercept nativ 4	3	8	1569	257	192	224	227	112	67	46	221
Etanercept nativ 4	3	9	1473	247	200	225	225	104	66	40	221
Etanercept nativ 4	3	10	1462	239	177	200	217	83	58	36	238
Etanercept nativ 5	3	1	3918	1468	1911	1269	551	187	460	180	102
Etanercept nativ 5	3	2	4094	3302	4068	2223	2853	297	650	219	142
Etanercept nativ 5	3	3	4072	1911	4060	3304	2626	345	420	365	241
Etanercept nativ 5	3	4	3938	1131	3334	2164	1263	364	335	494	450
Etanercept nativ 5	3	5	3681	802	2435	1499	988	290	270	325	313
Etanercept nativ 5	3	6	3418	842	2315	1439	1060	348	271	330	338
Etanercept nativ 5	3	7	2818	766	1629	1185	971	239	270	276	329
Etanercept nativ 5	3	8	2235	736	1245	1026	1002	242	342	281	380
Etanercept nativ 5	3	9	1859	608	1005	767	823	209	245	229	274
Etanercept nativ 5	3	10	1592	473	765	533	638	174	194	184	209
Etanercept nativ 6	3	1	3572	837	2149	1690	1051	129	791	342	547
Etanercept nativ 6	3	2	1109	284	175	155	175	66	32	27	32
Etanercept nativ 6	3	3	924	165	141	111	145	39	31	24	27
Etanercept nativ 6	3	4	865	136	170	104	115	49	29	25	39
Etanercept nativ 6	3	5	746	110	126	86	99	40	30	26	38
Etanercept nativ 6	3	6	704	153	103	79	100	42	33	29	41
Etanercept nativ 6	3	7	519	96	99	73	89	47	40	35	48
Etanercept nativ 6	3	8	475	139	69	73	90	51	44	42	49
Etanercept nativ 6	3	9	449	134	85	82	77	49	43	38	42
Etanercept nativ 6	3	10	421	123	66	72	83	49	41	41	44
Etanercept nativ 7	3	1	4083	999	1215	2469	1408	129	146	318	521
Etanercept nativ 7	3	2	3910	1943	1400	1145	3433	229	130	125	469
Etanercept nativ 7	3	3	2857	552	595	747	725	199	115	119	143
Etanercept nativ 7	3	4	2635	488	490	608	451	267	137	143	281
Etanercept nativ 7	3	5	2494	459	406	474	442	385	144	72	131
Etanercept nativ 7	3	6	2209	389	337	389	372	281	93	72	99
Etanercept nativ 7	3	7	2226	423	352	360	406	209	77	38	84
Etanercept nativ 7	3	8	2237	370	371	358	385	183	66	38	92
Etanercept nativ 7	3	9	2073	363	360	321	335	151	73	32	83
Etanercept nativ 7	3	10	1861	339	279	288	264	111	60	30	90
Etanercept nativ 8	3	1	3744	1351	1348	2961	986	799	1612	1329	1253
Etanercept nativ 8	3	2	2357	1100	712	627	764	357	199	120	156
Etanercept nativ 8	3	3	1758	490	361	337	389	168	95	47	63
Etanercept nativ 8	3	4	1649	539	422	374	350	145	134	62	63
Etanercept nativ 8	3	5	1524	345	276	395	245	164	128	63	80
Etanercept nativ 8	3	6	980	280	227	201	198	95	80	54	69
Etanercept nativ 8	3	7	1005	238	172	203	147	111	85	40	50
Etanercept nativ 8	3	8	841	191	164	180	160	90	63	41	50
Etanercept nativ 8	3	9	804	206	169	184	164	89	65	42	41
Etanercept nativ 8	3	10	691	160	149	189	142	110	94	67	68

Etanercept nano 1	4	1	4081	2857	2301	1683	1494	279	207	118	186
Etanercept nano 1	4	2	3448	1267	605	570	578	83	77	84	166
Etanercept nano 1	4	3	3029	670	712	438	397	76	81	77	129
Etanercept nano 1	4	4	2658	460	626	333	373	67	79	75	92
Etanercept nano 1	4	5	2490	410	597	336	374	44	72	75	83
Etanercept nano 1	4	6	1615	280	169	158	149	40	62	63	95
Etanercept nano 1	4	7	1440	224	163	136	124	37	57	63	85
Etanercept nano 1	4	8	1432	256	265	184	142	54	64	84	116
Etanercept nano 1	4	9	1097	122	89	61	101	24	31	38	35
Etanercept nano 1	4	10	880	127	80	79	120	43	53	66	65
Etanercept nano 2	4	1	4095	3823	3578	3460	2839	759	885	2262	1449
Etanercept nano 2	4	2	4092	1515	2309	2898	1318	532	576	609	620
Etanercept nano 2	4	3	4057	978	1818	1969	980	517	515	377	443
Etanercept nano 2	4	4	4054	891	1305	1590	638	509	362	322	650
Etanercept nano 2	4	5	3966	912	1275	756	574	271	357	91	229
Etanercept nano 2	4	6	3886	729	1062	730	458	229	304	108	262
Etanercept nano 2	4	7	3823	1037	1005	763	368	198	338	122	179
Etanercept nano 2	4	8	3849	1192	723	778	214	322	232	161	362
Etanercept nano 2	4	9	3929	1347	667	948	289	218	248	154	412
Etanercept nano 2	4	10	2900	592	170	552	297	67	238	141	594
Etanercept nano 3	4	1	4080	3099	2072	2891	1798	273	470	302	636
Etanercept nano 3	4	2	3677	1411	692	1033	466	212	133	509	166
Etanercept nano 3	4	3	3459	1260	467	745	456	139	121	461	152
Etanercept nano 3	4	4	3246	995	331	564	311	111	75	347	132
Etanercept nano 3	4	5	2207	449	115	462	560	107	69	386	119
Etanercept nano 3	4	6	2091	386	121	530	527	101	56	375	120
Etanercept nano 3	4	7	1954	341	86	418	601	110	55	352	112
Etanercept nano 3	4	8	1863	328	94	415	459	112	60	355	79
Etanercept nano 3	4	9	1756	282	85	417	476	99	54	327	68
Etanercept nano 3	4	10	1513	230	74	288	345	99	46	345	56
Etanercept nano 4	4	1	4002	2767	924	864	1330	238	355	199	68
Etanercept nano 4	4	2	3677	943	604	484	1110	257	151	254	154
Etanercept nano 4	4	3	3547	797	415	254	659	145	67	103	58
Etanercept nano 4	4	4	3277	583	354	278	501	141	80	70	60
Etanercept nano 4	4	5	3367	520	367	279	517	120	69	59	38
Etanercept nano 4	4	6	3150	479	353	306	472	110	80	55	40
Etanercept nano 4	4	7	2762	332	276	267	338	79	86	45	32
Etanercept nano 4	4	8	2550	295	248	250	340	74	87	40	28
Etanercept nano 4	4	9	2379	265	224	316	333	67	84	46	38
Etanercept nano 4	4	10	1954	177	149	230	213	51	106	39	31
Etanercept nano 5	4	1	4086	2527	1953	1855	1687	91	114	499	297
Etanercept nano 5	4	2	3719	538	443	657	393	103	131	303	124
Etanercept nano 5	4	3	3619	478	342	459	334	48	65	112	71
Etanercept nano 5	4	4	3599	489	319	359	328	56	70	80	67
Etanercept nano 5	4	5	3559	542	427	368	347	56	70	76	71
Etanercept nano 5	4	6	3516	466	385	349	375	82	85	74	86
Etanercept nano 5	4	7	3385	497	394	315	302	74	88	73	76
Etanercept nano 5	4	8	2853	377	264	247	326	75	60	66	75
Etanercept nano 5	4	9	2769	295	268	248	234	79	68	81	71
Etanercept nano 5	4	10	2205	172	123	142	175	64	54	64	60

Etanercept nano 6	4	1	4083	1547	1311	1695	1069	66	122	233	553
Etanercept nano 6	4	2	3897	1115	781	596	688	363	216	250	298
Etanercept nano 6	4	3	3746	809	582	558	367	172	130	122	147
Etanercept nano 6	4	4	3787	924	577	534	330	113	91	87	107
Etanercept nano 6	4	5	3555	738	469	493	245	98	88	72	112
Etanercept nano 6	4	6	3288	584	425	387	217	104	96	85	101
Etanercept nano 6	4	7	2747	437	260	239	155	85	70	56	76
Etanercept nano 6	4	8	2377	311	220	234	136	86	71	59	94
Etanercept nano 6	4	9	2215	369	226	200	160	78	87	66	109
Etanercept nano 6	4	10	1815	284	120	114	114	45	59	46	97
Etanercept nano 7	4	1	4077	1190	1811	2776	1698	216	989	980	237
Etanercept nano 7	4	2	3707	770	943	666	857	166	353	329	195
Etanercept nano 7	4	3	3350	340	341	481	646	105	181	272	107
Etanercept nano 7	4	4	3063	287	283	299	375	83	144	210	103
Etanercept nano 7	4	5	2663	226	207	234	271	77	113	165	87
Etanercept nano 7	4	6	2435	204	185	233	310	77	103	179	90
Etanercept nano 7	4	7	2215	229	150	283	309	60	83	131	70
Etanercept nano 7	4	8	2081	233	184	252	242	81	110	145	77
Etanercept nano 7	4	9	1904	249	170	250	201	76	101	111	78
Etanercept nano 7	4	10	1830	256	212	275	200	88	142	127	80
Etanercept nano 8	4	1	4082	2266	2207	1848	1423	397	317	162	165
Etanercept nano 8	4	2	3859	1280	709	802	708	325	122	62	46
Etanercept nano 8	4	3	3551	876	472	459	528	364	107	83	80
Etanercept nano 8	4	4	3456	774	385	451	505	295	106	101	96
Etanercept nano 8	4	5	3374	715	463	486	531	238	137	129	116
Etanercept nano 8	4	6	3273	805	473	466	548	197	146	131	128
Etanercept nano 8	4	7	2900	649	350	333	506	193	110	103	136
Etanercept nano 8	4	8	2948	526	391	389	335	138	127	100	92
Etanercept nano 8	4	9	2936	534	396	328	411	116	121	92	87
Etanercept nano 8	4	10	2869	428	372	396	313	101	122	94	87

10.5 Fluoreszenzintensität 10 ms

Name	Gruppe	Tag	ROI 1	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
SR nativ 1	1	1	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
SR nativ 1	1	2	36	19	18	21	16	15	14	9	11
SR nativ 1	1	3	23	15	18	18	15	15	14	10	13
SR nativ 1	1	4	20	13	17	18	14	13	16	10	11
SR nativ 1	1	5	18	12	15	16	13	10	15	10	10
SR nativ 1	1	6	18	12	17	17	15	12	17	11	10
SR nativ 1	1	7	25	20	23	24	23	19	22	17	18
SR nativ 1	1	8	18	11	16	14	14	12	16	10	8
SR nativ 1	1	9	16	10	14	16	15	10	17	12	10
SR nativ 1	1	10	20	9	13	12	11	11	15	7	9
SR nativ 2	1	1	831	481	1055	391	235	55	362	123	38
SR nativ 2	1	2	105	122	156	67	40	32	100	25	17
SR nativ 2	1	3	65	82	86	37	32	48	59	30	17
SR nativ 2	1	4	51	56	55	34	38	35	38	29	16
SR nativ 2	1	5	48	47	43	36	37	28	38	28	16
SR nativ 2	1	6	45	45	38	38	36	26	35	33	17
SR nativ 2	1	7	43	44	37	39	35	24	36	34	19
SR nativ 2	1	8	43	44	42	42	36	19	39	33	20
SR nativ 2	1	9	39	41	39	38	32	19	38	35	22
SR nativ 2	1	10	38	46	43	37	29	21	34	34	25
SR nativ 3	1	1	272	114	55	181	61	53	37	29	10
SR nativ 3	1	2	31	15	6	42	14	26	16	23	22
SR nativ 3	1	3	21	9	6	31	8	29	16	24	25
SR nativ 3	1	4	21	9	6	30	8	34	16	24	27
SR nativ 3	1	5	22	10	8	30	9	40	16	27	29
SR nativ 3	1	6	26	10	9	31	10	48	17	31	34
SR nativ 3	1	7	28	11	10	34	11	52	19	34	37
SR nativ 3	1	8	31	13	12	36	12	65	24	37	45
SR nativ 3	1	9	34	14	12	37	12	66	24	35	46
SR nativ 3	1	10	37	17	15	49	14	76	30	41	57
SR nativ 4	1	1	104	36	18	30	40	26	15	12	16
SR nativ 4	1	2	12	6	6	5	8	8	6	5	7
SR nativ 4	1	3	12	7	7	6	9	9	6	6	9
SR nativ 4	1	4	13	9	8	6	10	11	7	7	10
SR nativ 4	1	5	11	9	6	5	10	7	7	5	6
SR nativ 4	1	6	11	9	5	4	10	9	7	4	6
SR nativ 4	1	7	10	10	5	6	9	9	7	4	5
SR nativ 4	1	8	10	10	5	6	9	9	8	4	5
SR nativ 4	1	9	9	8	5	8	7	7	9	5	4
SR nativ 4	1	10	9	7	5	9	6	7	10	6	4
SR nativ 5	1	1	207	77	111	61	62	36	77	29	41
SR nativ 5	1	2	21	11	16	13	11	9	17	9	11
SR nativ 5	1	3	22	15	19	14	12	13	20	9	11
SR nativ 5	1	4	20	18	17	10	12	14	17	8	14
SR nativ 5	1	5	16	16	12	9	13	16	18	9	17
SR nativ 5	1	6	16	14	10	9	15	14	19	11	17
SR nativ 5	1	7	17	19	10	9	16	21	22	13	18
SR nativ 5	1	8	16	18	10	9	16	19	22	13	18
SR nativ 5	1	9	14	14	11	8	12	17	21	15	14
SR nativ 5	1	10	13	10	10	8	11	13	20	17	10

SR nativ 6	1	1	2859	603	1380	1264	781	184	354	399	162
SR nativ 6	1	2	32	21	19	18	16	18	10	11	11
SR nativ 6	1	3	25	20	14	14	13	18	11	8	8
SR nativ 6	1	4	19	16	10	10	10	15	8	7	14
SR nativ 6	1	5	17	17	10	10	11	17	8	8	17
SR nativ 6	1	6	14	17	8	8	13	18	7	8	19
SR nativ 6	1	7	15	18	9	9	15	21	8	13	21
SR nativ 6	1	8	17	19	9	12	19	22	10	15	20
SR nativ 6	1	9	18	21	12	13	21	19	13	16	23
SR nativ 6	1	10	17	16	13	11	17	14	10	17	23
SR nativ 7	1	1	392	119	115	111	182	54	46	84	95
SR nativ 7	1	2	19	10	6	6	13	7	5	15	10
SR nativ 7	1	3	16	10	7	6	11	7	5	13	9
SR nativ 7	1	4	15	11	8	7	10	8	7	14	8
SR nativ 7	1	5	15	9	9	8	9	8	9	15	8
SR nativ 7	1	6	12	8	9	7	7	8	8	14	7
SR nativ 7	1	7	13	10	11	8	8	10	10	14	10
SR nativ 7	1	8	6	7	7	4	4	5	6	9	5
SR nativ 7	1	9	8	9	9	7	6	8	9	11	8
SR nativ 7	1	10	9	10	10	7	7	9	9	9	8
SR nativ 8	1	1	2749	736	414	960	1158	91	95	66	47
SR nativ 8	1	2	36	16	12	72	27	5	8	4	8
SR nativ 8	1	3	21	10	11	54	14	5	11	5	10
SR nativ 8	1	4	18	8	10	53	10	6	12	10	17
SR nativ 8	1	5	16	7	9	54	10	4	15	10	23
SR nativ 8	1	6	15	8	8	54	10	4	15	10	25
SR nativ 8	1	7	16	9	9	55	11	6	22	11	30
SR nativ 8	1	8	15	9	10	55	11	6	28	11	33
SR nativ 8	1	9	16	10	11	60	13	7	30	11	36
SR nativ 8	1	10	14	8	8	57	12	5	35	11	42
SR nativ 9	1	1	904	127	155	340	236	30	27	45	27
SR nativ 9	1	2	12	4	4	5	5	3	4	2	2
SR nativ 9	1	3	10	5	5	5	5	7	6	3	4
SR nativ 9	1	4	8	8	6	4	5	9	7	3	4
SR nativ 9	1	5	9	11	7	6	6	12	11	4	5
SR nativ 9	1	6	10	15	10	7	7	15	16	5	6
SR nativ 9	1	7	11	16	11	7	8	16	18	5	8
SR nativ 9	1	8	11	15	14	8	9	16	17	6	8
SR nativ 9	1	9	13	16	16	10	11	18	19	7	9
SR nativ 9	1	10	11	17	17	8	9	16	17	7	8
SR nano 1	2	1	4000	1767	594	902	571	194	161	24	30
SR nano 1	2	2	1165	367	149	404	193	71	39	19	21
SR nano 1	2	3	685	201	110	189	122	40	24	13	11
SR nano 1	2	4	459	122	72	107	53	29	26	13	15
SR nano 1	2	5	336	81	73	84	53	27	21	11	11
SR nano 1	2	6	286	60	41	87	47	25	17	13	13
SR nano 1	2	7	255	60	47	78	30	24	17	15	14
SR nano 1	2	8	246	50	37	81	31	25	17	14	13
SR nano 1	2	9	221	43	31	67	30	29	15	16	12
SR nano 1	2	10	192	37	29	62	27	14	13	19	12

SR nano 2	2	1	3978	756	675	1107	881	88	34	60	71
SR nano 2	2	2	2366	291	337	657	321	105	66	302	89
SR nano 2	2	3	1134	135	150	314	236	44	26	77	78
SR nano 2	2	4	838	65	83	171	128	26	17	36	27
SR nano 2	2	5	681	39	61	178	98	14	8	31	14
SR nano 2	2	6	549	39	38	96	58	9	8	18	13
SR nano 2	2	7	466	27	26	85	38	7	8	10	10
SR nano 2	2	8	424	26	24	59	32	8	8	12	9
SR nano 2	2	9	331	22	20	62	26	8	7	13	6
SR nano 2	2	10	281	19	15	48	22	7	6	12	6
SR nano 3	2	1	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
SR nano 3	2	2	3811	650	927	1066	696	29	63	183	213
SR nano 3	2	3	2002	260	337	656	236	11	38	110	141
SR nano 3	2	4	1530	148	105	162	115	11	14	23	110
SR nano 3	2	5	1095	87	33	46	51	15	8	9	31
SR nano 3	2	6	959	75	30	26	34	18	7	7	22
SR nano 3	2	7	995	75	44	29	36	20	7	6	22
SR nano 3	2	8	979	79	53	30	38	25	9	5	25
SR nano 3	2	9	1012	84	46	30	41	23	12	6	25
SR nano 3	2	10	1020	78	51	34	45	26	15	6	28
SR nano 4	2	1	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
SR nano 4	2	2	2163	185	178	269	271	63	6	6	10
SR nano 4	2	3	1363	65	81	110	128	42	4	5	6
SR nano 4	2	4	1060	44	57	70	88	27	4	4	5
SR nano 4	2	5	853	37	40	51	77	20	3	4	5
SR nano 4	2	6	621	27	42	26	33	16	6	5	8
SR nano 4	2	7	474	20	27	22	21	16	7	6	5
SR nano 4	2	8	368	13	21	17	18	13	6	5	4
SR nano 4	2	9	324	11	15	14	16	12	5	5	4
SR nano 4	2	10	294	12	20	12	18	12	5	5	5
SR nano 5	2	1	4064	1173	2162	1375	1327	240	302	273	256
SR nano 5	2	2	3980	1251	1213	1039	1426	284	182	178	446
SR nano 5	2	3	3564	724	731	592	843	131	100	141	212
SR nano 5	2	4	3149	513	653	425	588	105	102	103	175
SR nano 5	2	5	2707	384	328	280	464	58	50	86	114
SR nano 5	2	6	2650	300	314	272	356	51	46	63	71
SR nano 5	2	7	2102	281	339	220	341	50	49	74	92
SR nano 5	2	8	2090	282	204	226	262	58	49	50	63
SR nano 5	2	9	1447	127	205	111	152	57	37	25	42
SR nano 5	2	10	1253	110	130	97	92	32	16	23	21
SR nano 6	2	1	4057	1783	987	1292	819	198	222	76	134
SR nano 6	2	2	4093	2560	1861	2206	2432	136	196	67	238
SR nano 6	2	3	4058	1584	1619	1271	1524	126	149	33	202
SR nano 6	2	4	3820	759	795	677	803	102	188	23	210
SR nano 6	2	5	2921	393	492	323	396	93	121	30	87
SR nano 6	2	6	2174	221	272	250	205	86	123	29	58
SR nano 6	2	7	1819	158	226	152	160	104	70	31	72
SR nano 6	2	8	1761	258	186	179	127	83	98	32	59
SR nano 6	2	9	1636	266	199	117	159	91	57	35	74
SR nano 6	2	10	1662	360	159	183	124	99	81	43	56

SR nano 7	2	1	4025	1405	1272	1116	1401	169	305	82	171
SR nano 7	2	2	4095	2976	1978	1964	2185	263	287	83	151
SR nano 7	2	3	4001	1915	1656	1453	1626	162	384	103	225
SR nano 7	2	4	3353	953	957	706	636	106	201	57	85
SR nano 7	2	5	2575	548	483	449	372	45	109	29	44
SR nano 7	2	6	2235	440	364	323	292	38	71	17	31
SR nano 7	2	7	2046	476	375	366	270	57	85	20	26
SR nano 7	2	8	1725	350	347	276	208	50	83	14	30
SR nano 7	2	9	1700	332	369	259	185	90	86	18	32
SR nano 7	2	10	1583	351	327	266	238	90	67	22	40
SR nano 8	2	1	4067	1385	1069	1292	1571	50	48	82	274
SR nano 8	2	2	4079	2288	1517	2118	2222	92	19	154	87
SR nano 8	2	3	4052	1903	1397	1819	1733	94	23	112	90
SR nano 8	2	4	3914	1351	785	1186	1451	48	16	72	100
SR nano 8	2	5	3092	500	439	558	458	74	52	117	71
SR nano 8	2	6	2910	513	437	402	433	81	40	98	46
SR nano 8	2	7	2553	352	338	364	320	64	57	57	53
SR nano 8	2	8	2463	316	314	346	283	46	43	55	43
SR nano 8	2	9	2412	346	326	350	335	49	35	58	35
SR nano 8	2	10	2382	313	287	332	280	38	33	51	41
Etanercept nativ 1	3	1	1107	350	456	651	424	101	87	109	189
Etanercept nativ 1	3	2	404	227	66	60	122	125	162	204	86
Etanercept nativ 1	3	3	453	176	53	76	87	75	83	130	48
Etanercept nativ 1	3	4	471	104	42	63	94	35	34	69	30
Etanercept nativ 1	3	5	402	77	27	53	67	25	24	41	25
Etanercept nativ 1	3	6	362	62	29	45	57	17	21	35	18
Etanercept nativ 1	3	7	303	47	21	33	41	15	17	24	17
Etanercept nativ 1	3	8	257	42	18	29	33	6	14	19	13
Etanercept nativ 1	3	9	212	38	22	38	30	8	15	22	14
Etanercept nativ 1	3	10	213	60	29	41	40	11	14	19	20
Etanercept nativ 2	3	1	970	294	290	408	316	181	164	253	182
Etanercept nativ 2	3	2	701	175	190	160	188	84	41	44	32
Etanercept nativ 2	3	3	609	136	153	105	132	43	27	24	19
Etanercept nativ 2	3	4	610	125	128	81	117	36	24	21	15
Etanercept nativ 2	3	5	488	72	100	55	61	38	28	24	20
Etanercept nativ 2	3	6	452	59	63	47	71	39	31	26	17
Etanercept nativ 2	3	7	434	54	85	59	72	37	47	29	19
Etanercept nativ 2	3	8	332	43	54	39	67	24	26	21	16
Etanercept nativ 2	3	9	280	41	66	41	60	27	25	16	16
Etanercept nativ 2	3	10	241	28	44	34	56	18	17	17	14
Etanercept nativ 3	3	1	717	185	197	233	278	34	74	37	37
Etanercept nativ 3	3	2	656	96	151	204	198	15	36	14	16
Etanercept nativ 3	3	3	604	103	137	120	179	13	27	10	13
Etanercept nativ 3	3	4	496	70	102	75	111	14	21	11	10
Etanercept nativ 3	3	5	394	62	79	55	90	17	22	16	14
Etanercept nativ 3	3	6	410	52	66	64	95	19	23	19	16
Etanercept nativ 3	3	7	379	44	58	45	74	15	23	21	13
Etanercept nativ 3	3	8	263	23	38	17	36	9	15	11	7
Etanercept nativ 3	3	9	254	25	46	21	36	10	17	11	9
Etanercept nativ 3	3	10	243	23	42	20	28	10	19	17	13

Etanercept nativ 4	3	1	1213	220	166	400	174	29	17	84	28
Etanercept nativ 4	3	2	712	136	153	256	221	27	15	24	91
Etanercept nativ 4	3	3	694	128	133	274	184	25	17	21	66
Etanercept nativ 4	3	4	557	77	109	134	99	27	23	18	57
Etanercept nativ 4	3	5	451	63	53	84	64	23	21	14	49
Etanercept nativ 4	3	6	420	59	46	76	55	22	16	11	50
Etanercept nativ 4	3	7	368	57	50	53	53	22	14	8	48
Etanercept nativ 4	3	8	317	51	43	50	44	22	13	10	45
Etanercept nativ 4	3	9	305	52	41	45	46	21	13	8	45
Etanercept nativ 4	3	10	291	45	39	42	46	18	14	8	48
Etanercept nativ 5	3	1	1219	204	416	280	110	43	96	43	22
Etanercept nativ 5	3	2	2107	841	1439	512	686	73	79	46	32
Etanercept nativ 5	3	3	1521	363	1235	836	489	73	111	73	44
Etanercept nativ 5	3	4	1083	226	678	466	269	70	57	102	95
Etanercept nativ 5	3	5	840	155	492	298	190	57	57	66	62
Etanercept nativ 5	3	6	737	165	470	279	207	68	57	67	68
Etanercept nativ 5	3	7	624	161	342	259	217	54	51	60	72
Etanercept nativ 5	3	8	455	148	252	214	200	55	68	59	72
Etanercept nativ 5	3	9	378	125	202	155	166	45	51	46	55
Etanercept nativ 5	3	10	320	99	149	102	125	39	40	34	42
Etanercept nativ 6	3	1	873	191	497	424	198	28	158	67	116
Etanercept nativ 6	3	2	228	59	38	33	36	11	6	5	6
Etanercept nativ 6	3	3	191	33	31	22	29	7	6	5	6
Etanercept nativ 6	3	4	178	27	25	17	23	9	6	5	8
Etanercept nativ 6	3	5	155	23	23	17	20	8	6	5	8
Etanercept nativ 6	3	6	142	28	17	14	21	9	6	5	8
Etanercept nativ 6	3	7	108	18	20	15	19	9	8	7	10
Etanercept nativ 6	3	8	97	26	15	16	18	10	9	8	10
Etanercept nativ 6	3	9	93	27	18	18	16	10	9	8	8
Etanercept nativ 6	3	10	88	26	14	15	16	10	8	8	9
Etanercept nativ 7	3	1	2038	235	294	548	308	24	27	57	98
Etanercept nativ 7	3	2	1126	420	265	331	600	52	28	27	95
Etanercept nativ 7	3	3	681	112	127	186	163	39	23	24	31
Etanercept nativ 7	3	4	587	88	89	136	90	51	26	29	54
Etanercept nativ 7	3	5	562	99	79	89	91	77	29	14	26
Etanercept nativ 7	3	6	492	76	72	90	79	58	19	15	21
Etanercept nativ 7	3	7	495	76	66	72	82	48	15	7	17
Etanercept nativ 7	3	8	470	75	73	69	75	36	13	8	19
Etanercept nativ 7	3	9	438	70	89	76	59	34	17	7	17
Etanercept nativ 7	3	10	407	72	58	61	60	24	12	6	16
Etanercept nativ 8	3	1	895	344	215	564	189	103	303	320	247
Etanercept nativ 8	3	2	475	226	142	121	148	70	41	23	30
Etanercept nativ 8	3	3	358	97	74	66	73	35	20	9	13
Etanercept nativ 8	3	4	329	99	82	72	68	30	22	12	12
Etanercept nativ 8	3	5	315	76	55	76	49	32	25	12	16
Etanercept nativ 8	3	6	200	54	47	42	41	20	16	11	14
Etanercept nativ 8	3	7	205	53	33	40	31	22	17	8	10
Etanercept nativ 8	3	8	168	44	34	34	28	19	13	8	10
Etanercept nativ 8	3	9	158	43	32	34	29	17	12	8	8
Etanercept nativ 8	3	10	140	28	32	40	29	23	20	13	14

Etanercept nano 1	4	1	3257	436	511	461	311	38	44	36	22
Etanercept nano 1	4	2	953	241	145	120	112	34	15	15	16
Etanercept nano 1	4	3	815	153	144	78	78	26	15	16	16
Etanercept nano 1	4	4	696	102	121	58	77	19	13	16	15
Etanercept nano 1	4	5	654	93	127	56	76	17	8	14	15
Etanercept nano 1	4	6	419	56	38	32	29	19	8	12	12
Etanercept nano 1	4	7	365	44	35	26	24	16	7	10	11
Etanercept nano 1	4	8	355	49	50	35	27	23	10	12	15
Etanercept nano 1	4	9	277	25	16	11	19	7	5	6	7
Etanercept nano 1	4	10	195	27	19	14	22	13	9	10	12
Etanercept nano 2	4	1	3803	1079	1031	981	423	253	168	451	216
Etanercept nano 2	4	2	2902	300	501	628	225	111	120	112	99
Etanercept nano 2	4	3	2759	203	357	443	188	103	110	68	85
Etanercept nano 2	4	4	2545	179	254	338	139	99	68	67	118
Etanercept nano 2	4	5	2123	178	259	165	116	54	78	18	44
Etanercept nano 2	4	6	1913	128	197	159	94	42	63	22	46
Etanercept nano 2	4	7	1775	176	190	188	80	39	66	26	35
Etanercept nano 2	4	8	1925	209	143	193	46	63	57	37	60
Etanercept nano 2	4	9	1855	221	144	244	45	53	48	34	50
Etanercept nano 2	4	10	1090	131	48	134	52	21	44	29	77
Etanercept nano 3	4	1	2691	672	414	619	364	50	94	57	131
Etanercept nano 3	4	2	1361	350	144	203	85	42	27	95	32
Etanercept nano 3	4	3	1242	223	91	159	92	26	24	92	30
Etanercept nano 3	4	4	1071	172	65	137	70	21	15	67	27
Etanercept nano 3	4	5	883	89	23	93	114	21	14	78	23
Etanercept nano 3	4	6	807	78	25	118	111	20	11	74	25
Etanercept nano 3	4	7	719	68	17	88	127	22	11	72	20
Etanercept nano 3	4	8	636	65	20	88	95	22	12	69	16
Etanercept nano 3	4	9	556	56	18	90	98	19	11	66	13
Etanercept nano 3	4	10	449	45	15	66	72	19	9	67	11
Etanercept nano 4	4	1	2461	622	185	169	250	43	63	43	13
Etanercept nano 4	4	2	1135	205	115	92	232	53	30	53	37
Etanercept nano 4	4	3	1056	156	87	53	124	27	13	20	10
Etanercept nano 4	4	4	916	109	74	58	96	27	16	13	11
Etanercept nano 4	4	5	952	96	80	56	92	23	14	9	7
Etanercept nano 4	4	6	889	141	73	61	88	22	16	10	7
Etanercept nano 4	4	7	727	63	54	56	71	15	17	9	6
Etanercept nano 4	4	8	647	55	54	55	66	14	17	8	5
Etanercept nano 4	4	9	605	55	47	63	66	14	17	9	7
Etanercept nano 4	4	10	474	32	30	52	43	9	22	8	6
Etanercept nano 5	4	1	2574	516	402	377	334	18	23	108	59
Etanercept nano 5	4	2	1305	107	89	131	79	21	26	61	25
Etanercept nano 5	4	3	1210	87	63	97	64	9	12	22	14
Etanercept nano 5	4	4	1189	94	53	56	79	11	13	14	13
Etanercept nano 5	4	5	1183	107	85	72	69	11	13	16	13
Etanercept nano 5	4	6	1117	91	54	61	87	15	14	13	18
Etanercept nano 5	4	7	1130	96	78	66	63	15	17	15	15
Etanercept nano 5	4	8	811	70	51	53	62	14	11	13	15
Etanercept nano 5	4	9	782	61	55	46	53	16	13	16	14
Etanercept nano 5	4	10	577	37	26	32	32	12	10	12	11

Etanercept nano 6	4	1	2944	321	254	370	245	10	19	33	124
Etanercept nano 6	4	2	1589	220	174	135	140	88	54	56	59
Etanercept nano 6	4	3	1415	156	118	123	78	37	27	28	26
Etanercept nano 6	4	4	1309	151	114	103	81	23	18	17	19
Etanercept nano 6	4	5	1162	146	110	111	58	23	21	19	21
Etanercept nano 6	4	6	985	114	88	94	51	22	19	20	18
Etanercept nano 6	4	7	739	86	58	53	33	19	15	12	14
Etanercept nano 6	4	8	612	60	46	50	30	17	14	12	18
Etanercept nano 6	4	9	529	62	48	39	32	17	18	14	21
Etanercept nano 6	4	10	417	52	25	23	24	9	11	14	19
Etanercept nano 7	4	1	2988	237	379	586	324	40	192	190	44
Etanercept nano 7	4	2	1141	153	186	135	181	33	71	66	39
Etanercept nano 7	4	3	949	76	60	87	180	21	29	60	27
Etanercept nano 7	4	4	864	59	59	60	80	16	29	40	21
Etanercept nano 7	4	5	721	45	42	46	53	15	22	32	17
Etanercept nano 7	4	6	644	39	37	50	61	15	20	36	17
Etanercept nano 7	4	7	577	45	30	57	61	11	16	25	14
Etanercept nano 7	4	8	544	48	38	51	50	16	22	29	16
Etanercept nano 7	4	9	495	53	37	51	40	15	21	21	16
Etanercept nano 7	4	10	454	49	39	54	39	17	26	25	15
Etanercept nano 8	4	1	2861	427	483	414	271	70	70	33	34
Etanercept nano 8	4	2	1581	284	152	152	120	64	24	13	9
Etanercept nano 8	4	3	1306	178	99	93	96	72	22	16	16
Etanercept nano 8	4	4	1244	155	76	90	99	58	20	20	19
Etanercept nano 8	4	5	1206	171	89	103	103	48	25	25	24
Etanercept nano 8	4	6	1152	157	94	96	125	36	27	24	28
Etanercept nano 8	4	7	950	133	75	57	95	32	22	19	23
Etanercept nano 8	4	8	962	109	79	78	65	26	24	21	19
Etanercept nano 8	4	9	935	106	86	72	75	23	25	18	17
Etanercept nano 8	4	10	887	87	75	83	61	18	24	18	17

10.6 Fluoreszenzintensität Stunde 1

Name	Gruppe	Minute	ROI 1	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
SR nativ 1	1	0	3985	2718	2358	1129	1017	2259	486	160	351
SR nativ 1	1	15	3918	2651	2721	1440	1158	2141	503	202	372
SR nativ 1	1	30	3898	2596	2739	1407	1317	1993	497	204	387
SR nativ 1	1	45	3792	2586	2602	1324	1332	1820	445	172	384
SR nativ 1	1	60	3707	2345	2475	1325	1208	1606	422	156	362
SR nativ 2	1	0	4068	2898	4094	3499	1701	680	1294	895	465
SR nativ 2	1	15	4027	3250	4094	3401	1662	754	2005	862	362
SR nativ 2	1	30	3988	3052	4091	3181	1716	620	2491	821	310
SR nativ 2	1	45	3893	2949	4074	2409	1690	511	2053	697	249
SR nativ 2	1	60	3815	2758	4015	2215	1626	452	1872	696	242
SR nativ 3	1	0	1341	548	280	922	300	254	199	147	50
SR nativ 3	1	15	1160	437	268	852	261	234	193	130	49
SR nativ 3	1	30	1104	424	266	814	262	213	190	122	49
SR nativ 3	1	45	1075	422	270	887	237	207	194	122	49
SR nativ 3	1	60	1065	415	271	796	265	202	179	131	49
SR nativ 4	1	0	508	168	84	149	182	130	73	61	75
SR nativ 4	1	15	398	160	57	118	143	157	53	39	57
SR nativ 4	1	30	333	126	53	127	122	155	43	36	53
SR nativ 4	1	45	279	125	45	99	112	156	40	29	48
SR nativ 4	1	60	250	107	41	87	110	141	37	26	45
SR nativ 5	1	0	1010	406	512	298	311	177	361	145	210
SR nativ 5	1	15	834	296	379	291	311	152	293	124	207
SR nativ 5	1	30	738	285	309	265	255	130	265	112	196
SR nativ 5	1	45	671	229	284	232	228	115	242	97	182
SR nativ 5	1	60	617	210	268	208	219	101	226	78	164
SR nativ 6	1	0	4095	2926	3969	4092	3550	922	1713	2199	819
SR nativ 6	1	15	4087	2703	3842	4083	3830	812	1345	2241	706
SR nativ 6	1	30	4050	2436	3460	4092	3205	716	1035	2508	603
SR nativ 6	1	45	3980	1875	3051	3961	2658	623	826	2255	519
SR nativ 6	1	60	3904	1615	2760	3815	2392	557	706	1847	463
SR nativ 7	1	0	1906	538	530	612	935	249	238	414	434
SR nativ 7	1	15	1528	386	474	702	775	163	141	416	253
SR nativ 7	1	30	1147	291	592	569	479	119	127	338	163
SR nativ 7	1	45	933	237	388	530	381	90	90	295	128
SR nativ 7	1	60	771	177	278	421	274	72	74	243	105
SR nativ 8	1	0	4086	3083	2561	2722	3344	649	517	318	220
SR nativ 8	1	15	4094	3445	3967	2678	3118	1999	348	176	185
SR nativ 8	1	30	4089	3374	3605	2678	2980	1407	238	87	128
SR nativ 8	1	45	4073	2771	3401	2655	2356	937	118	60	107
SR nativ 8	1	60	4068	2942	3111	2302	2567	718	160	40	79
SR nativ 9	1	0	3545	552	724	1701	1253	136	126	204	130
SR nativ 9	1	15	2723	476	465	1205	1200	95	71	119	104
SR nativ 9	1	30	2297	429	366	957	1107	72	50	87	88
SR nativ 9	1	45	1969	484	337	754	980	63	42	74	91
SR nativ 9	1	60	1707	515	313	616	840	53	38	66	96
SR nano 1	2	0	4095	2998	1962	2374	2171	528	664	62	140
SR nano 1	2	15	4095	3626	2624	2912	2184	776	822	94	152
SR nano 1	2	30	4095	3781	2807	3063	2266	760	765	105	182
SR nano 1	2	45	4095	3890	2900	3530	2566	873	758	148	213
SR nano 1	2	60	4095	3996	2581	3130	3083	923	598	112	225

SR nano 2	2	0	4095	2535	2057	2056	2353	240	144	187	245
SR nano 2	2	15	4095	2799	2182	2736	2989	295	155	240	289
SR nano 2	2	30	4095	2745	1745	3114	2999	291	126	280	285
SR nano 2	2	45	4095	2949	1861	3384	3316	349	139	233	344
SR nano 2	2	60	4095	2963	2225	3122	3086	414	146	250	236
SR nano 3	2	0	4095	3310	3533	3137	2953	178	273	694	1231
SR nano 3	2	15	4095	2947	3301	3840	3787	163	200	784	1884
SR nano 3	2	30	4095	3395	3288	3176	3661	181	180	507	1260
SR nano 3	2	45	4095	3424	3235	3252	3260	180	174	516	1282
SR nano 3	2	60	4095	3518	3345	3468	3438	193	158	524	1372
SR nano 4	2	0	4095	3019	3965	2379	1908	386	1570	179	163
SR nano 4	2	15	4095	3537	3946	2085	2256	427	1054	147	187
SR nano 4	2	30	4095	3641	3609	1616	2051	520	809	105	159
SR nano 4	2	45	4095	3294	3189	1494	1731	414	386	90	133
SR nano 4	2	60	4094	3365	2621	935	1200	440	254	67	98
SR nano 5	2	0	4095	3977	3881	3940	3802	1198	1487	1399	1308
SR nano 5	2	15	4095	4028	3969	3911	3794	1081	1446	1176	1167
SR nano 5	2	30	4095	4035	4021	3904	3905	1023	1438	1230	1113
SR nano 5	2	45	4095	3920	4016	4022	3685	914	1315	1270	837
SR nano 5	2	60	4095	3953	4079	4052	3613	884	1498	1262	788
SR nano 6	2	0	4095	4095	3505	3841	3286	972	1044	419	644
SR nano 6	2	15	4095	4095	3458	4058	3940	859	1146	386	851
SR nano 6	2	30	4095	4095	3615	4094	3866	812	1482	410	979
SR nano 6	2	45	4095	4095	3922	4049	3908	993	1388	414	634
SR nano 6	2	60	4095	4095	3844	4091	4075	960	1422	388	808
SR nano 7	2	0	4095	4060	3718	3836	4064	377	1351	208	948
SR nano 7	2	15	4095	4095	3862	4022	4094	420	1640	226	930
SR nano 7	2	30	4095	4095	3957	4088	4093	426	1750	205	959
SR nano 7	2	45	4095	4095	3982	4087	4076	438	1704	189	929
SR nano 7	2	60	4095	4095	3949	4078	4095	427	1750	180	954
SR nano 8	2	0	4095	4033	3359	3969	4035	257	244	397	1322
SR nano 8	2	15	4095	4092	3563	4040	4090	294	249	391	2260
SR nano 8	2	30	4095	4095	3675	4055	4094	329	242	483	2393
SR nano 8	2	45	4095	4094	3682	4079	4094	337	216	637	2580
SR nano 8	2	60	4095	4095	3758	4080	4094	347	212	609	2714

11. Danksagung

12. Tabellarischer Lebenslauf